



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner,
(ORCHIDACEAE), especie endémica de México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

IRIS SUÁREZ QUIJADA



TUTORA:

M. EN C. JUANA MABEL HERNÁNDEZ ALTAMIRANO

2006



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.

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, DEL JARDÍN BOTÁNICO, DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. EN C. JUANA MABEL HERNÁNDEZ ALTAMIRANO, DEL DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA Y LA M. EN C. ESTELA SANDOVAL ZAPOTITLA.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado
Regeneración in vitro de Euchile mariae (Ames), Withner (ORCHIDACEAE),
especie endémica de México.

realizado por Iris Suárez Quijada

con número de cuenta 09817364-2 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio:

Tutor (a) Propietario M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano

Propietario Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Propietario M. en C. Estela Sandoval Zapotitla

Suplente Dr. Alejandro Martínez Palacios

Suplente M. en C. María de los Angeles Aída Téllez Velasco

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 22 de Mayo
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

del 2006
FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

A mi madre por darme la vida y
por todas sus enseñanzas, sin duda
alguna eres un ejemplo a
seguir.

A Dios por todas sus bendiciones y por
estar siempre conmigo en el camino por la
vida.

A mis padres Hilda y Martín con todo mi amor y cariño por el apoyo brindado durante todos estos años para mi formación académica. ¡LOS QUIERO MUCHÍSIMO!

A mis hermanas Emma Carolina y Esmeralda con mucho cariño por su apoyo moral y compañía.

A mi abuelita Juana Martínez I.* por su cariño y sabios consejos.

A Samuel Barragán Larios, gracias por todo tu amor, apoyo incondicional, comprensión y por tenerme paciencia durante todo este tiempo.

¡Gracias de todo corazón!

* Q.E.P.D.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una educación de sólida y de calidad.

A todos mis maestros que han contribuido para mi formación académica, por darme las herramientas para seguir esforzándome y superándome día a día.

A la M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano, por ser una extraordinaria persona, maestra y amiga, por su apoyo constante y por la dirección para la realización de este trabajo. ¡Mil gracias por todo!

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila por todo su apoyo, por las valiosas sugerencias para mejorar el presente trabajo y por forjar en mí un amor por la ciencia. Gracias por todos sus consejos.

A la M. en C. Estela Sandoval Zapotitla por su enorme calidez humana, su valiosísima ayuda para la realización de los análisis histológicos e histoquímicos del presente trabajo y por todos los conocimientos sembrados en mi persona.

Al Dr. Ernesto Aguirre León por las sugerencias realizadas para esta investigación, por el material bibliográfico y biológico proporcionado y por su invaluable disposición para atender todas mis dudas.

Al Dr. Alejandro Martínez Palacios por todo el apoyo proporcionado para realizar los análisis estadísticos, así como por las sugerencias proporcionadas para mejorar este trabajo. En verdad gracias.

A la M. en C. Aída Téllez Velasco por las observaciones realizadas para esta tesis, la bibliografía prestada y por darme siempre ánimos.

Al Dr. Gerardo Salazar Chávez por la bibliografía prestada, y por resolver siempre todas mis dudas.

A Francisco Vega Hernández por proporcionarme el material biológico con el cual se inició este trabajo. ¡MUCHAS GRACIAS AMIGO!

A Isabel Pineda Hernández, Mónica Vázquez Cortés y a la Biól. Ma. del Carmen Loyola Blanco por las excelentes fotografías tomadas para esta investigación y por su grata amistad.

A la Biól. María Concepción Guzmán Ramos por ser una maravillosa persona, por su paciencia y ayuda y por las correcciones realizadas para los análisis histológicos e histoquímicos de la presente investigación.

Al Maestro Calixto León Gómez por la bibliografía facilitada, sus acertadas sugerencias y por su amistad.

A la Biól. Bárbara Estrada y al Biól. Gabriel Olalde Parra, por ser unas magníficas personas y por todo su apoyo.

A la M. en C. Susana Luna Rosales por ser una gran persona, amiga y maestra y por la información y bibliografía proporcionada.

A mi querida amiga Daniela Rebolledo Solleiro gracias por todos los momentos compartidos durante la carrera y por los pensamientos q se convirtieron en palabras y ahora en hechos. Te quiero mucho.

A Fernando Rojas Briseño por su amistad, por todos los magníficos "tips" proporcionados para el cultivo de orquídeas y por todos los conocimientos brindados.

A Diana Gabriela Barrera Vargas por toda la ayuda prestada y por los gratos momentos compartidos, ¡Muchas gracias!

A Edgard Mason Romo por su amistad sincera y por toda su valiosa ayuda.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM: Wendy Juárez, Sandra Cabrera, Dalia Goldhamer, Samanta Saucedo, Octavio González, Juan José Francisco, Felipe Gómez, Vicente Chávez, Isabel Papalotzi, Edgar Yáñez, Everardo Ramírez y Sergio Sarabia.



Esta orquídea endémica de México a lo largo de la historia ha sido clasificada taxonómicamente dentro de diferentes géneros. Actualmente es conocida como *Prostechea mariae*.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS | 11 |
| RESUMEN | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 2. ANTECEDENTES | |
| 2.1 Biodiversidad..... | 15 |
| 2.2 Biodiversidad en México..... | 15 |
| 2.3 Factores que afectan la biodiversidad..... | 17 |
| 2.4 Consecuencias de la pérdida de la biodiversidad..... | 18 |
| 2.5 Familia Orchidaceae..... | 19 |
| 2.5.1 Clasificación..... | 20 |
| 2.5.2 Distribución..... | 20 |
| 2.5.3 Hábitos de crecimiento..... | 21 |
| 2.5.4 Formas de vida..... | 22 |
| 2.5.5 Características..... | 22 |
| 2.5.6 Semillas..... | 25 |
| 2.5.7 Germinación..... | 25 |
| 2.5.8 Micorrizas..... | 27 |
| 2.5.9 Problemática para su conservación..... | 28 |
| 2.5.10 Estrategias para su conservación..... | 29 |
| 2.6 <i>Euchile mariae</i> (Ames) Withner..... | 32 |
| 2.6.1 Ubicación taxonómica..... | 32 |
| 2.6.2 Descripción botánica..... | 32 |
| 2.6.3 Distribución geográfica e importancia ecológica..... | 35 |
| 2.6.4 Problemática y estado de conservación..... | 36 |
| 2.7 Conservación..... | 36 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.7.1 | Conservación <i>in situ</i> | 37 |
| 2.7.2 | Conservación <i>ex situ</i> | 38 |
| 2.8 | Cultivo de Tejidos Vegetales..... | 39 |
| 2.9 | Micropropagación..... | 43 |
| 2.9.1 | Micropropagación vía organogénesis..... | 45 |
| 2.9.2 | Micropropagación vía embriogénesis somática..... | 46 |
| 2.10 | Reguladores de crecimiento vegetal..... | 49 |
| 2.10.1 | Auxinas..... | 49 |
| 2.10.2 | Citocininas..... | 51 |
| 2.10.3 | Interacción auxinas-citocininas..... | 51 |
| 2.11 | Micropropagación de orquídeas..... | 53 |
| 2.11.1 | Germinación simbiótica y asimbiótica..... | 53 |
| 2.11.2 | Propagación clonal..... | 54 |
| 2.12 | Propagación <i>in vitro</i> de protocormos..... | 57 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN | 59 |
| 4. | OBJETIVOS | 60 |
| 5. | MATERIALES Y MÉTODOS | 61 |
| 5.1 | Material biológico..... | 61 |
| 5.2 | Desinfección y siembra del material biológico | 61 |
| 5.3 | Medios de cultivo..... | 62 |
| 5.4 | Fase de inducción..... | 62 |
| 5.5 | Análisis estadístico..... | 65 |
| 5.6 | Fase de desarrollo e individualización..... | 65 |
| 5.7 | Condiciones de incubación..... | 65 |
| 5.8 | Fase de aclimatización..... | 66 |
| 5.9 | Análisis histológico..... | 67 |
| 5.10 | Pruebas histoquímicas..... | 69 |
| 5.10.1 | Identificación de proteínas..... | 69 |
| 5.10.2 | Identificación de lípidos..... | 70 |
| 5.10.3 | Identificación de almidón..... | 70 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 72 |

| | |
|---|------------|
| 6.1 Material biológico..... | 72 |
| 6.2 Desinfección y siembra del material biológico..... | 72 |
| 6.3 Germinación asimbiótica de semillas de <i>Euchile mariae</i> | 74 |
| 6.4 Fase de inducción..... | 78 |
| 6.4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de mitades de protocormos en medio MS modificado sujetos a la interacción de ANA y BA..... | 80 |
| 6.4.2 Formación de PLB's a partir de mitades de protocormos en medio de cultivo MS modificado..... | 86 |
| 6.4.3 Secciones apicales de protocormos..... | 86 |
| 6.4.4 Secciones basales de protocormos..... | 93 |
| 6.4.5 Secciones apicales y basales de protocormos..... | 101 |
| 6.5 Fase de individualización..... | 104 |
| 6.6 Fase de aclimatización | 107 |
| 6.7 Análisis histológico..... | 113 |
| 6.7.1 Embriogénesis somática directa..... | 113 |
| 6.8 Pruebas Histoquímicas..... | 122 |
| | |
| 7. CONCLUSIONES..... | 127 |
| | |
| 8. APÉNDICES | 129 |
| 8.1 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 1962..... | 129 |
| 8.2 Medio de cultivo Knudson C (KC) 1946..... | 130 |
| | |
| 9. LITERATURA CITADA..... | 131 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|---|
| ANA | Ácido α -naftalenacético |
| BA | N ⁶ -benciladenina |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| D. E. | Desviación estándar |
| CITES | Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres |
| LGEEPA | Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente |
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| SINAP | Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas |
| MS | Medio Murashige & Skoog (1962) |
| KC | Medio Knudson C (1946) |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| μM | Micromolar |
| RCV | Reguladores de crecimiento vegetal |
| PLB's | Protocorm like bodies (Cuerpos parecidos a protocormos) |

RESUMEN

En el presente trabajo se logró la regeneración de *Euchile mariae*, mediante el cultivo *in vitro* de secciones apicales y basales de protocormos. Se emplearon los medios de cultivo KC y MS modificados, obteniéndose en ambos casos un elevado porcentaje de germinación mayor al 90%. Las secciones apicales y basales de protocormos, utilizadas como explantes, fueron cultivadas *in vitro*, en medio de cultivo MS modificado, adicionado de distintas concentraciones de ácido α -naftalenacético (ANA) (0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l) y benciladenina (BA) (0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l). La respuesta obtenida para ambos tipos de explantes, fue la formación de PLB's o embriones somáticos. Ésta se evidenció mediante el análisis histológico realizado. Los PLB's obtenidos a partir de ambas secciones de protocormos se desarrollaron hasta dar lugar a la formación de plantas completas. Sin embargo, la mayor formación de PLB's se registró a partir de las secciones basales de protocormos, en donde se obtuvieron un promedio de 11.44 ± 9.64 PLB's por explante, mientras que para las secciones apicales se formaron en promedio 4.98 ± 5.33 PLB's por explante. Al cultivar las secciones apicales de protocormos, la mejor respuesta morfogénica se obtuvo en el medio MS modificado adicionado con 1 mg/l de ambos reguladores de crecimiento, donde se formó el mayor número de PLB's por explante (11.00 ± 9.55). En el caso de las secciones basales de protocormos, el mayor número de PLB's se formó en el medio MS modificado adicionado con 1 mg/l de BA, sin la adición de ANA, obteniéndose un promedio de 33.07 ± 20.75 PLB's por explante. Las plantas obtenidas a partir de ambas secciones de protocormos, fueron aclimatizadas exitosamente, obteniéndose un porcentaje de sobrevivencia del 100%.

El empleo del Cultivo de Tejidos Vegetales, resultó una técnica eficiente, debido a que se logró establecer un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Euchile mariae*, especie endémica y amenazada de México, el cual proporciona una alternativa para reducir la presión que se ejerce sobre las poblaciones silvestres de esta especie y que a su vez, puede ser utilizado como modelo para la propagación masiva de otras especies de orquídeas, contribuyendo a su conservación y aprovechamiento sustentable.

1. INTRODUCCIÓN

México es un país notable no sólo por su riqueza en especies, sino también por su gran número de endemismos. Más del 50% de las especies de plantas endémicas reportadas para México, están representadas en sólo cinco familias: Cactaceae, Asteraceae, Poaceae, Fabaceae y Orchidaceae (Toledo, 1988), de las cuales la familia Orchidaceae ocupa el tercer lugar en cuanto a riqueza de especies dentro del reino vegetal, solamente superada por la familia Asteraceae (antes Compositae) y Fabaceae (antes Leguminosae). Se estima que una de cada 10 especies de plantas con flor es una orquídea (Sarmiento y Romero, 2000; Hágsater *et al.*, 2005).

La familia Orchidaceae es la más abundante dentro de las monocotiledóneas, con un estimado de 25,000 especies a nivel mundial. En México se distribuyen cerca de 1200-1400 especies diferentes, resultado de un largo proceso de evolución (Soto, 1994; Espejo & López-Ferrari, 1998; Hágsater y Soto, 1998; Soto y Salazar, 2004) lo que representa aproximadamente el 6% del total mundial (Espejo *et al.*, 2002). De esta gran diversidad se reporta que existen 444 especies o subespecies endémicas, las cuales corresponden aproximadamente al 40% del total de especies registradas para el país (Soto, 1996).

Desafortunadamente en nuestro país, la riqueza de orquídeas está en peligro permanente a consecuencia de la destrucción y transformación de sus hábitats, el tráfico ilegal de especies, la depredación de ejemplares y el crecimiento urbano desordenado, factores que han conducido a que sean plantas muy vulnerables a la extinción (Sarmiento y Romero, 2000). De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana, 181 especies de orquídeas se encuentran catalogadas dentro de algún status de conservación, de las cuales 15 especies están en peligro de extinción, 58 amenazadas, 107 sujetas a protección especial y una especie se encuentra extinta en la naturaleza (SEMARNAT, 2002). Así mismo, toda la familia Orchidaceae ha sido incluida en los apéndices I y II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Esto demuestra que es urgente e indispensable implementar estrategias para la conservación *in situ* y *ex situ* de esta familia de plantas, como las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, que han mostrado ser una herramienta de gran utilidad para el estudio, conservación y propagación rápida y masiva de diversas especies de plantas (orquídeas, cactáceas, cícadas, coníferas, agaves, entre otras), como una alternativa de manejo sustentable (Fay, 1994; Chávez *et al.*, 1992; Chávez y Rubluo, 1995; Rubluo *et al.*, 1993; Mata *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2003; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

Euchile mariae, es una orquídea endémica de México, que por la belleza y sencillez de sus flores ha sido muy apreciada como ornamental, motivo por el cual sus poblaciones silvestres han sido severamente afectadas por las actividades humanas tales como la destrucción y alteración de su hábitat y la sobrecolecta y el comercio ilegal, razones por las que ha sido catalogada por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002), como una especie amenazada. Las especies endémicas de plantas y animales constituyen los organismos de interés principal para su estudio y conservación biológica, pues el hecho de presentar áreas restringidas de distribución y, en muchos casos, poblaciones pequeñas los vuelven organismos más vulnerables frente a la destrucción drástica de sus hábitats (Toledo, 1988).

En la presente investigación, se describe el protocolo para la regeneración de *Euchile mariae*, mediante el cultivo *in vitro* de secciones apicales y basales de protocormos, empleando técnicas de cultivo de tejidos vegetales, que proporcionan una excelente alternativa para la propagación masiva de plantas, con la finalidad de abastecer la demanda ornamental y reducir su sobrecolecta en la naturaleza, acciones que deterioran y destruyen las poblaciones silvestres, así como para la protección y recuperación de poblaciones en peligro de extinción. Así mismo, mediante el análisis histológico realizado, se reporta la caracterización de los regenerantes formados, a partir de ambas secciones de protocormos corroborando mediante éste, la vía morfogénica obtenida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biodiversidad

La biodiversidad contempla toda la riqueza o variedad de formas vivientes que existen en la biosfera, incluidas las plantas, animales y microorganismos, sostenidos como entes vivientes por una constelación de información genética aún mayor, y distribuidos en forma compleja en los biomas o ecosistemas que caracterizan al planeta (Dirzo, 1999). Ésta es resultado de la evolución biológica que ha ocurrido en el tiempo, irreplicable en las mismas condiciones, que se manifiesta en la existencia de diferentes formas de vida (Halffter y Ezcurra, 1992).

El empleo del término diversidad biológica es reciente, surgió como un concepto que incluye por igual enfoques de la taxonomía, la ecología y la biogeografía. Al mismo tiempo es un concepto que implica una finalidad práctica: la evaluación de los ambientes naturales y perturbados del planeta (Toledo, 1994). De acuerdo con Halffter y Ezcurra (1992), se definen tres niveles de la biodiversidad: biogeográfico, ecológico y genético. En un contexto biogeográfico está dada por la diversidad de ecosistemas en una región determinada (diversidad gama), mientras que a nivel ecológico tiene dos expresiones: 1) la diversidad presente en un sitio, o diversidad α , que se refiere a la cantidad de especies presentes en un mismo hábitat y 2) la heterogeneidad espacial, o diversidad β , que mide la continuidad de hábitats diferentes en el espacio. Finalmente, el componente genético (conocido como variabilidad genética) está dado por la cantidad de alelos diferentes que tenga la especie (variabilidad genotípica) y los caracteres que estos diferentes alelos codifiquen en el organismo (variabilidad fenotípica).

2.2 Biodiversidad en México

Se sabe que los trópicos son los ecosistemas más diversos en la Tierra. Por tanto, la biodiversidad decrece con la distancia a partir de las zonas tropicales (Dirzo, 1999). Del total de plantas vasculares (se calcula que en el mundo hay cerca de 250 000 especies) se estima que aproximadamente 150 000 crecen en las regiones tropicales. La diversidad biológica de América Tropical es la más rica del mundo en número de especies, pues alcanza probablemente las 90 000, cerca del 38% de la diversidad total de la Tierra (Forero, 1994).

México es uno de los siete países megadiversos del planeta por su alta riqueza biológica (Mittermeier, 1988); está considerado como el cuarto país con la mayor biodiversidad a nivel mundial en términos de riqueza de especies, diversidad genética, tipos de vegetación y de germoplasma de plantas cultivadas (Soberón y Llorente, 1993). Brasil, Colombia y China, ocupan los tres primeros lugares dentro de este listado, aunque si algunas cifras se analizan minuciosamente, se podría llevar al país a ocupar el tercer sitio (Magaña y Villaseñor, 2002). Su gran diversidad biológica se atribuye a la combinación de diversos factores, entre ellos, su historia, su posición geográfica, variabilidad geológica, diversidad de altitudes, climas y su orografía (Ramamoorthy *et al.*, 1993). Aunado a estos factores, México se localiza en la intersección de dos reinos o dominios biogeográficos: el Neártico y el Neotropical, de tal manera que su riqueza está dada por un conjunto de especies de origen boreal que por lo común ocupan y dominan las porciones montañosas, con climas templados o fríos, y otro conformado por especies de afinidad tropical que habitan las partes bajas o medias, con climas cálidos secos o húmedos (Toledo, 1988).

Se estima que más del 12% de la biota del planeta está contenida en su territorio de casi dos millones de km² (Mittermeier, 1988; Toledo, 1994). Ésta se distribuye en los seis principales hábitats terrestres del país: tropical húmedo, tropical subhúmedo, templado húmedo, templado subhúmedo, árido a semiárido y alpino (Toledo y Ordóñez, 1998).

Según Toledo (1988) y Rzedowski (1993), México cuenta con el 12.78% de las plantas descritas que existen actualmente en el mundo, sumando un total de 34 000 especies, de las cuales 220 familias, 2 410 géneros y 22 000 especies pertenecen a plantas vasculares que constituyen la flora fanerogámica del país. Su extraordinaria riqueza biológica está representada por la gran cantidad de endemismos que presenta. El hecho de que entre el 10% y 15% de los géneros y 52% de las especies de plantas con flores de México sean endémicos, indica que nuestro país ha sido el lugar de origen y evolución de muchos linajes de plantas y que ha desempeñado un importante papel en la evolución y radiación secundaria de linajes cuyos orígenes se remontan a otras regiones del planeta (Rzedowski, 1991a, 1993; citado por Challenger, 1998).

2.3 Factores que afectan la biodiversidad

Desafortunadamente, existen un gran número de factores que amenazan la biodiversidad del país. Según Toledo (1988), en los años setenta solamente el 40.8% del territorio mexicano mantenía su vegetación natural sin disturbios, lo cual indica que la enorme riqueza de la flora y fauna mexicana se halla seriamente amenazada. Entre las causas principales de la degradación de las áreas naturales de México, se encuentran el desarrollo urbano, el cual se ha ido incrementado desmedidamente a costa de los recursos naturales, ocasionando con esto el surgimiento de severos problemas ambientales tales como la deforestación, erosión de suelos, y la reducción y fragmentación de hábitats, que a su vez lleva consigo a la pérdida de un gran número de especies vegetales y animales, de las cuales la mayor parte son endémicas del país. Otra de las amenazas principales es la sobreexplotación, es decir, la extracción de individuos a una tasa mayor que la que puede ser sostenida por la capacidad reproductiva natural de la población que se está aprovechando.

Una cifra alarmante es saber que México ocupa el tercer sitio a nivel mundial en cuanto a la tasa actual de deforestación, con una superficie anual estimada de 800 000 hectáreas deforestadas (Maser *et al.*, 1992; citado por Toledo, 1994). El crecimiento de la población, la presión sobre los recursos naturales disponibles, la ganadería, el desarrollo industrial, la construcción de carreteras y caminos, la mala administración y deficiente planificación, así como la falta de estudios de impacto ambiental han contribuido en forma considerable a este proceso de destrucción (Forero, 1994).

Desde el punto de vista ecológico, los hábitats naturales más afectados son los bosques mesófilos de montaña, los manglares y sobre todo las selvas altas y medianas del trópico húmedo, reducidas al 10% de su distribución original (Toledo, 1988). En las últimas cuatro décadas, ha desaparecido casi el 30 por ciento de los bosques naturales y se han fragmentado a niveles críticos las poblaciones de flora y fauna silvestres, se han desecado los cuerpos de agua superficiales y se ha reducido la capacidad de recarga de los acuíferos del subsuelo, de donde se aporta hasta el 75 por ciento del agua que se consume en la Ciudad de México. La velocidad a la que se documenta la diversidad biológica, es inferior a la velocidad de la pérdida de poblaciones animales y vegetales y a la velocidad de extinción de las especies (Velásquez, 1999).

2.4 Consecuencias de la pérdida de la biodiversidad

La pérdida de la biodiversidad tiene graves consecuencias para la humanidad, la extinción de especies, es uno de los efectos más importantes, aun cuando la extinción es un proceso natural, ésta se debe principalmente a procesos antropogénicos. La tasa de extinción actual es muy superior a la tasa evolutiva, y el tiempo requerido para la recuperación de la biodiversidad sobrepasa por mucho la escala de tiempo histórico de la especie humana (Raup, 1979; Wilson, 1985; citados por García *et al.*, 2004).

Por otra parte, la transformación de un ecosistema conlleva a un desequilibrio en los ciclos hidrológicos, energéticos, provoca erosión, contaminación y otras consecuencias de carácter ecológico estricto, lo cual biológicamente hablando, significa la desaparición irreversible de genotipos que son el resultado de un proceso evolutivo desarrollado durante millones de años, e implica también una reducción en las probabilidades de utilización de la variabilidad vegetal (Caballero, 1990; citado por Álvarez, 1993). La rápida destrucción de los ecosistemas más diversos del mundo, especialmente en los trópicos, ha llevado a la conclusión de que probablemente una cuarta parte de la totalidad de la diversidad biológica del planeta está en serio peligro de extinción durante los próximos 20-30 años (oregon.conevyt.org.mx/actividades/diversidad/lectura_biodiversidad.htm).

Además, la pérdida de la biodiversidad reduce la capacidad de los ecosistemas de suministrar los bienes y servicios que generan beneficios económicos, agrícolas, culturales y de salud pública. Si continúa la tasa anual de pérdida de vegetación natural de 1.5 millones de hectáreas, los 80 millones de hectáreas con áreas sin disturbio que en teoría existían en la década de los setenta, se verían reducidas a 65 en 1990, a 50 en el año 2000 y a 35 en el 2010, lo cual significa que el país vería reducida su vegetación natural a 32.5% del total de su territorio en diez años, a 25% en veinte y a sólo 17.5% en tres décadas (Toledo, 1988). Así mismo, Raven (1987), señala en los próximos 40 años aproximadamente el 25% de las 250 000 especies de plantas vasculares que existen en el mundo, se extinguirán si continúan las tasas actuales de destrucción de los ecosistemas naturales. Si esta tendencia sigue, la humanidad alterará dramáticamente todos los ecosistemas naturales que aún permanecen en la Tierra dentro de pocas décadas. Por ello, es claro que debemos buscar alternativas enfocadas a la conservación y manejo sustentable de los recursos naturales de México, para evitar o aminorar la tendencia actual hacia la pérdida continua de la diversidad biológica.

2.5 Familia Orchidaceae

Las orquídeas representan taxonómicamente a la familia más evolucionada entre las monocotiledóneas, además de encontrarse entre las familias más grandes de plantas con flores, pertenecen a la Familia Orchidaceae, Clase Monocotyledonae (Dressler, 1981). El nombre de orquídea deriva de *orquis*, nombre genérico, en griego *orchis*, que significa testículos, en alusión a los dos tubérculos subterráneos de ciertas orquídeas terrestres nativas de la Grecia antigua (Téllez, 2003). Es una de las familias más grandes y diversas del reino vegetal, se estiman entre 20 y 25 mil especies agrupadas en más de 700 géneros en el mundo (Dressler, 1981; Arditti, 1992; Dressler, 1993; Espejo *et al.*, 2002). Un dato más reciente sugiere que deben existir entre 20 000 y 30 000 especies (Hágsater *et al.*, 2005). Tan sólo en México, Miguel Ángel Soto (1996), habla de 1 106 especies y subespecies mexicanas descritas, distribuidas en 159 géneros, de las cuales el 40% son endémicas, es decir, aproximadamente 444 especies. La diversidad de orquídeas en México es resultado de su ubicación geográfica a ambos lados del trópico de Cáncer y a su compleja historia geológica y climática que ha permitido el arribo de especies migrantes tanto de Norteamérica como de Sudamérica (Hágsater *et al.*, 2005).

Su principal utilidad es como plantas de ornato por la innegable belleza y complejidad de sus flores (Cabrera, 1999). Sin embargo, en México, desde las épocas prehispánica, colonial y hasta la actual, se reportan orquídeas con un uso tanto medicinal, artesanal, comestible, narcótico, saborizante, como veneno, adhesivo, usos con fines ceremoniales, mágico-religiosos, talismanes y afrodisíacos (Téllez, 2003). Algunas especies, como *Vanilla planifolia*, han sido objeto de cultivo desde la época prehispánica hasta nuestros días, para la extracción de la esencia aromática conocida comercialmente como vainilla. Otras especies se han usado de manera tradicional para la elaboración de dulces, como pegamento o para curar algunas heridas o enfermedades (Cabrera, 1999). Por ejemplo, en la época precortesiana para la elaboración de la vestimenta de los emperadores aztecas, como las capas y mantos reales, penachos, adornos para los brazos y piernas, se confeccionaban abanicos y escudos ceremoniales. Las orquídeas usadas para estos fines fueron *Bletia campanulata* Llave y Lex., *Bletia coccinea* Llave y Lex., *Laelia speciosa* (HBK) Schltr., *Laelia autumnalis* Lindl., entre otras (Téllez, 2003).

2.5.1 Clasificación

En la actualidad la evidencia molecular sugiere que esta familia está constituida por cinco subfamilias o linajes principales: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae, de las cuales solamente cuatro de ellas están presentes en México, excepto la subfamilia Apostasioideae, que se encuentra únicamente en el sureste asiático (Cameron *et al.*, 1999; citado por Soto y Salazar, 2004). La subfamilia Vanilloideae comprende 15 géneros y unas 250 especies, la mayoría de ellas son tropicales. En México esta subfamilia está representada sólo por el género *Vanilla*, que incluye a la vainilla (*V. planifolia*). La subfamilia Cyripedioideae conocidas popularmente como “orquídeas zapatilla”, también tienen una amplia distribución, aunque se encuentra ausente en África y Australia, está representada por cinco géneros y 155 especies, de los cuales tres se encuentran en México. La subfamilia Orchidoideae abarca unos 210 géneros y cerca de 5 000 especies que están representadas en todas las regiones habitables del planeta. En México muchas especies terrestres pertenecen a este grupo. La subfamilia Epidendroideae (a la cual pertenece la especie a estudiar) es la más diversa, tanto en número de especies y géneros como en hábitos y formas de vida, intervalo de tamaños y estrategias reproductivas, la mayoría son especies epífitas (Hágsater *et al.*, 2005).

2.5.2 Distribución

Es una familia cosmopolita, debido a que se distribuye en todo el mundo, excepto en regiones polares o en zonas extremadamente desérticas. Alcanza su mayor diversidad en las regiones tropicales, siendo América Tropical la región con mayor número de especies. El 56% del total mundial de orquídeas (10 849 especies) se encuentran en los trópicos (UICN/ SSC Orchid Specialist Group, 1996). En México, están ampliamente distribuidas, pero son más abundantes y diversas en los bosques húmedos que se concentran en la parte sur del país (Soto y Salazar, 2004), mientras que la porción norte es la más pobre en cantidad y diversidad. Se encuentran principalmente en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, Michoacán, sur de Puebla y San Luis Potosí (Martínez 1991). En el ámbito nacional, en los bosques mesófilos de montaña existe una gran abundancia de especies y endemismos de orquídeas (Toledo y Ordóñez,

1998), sin embargo, el hábitat más rico en especies es probablemente la selva baja perennifolia de la región de Montebello, Chiapas (Soto y Salazar, 2004).

2.5.3 Hábitos de crecimiento

Presentan dos diferentes hábitos de crecimiento: monopodial y simpodial. El primero se caracteriza, porque el desarrollo ocurre mediante la extensión vegetativa a partir de un meristemo apical, que da lugar a un solo tallo o eje principal (monopodio) de crecimiento indefinido, provisto en toda su longitud de raíces adventicias con inflorescencias siempre laterales en la axila de las hojas y opuestas a éstas. Entre las orquídeas mexicanas que presentan este tipo de crecimiento se encuentran las vainillas, los géneros *Campylocentrum*, *Dendrophylax* y *Dichaea*, y algunas especies de *Epidendrum*. A nivel mundial los géneros *Vanda* y *Phalaenopsis*, también presentan este tipo de crecimiento (**Fig. 1a**). El crecimiento simpodial presenta un tallo o pseudobulbo de crecimiento definido, el eje está formado por una serie de vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemos o yemas de renuevo situadas basal, lateral o apicalmente en el vástago anterior; el conjunto de vástagos forma un eje compuesto (simpodio), en cuya base tras un período de reposo, nace un nuevo tallo, las inflorescencias se originan lateral o terminalmente. La mayor parte de las orquídeas epífitas y terrestres mexicanas, son simpodiales (**Fig. 1b**) (Dressler, 1981; Barba *et al.*, 2002; Hágsater *et al.*, 2005).

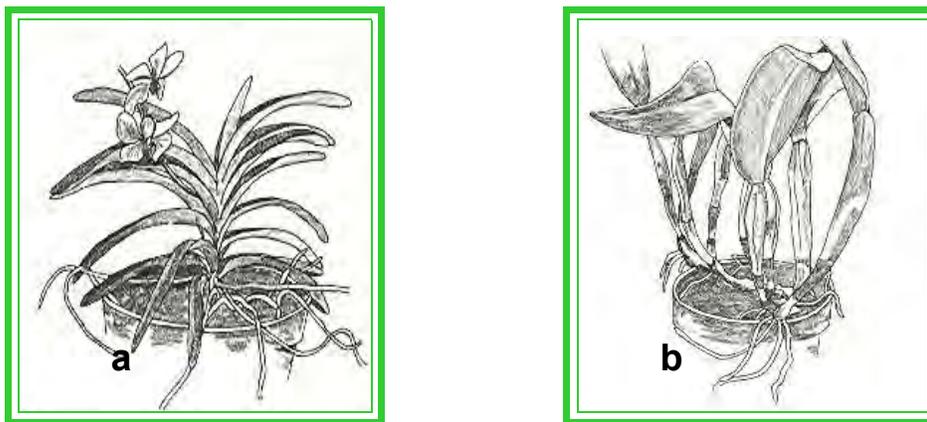


Figura 1. Hábitos de crecimiento en las orquídeas. a) Crecimiento monopodial (género *Vanda*), b) Crecimiento simpodial (género *Cattleya*) (Clark, 1977).

2.5.4 Formas de vida

Las podemos encontrar creciendo directamente sobre el suelo (terrestres), las cuales por regla general, provienen de zonas con una época de sequía, donde existe poca humedad ambiental o donde en el invierno se registran temperaturas inferiores a los 0° C. Las orquídeas terrestres poseen órganos de reserva subterráneos como raíces engrosadas, rizomas, cormos o tubérculos; para almacenar agua y sustancias elaboradas que les permiten sobrevivir en periodos críticos. También podemos encontrar orquídeas creciendo sobre otra planta, principalmente árboles, a las cuales se les conoce como epífitas, o bien creciendo sobre rocas (rupícolas), o sobre las hojas muertas del suelo (saprófitas), alimentándose de materia orgánica en descomposición depositada en el suelo (Clark, 1977; Cabrera 1999). Las epífitas sólo necesitan un soporte proporcionado por un árbol hospedero, humedad y la luz de su hábitat natural. La mayoría de las orquídeas se han adaptado a vivir como epífitas, éstas presentan un sistema radical modificado por una cubierta de células esponjosas llamado velamen, que les permite absorber nutrientes del aire, del agua de lluvia y los dispuestos en los troncos de los árboles. Presentan además un avanzado sistema de almacenamiento de agua y nutrientes: pseudobulbos, lo cual ha contribuido a su éxito en la lucha por la supervivencia (Dressler, 1981; Arditti, 1992; Sarmiento y Romero, 2000). Arditti (1992), señala que de todas las especies de orquídeas a nivel mundial, aproximadamente el 25% son terrestres, 70% epífitas y 5% corresponde al resto.

2.5.5 Características

Las orquídeas son plantas herbáceas cuya estructura básica es similar a la de muchas otras monocotiledóneas: haces vasculares dispersos, venación foliar paralela, partes florales en múltiplos de tres, ovario ínfero, entre otras (Dressler, 1981). Se consideran como la familia más evolucionada dentro del reino vegetal, ya que presentan una gran complejidad y especialización en su morfología floral y en sus tipos de polinización. Además, existen dentro de la familia muy diversas formas de vida, y desde el punto de vista ecológico muchos de sus integrantes son componentes importantes en diversos tipos de vegetación (Espejo *et al.*, 2002).

Lo más espectacular de estas plantas son sus flores, cuya indiscutible belleza e impresionante gama de colores y formas ha generado admiración a lo largo de la historia

y han sido objeto de numerosos estudios. Pueden estar agregadas en racimos, panículas, espigas, corimbos, umbelas o cabezuelas; aunque en ocasiones, son producidas de manera individual, como en las especies de los géneros *Maxillaria* y *Lycaste* (Cabrera, 1999). Las inflorescencias pueden originarse casi a cualquier altura en el tallo o pseudobulbo, aunque en la mayor parte de los géneros aparecen ya sea en la base (por ejemplo, *Oncidium*, *Rhynchostele*) o en el ápice (*Laelia*, *Prostechea* y algunos *Epidendrum*) (Hágsater *et al.*, 2005).

Las flores presentan simetría bilateral, aunque en el género *Mormodes*, la simetría se ve alterada por la torsión o flexión de la columna, el labelo o ambos. Todas poseen tres sépalos y tres pétalos, uno de los pétalos, llamado labio o labelo, es distinto a los demás, puede ser más grande, más largo o más pequeño, con color diferente o poseer una complicada gama de manchas y tonos que lo hacen distinguirse fácilmente, además de que puede presentar engrosamientos o áreas que producen néctar, compuestos aromáticos o pseudopolen (**Figs. 2a y b**). La función del labelo es ayudar a la polinización. Las flores de las orquídeas son hermafroditas, además de que ambos sexos se encuentran parcialmente fusionados formando una sola estructura llamada columna o ginostemio, ubicada al centro de la flor, en la porción superior suele estar la parte masculina que produce el polen, el cual se encuentra empaquetado en masas compactas llamadas polinios, las cuales en su base, suelen tener un pequeño disco adhesivo que facilita su transporte y previene pérdidas en el trayecto entre flores. Inmediatamente por debajo se encuentra la parte receptora femenina, el estigma, separada de la masculina por una barrera llamada rostelo, cuya función es evitar que el polen caiga en su misma flor (**Fig. 2c**). La parte adhesiva puede estar pegada al polinario, constituyendo un viscidio, o producir una sustancia viscosa que sólo entra en contacto con los polinios mediante la intervención del polinizador. El número de polinios en una flor varía, dependiendo del grupo, entre dos y ocho (a veces hasta 12). La unidad de dispersión que incluye los polinios y, en muchos casos, estructuras accesorias para pegarlos a los polinizadores, se conoce como polinario (Dressler, 1981; Dressler, 1993; Sarmiento y Romero, 2002; Hágsater *et al.*, 2005). La finalidad de las flores es ser polinizadas, para formar un fruto que producirá semillas que darán origen a nuevos individuos y así lograr la continuidad de la especie mediante la reproducción sexual, por lo que la flor alberga los órganos reproductores tanto masculinos como femeninos. La polinización en estas plantas es cruzada, es decir, hay transferencia del polen (polinios) entre la antera de una flor hacia el estigma de otra flor de la misma especie, aunque también existen algunas especies de orquídeas que se autopolinizan (Catling, 1990; citado por Hágsater *et al.*,

2005). Son polinizadas principalmente por insectos como abejas y avispas, diversas clases de moscas y mariposas diurnas y nocturnas y también por aves como los colibríes (Sarmiento y Romero, 2002).

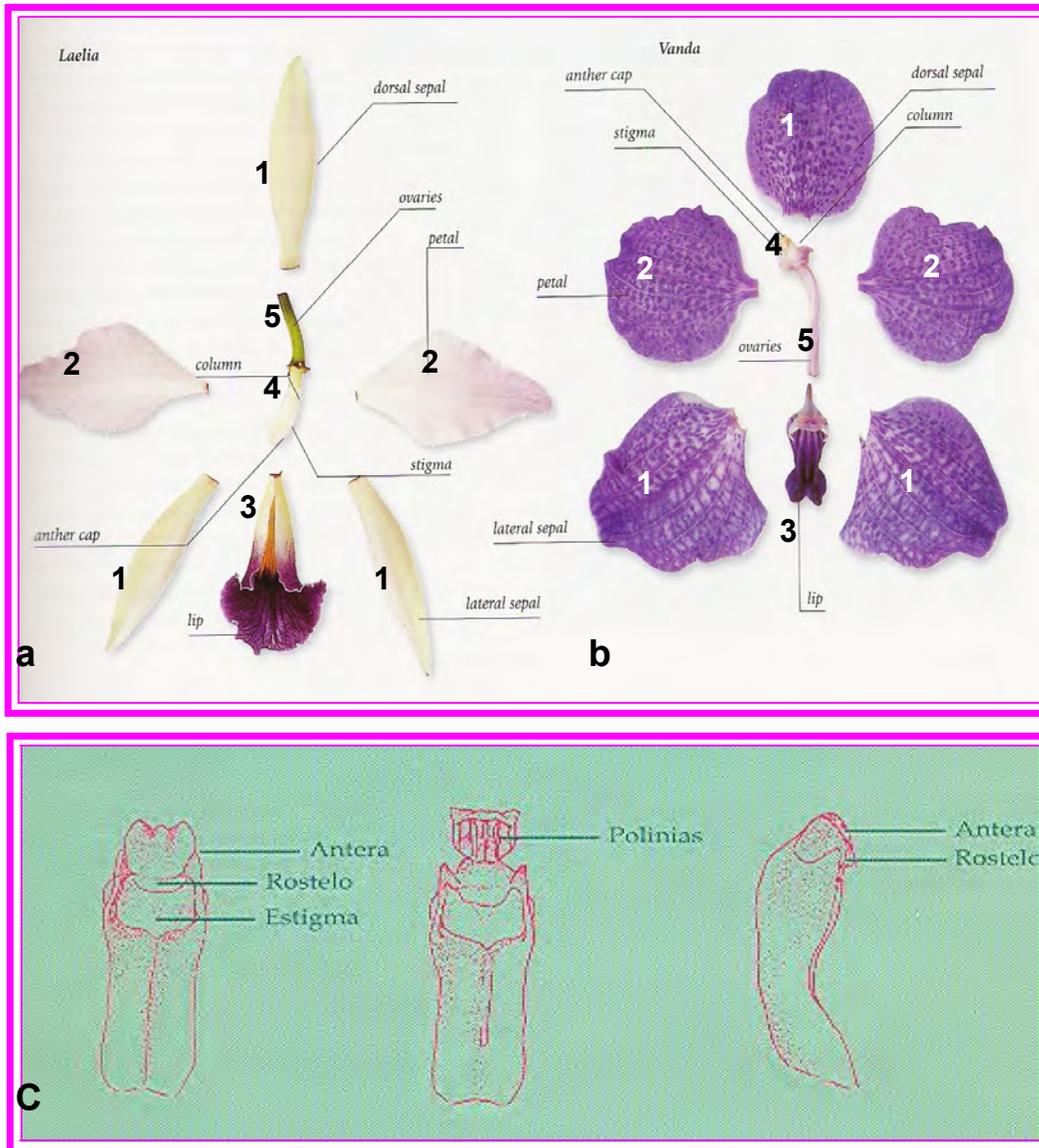


Figura 2. Estructura de la flor en orquídeas. a) Morfología del género *Laelia*, b) Morfología del género *Vanda*. 1) Sépalos, 2) Pétalos, 3) Labio o labelo, 4) Columna, 5) Ovario. Tomado de Rittershausen & Rittershausen, 2001. c) Estructura de la columna. Tomado de Cabrera, 1999.

2.5.6 Semillas

Una vez que ocurre la polinización de las flores, se desarrolla el fruto, que en las orquídeas se conoce como cápsula, en cuyo interior se encuentran las semillas, las

cuales son extremadamente pequeñas (se les conoce como “semillas de polvo”). Tienen un peso promedio de 3 a 14 μg y miden de 0.4-1.25 mm de longitud y de 0.08-0.27 mm de ancho. Algunas especies pueden producir 1300 semillas por cápsula, mientras que otras pueden contener aproximadamente 4 millones (Chávez, 1980; Arditti, 1992). Las semillas consisten de un pequeño embrión esférico, que se encuentra suspendido dentro de una testa membranosa generalmente transparente, constituida por una sola capa de células (Arditti, 1992). Estructuralmente se pueden distinguir dos grupos principales de semillas en las orquídeas; un grupo constituido por especies que presentan embriones relativamente diferenciados que incluyen un cotiledón rudimentario, como por ejemplo *Sobralia macrantha* Lindl. y *Bletilla hyacinthina*, las cuales algunas veces son más fáciles de germinar; mientras que, el otro de grupo se caracteriza porque las semillas son indiferenciadas, sin cotiledones y sin endospermo (Arditti, 1967). Sin embargo, el embrión contiene reservas energéticas aunque en cantidad limitada, que están presentes como pequeños gránulos de almidón y gotas de lípidos. Los embriones son pequeños cuerpos elipsoidales que pueden medir entre 0.058 y 0.1 mm de ancho por 0.150 y 0.300 mm de largo, ocupando sólo una porción muy pequeña del espacio interno de la semilla, por lo que éstas consisten de 70 a 95% de aire, lo cual les proporciona gran flotabilidad por largos periodos de tiempo y la capacidad de dispersarse a grandes distancias (Arditti, 1992; Barba *et al.*, 2002).

2.5.7 Germinación

La germinación y desarrollo de plántulas en las orquídeas, es un proceso extraordinariamente diferente de otras familias de plantas con flores (Harrison, 1977).

A pesar de la gran cantidad de semillas que se producen, éstas prácticamente carecen de reservas nutritivas. Por tanto, en la naturaleza el embrión de las orquídeas necesita establecer una relación simbiótica con un hongo micorrízico que sirva como fuente de energía, para que se pueda iniciar la germinación de las semillas y promover su desarrollo hasta dar lugar a la formación de una plántula. De esta forma, durante la germinación la mayor parte de las orquídeas son micoheterótrofas obligadas (Rasmussen, 1998). Una vez que la semilla madura y sale de la cápsula, si llega a un ambiente con las condiciones fisicoquímicas y de humedad adecuadas, en el que además se encuentre el hongo apropiado, la germinación se inicia cuando el embrión absorbe agua a través de la cubierta seminal y como consecuencia aumenta de tamaño, debido al incremento en el

volumen de sus células. Después se inicia la división celular en la región anterior, lo que provoca la ruptura de la cubierta seminal, dando lugar a una estructura cónica esférica llamada protocormo. Éste continúa su desarrollo, hasta que se hace evidente el primer primordio foliar como una pequeña protuberancia, llamada también región del promeristemo. La organización de este promeristemo puede ser en la región apical del embrión o bien desarrollarse lateralmente. Sobre la superficie inferior del protocormo, rodeando su periferia, aparecen pelos absorbentes o rizoides. Posteriormente, la raíz verdadera se desarrolla en la porción media o basal del protocormo, generalmente después de la formación de algunas hojas, dando como resultado el desarrollo paulatino de una plántula (**Fig. 3**). En la mayor parte de las orquídeas, la germinación ocurre de esta forma (Arditti, 1967; Dressler, 1981; Luna, *et al.*, 2004).

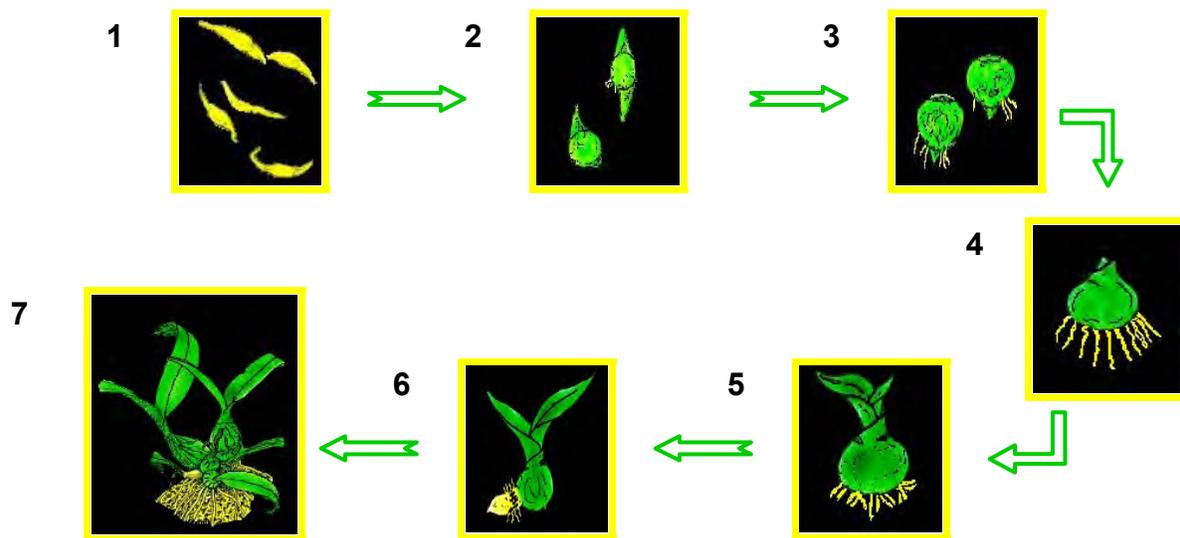


Figura 3. Etapas de desarrollo durante la germinación de las semillas de una orquídea epífita (*Dendrobium*). 1) Semillas sin germinar, 2) Embrión hidratado con ruptura de testa, 3) Protocormo con rizoides, 4) Protocormo con primordio de hoja, 5) Plántula con hojas, 6) Plántula con la aparición de la primer raíz, 7) Planta completa. Tomado de Luna *et al.*, 2004.

2.5.8 Micorrizas

En 1824, Heinrick Friedrich Link observó la presencia de hongos en las raíces de las orquídeas, pero no los reconoció como micorrizas. Hasta 1885, Albert Bernhard Frank acuñó el término micorriza para describir la asociación simbiótica establecida entre los hongos y las raíces de las plantas, particularmente en orquídeas. En 1886, H. Warlich examinó un gran número de orquídeas y observó que todas las raíces estaban infectadas

por hongos, por lo que estableció el hecho de que las micorrizas son universales en la familia Orchidaceae. Sin embargo, es hasta 1899 cuando, Noel Bernard descubrió el papel y la importancia del hongo micorrízico como indispensable para iniciar y promover la germinación en semillas de orquídeas (Arditti, 1992).

La simbiosis entre las orquídeas y el hongo comienza con la penetración de una hifa al embrión a través del suspensor (Clements, 1988; Peterson *et al.*, 1998; citados por Castillo, 2002). La infección se restringe a una zona en la parte inferior del embrión en crecimiento, que como resultado de divisiones celulares forma un cuerpo más voluminoso llamado protocormo. Las hifas crecen formando pelotones que después son digeridos. Posteriormente, las células del protocormo empiezan a diferenciarse para dar lugar a tallos, hojas y raíces (o rizoides) y es capaz de vivir de manera autónoma (Hágsater *et al.*, 2005). Los pelotones, ovillos o cordones hifales son los sitios en donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses. Estas estructuras tridimensionales se originan a partir de una hifa que penetra la pared celular vegetal y se divide invaginando la membrana celular, por lo que el hongo no tiene contacto con el citoplasma del hospedero (Castillo, 2002).

La mayoría de los hongos micorrízicos que establecen una relación simbiótica con el embrión de las orquídeas, pertenecen al género *Rhizoctonia*. El papel de los hongos, es proporcionar nutrientes tales como carbohidratos (azúcares), polisacáridos (almidón), minerales y otras sustancias aún no identificadas, que proveen al embrión del alimento que requieren las semillas para poder germinar y crecer, mientras que los hongos obtienen por parte de la planta, vitaminas, hormonas vegetales y algunos productos de carbono, sin embargo, esta evidencia no es conclusiva (Arditti, 1992). Como las micorrizas están adaptadas a sustratos y condiciones químicas muy específicas, las orquídeas también se encuentran limitadas a ciertos hábitats específicos. Esto explica en parte, porque algunas especies se encuentran en nichos ecológicos muy limitados (IUCN/SSD Orchid Specialist Group, 1996).

2.5.9 Problemática para su conservación

Debido a la belleza, rareza y elegancia de sus flores, y a la enorme variedad de especies y formas que comprenden, las orquídeas se encuentran entre las plantas más apreciadas dentro del reino vegetal, lo cual a su vez ha conducido a que la familia Orchidaceae, sea una de las más vulnerables a la extinción, como resultado directo o indirecto de dos tipos de actividades humanas, tales como la destrucción y transformación

de sus hábitats, derivada de un cambio en el uso de la tierra y la extracción masiva de plantas de las poblaciones silvestres para su comercio ilegal. (UICN/SSC Orchid Specialist Group, 1996). Aunado a estos factores, se sabe que las especies presentan bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales. El grado con el cual estos factores afectan a cada especie de orquídea, varía de acuerdo a su distribución geográfica, especificidad del hábitat y tamaño de la población (Ávila y Oyama, 2002). Por ejemplo, *Laelia speciosa* es una de las orquídeas que presenta un ciclo de vida muy lento. En un estudio realizado por Hernández (1992), reporta que una plántula de esta especie necesita en promedio de 16 a 19 años para florecer por primera vez, aunque este período juvenil puede extenderse en total entre 9 y 32 años. Las plantas no florecen cada año, aunque las más viejas sí pueden hacerlo y se ha observado que puede llegar a vivir hasta 56 años.

La alteración de los hábitats naturales, se reconoce como la principal amenaza para la biodiversidad. Este problema tiene dimensiones a nivel mundial, sin embargo alcanza niveles dramáticos en los trópicos, en donde la diversidad de orquídeas es mayor (UICN/SSC Orchid Specialist Group, 1996). Entre los factores que alteran el hábitat natural, de la mayor parte de estas plantas se encuentran: la deforestación, que se debe principalmente a la ganadería, la agricultura y la producción forestal, los incendios forestales, el crecimiento urbano desordenado, los asentamientos humanos irregulares, la contaminación del aire, el agua y el suelo, la industria extractiva del petróleo y la petroquímica, la desecación de humedales, el establecimiento de grandes presas y complejos hidroeléctricos y el cambio climático global (Hágsater *et al.*, 2005).

Más del 10% de la riqueza de orquídeas con que cuenta México está en peligro de extinguirse. Tan solo en los dos últimos siglos se tiene registrada la extinción de dos especies de orquídeas en nuestro país y a partir de 1998, se han extinguido al menos 22 más. Ejemplo de esto es *Laelia gouldiana*, especie endémica mexicana, la cual está prácticamente desaparecida en la naturaleza (Sarmiento y Romero, 2002). Se prevee que esta tendencia siga en aumento como reflejo de la problemática ambiental y social que enfrenta el país. Por otra parte, la disminución de las poblaciones de muchas especies de orquídeas es muy significativa y si bien tal vez éstas no lleguen a extinguirse, seguramente se continuará perdiendo una parte importante de su variación genética y, con ella, la capacidad de sobrevivencia de las especies (Hágsater *et al.*, 2005).

2.5.10 Estrategias para su conservación

A nivel mundial la mayor parte los países han establecido leyes para la protección de su flora y fauna silvestres (Dressler, 1981). En el mundo de las orquídeas, una de las legislaciones principales para asegurar la conservación y regular el comercio internacional de especies silvestres susceptibles a la extinción, fue la creación de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES), la cual fue fundada en Washington D. C., en 1973 con la firma de 21 países y, para Junio de 1995, 128 países ya eran miembros de la convención. México se incluye hasta 1999, fecha en la cual son 145 países los que la constituyen. El CITES no prohíbe completamente el comercio de la fauna y flora silvestres, sino que, lo regula con el objetivo de evitar que lleguen a extinguirse estas especies como resultado de su explotación no sustentable (UICN / SSC Orchid Specialis Group, 1996). Rodan y Campbell (1996), señalan que la regulación del comercio internacional de estas especies, no sólo dependerá de la cooperación del país de procedencia de las mismas, sino también de la cooperación de los consumidores.

Alrededor de unas 5,000 especies de animales y 28,000 especies de plantas están amparadas por la CITES contra la explotación excesiva debido al comercio internacional. Así, la Convención establece que las especies amenazadas cuyo comercio es regulado, deben ser colocadas en tres apéndices, en donde se agrupan para ofrecer diferentes niveles y tipos de protección. En el apéndice I se incluyen las especies de animales y plantas con un alto riesgo de extinción, su comercio está prohibido, excepto en condiciones especiales, por ejemplo, con fines de investigación científica. En el Apéndice II se incluyen especies que no están amenazadas de extinción, pero que podrían llegar a estarlo si su comercio no es regulado estrictamente, por lo que se requiere tramitar un permiso de exportación para su comercio. En el Apéndice III se incluyen las especies que pueden estar amenazadas de extinción a nivel local, debido a una sobreexplotación comercial, y que no se incluyen en los apéndices I o II (Ayensu y Defilipps, 1981; Rodan y Campbell, 1996).

En el apéndice I, se incluyen las especies de orquídeas más amenazadas, que son: *Aerangis ellisii*, *Dendrobium cruentum*, *Laelia jongheana*, *Laelia lobata*, *Peristeria elata*, *Renanthera imschootiana* y los géneros *Paphiopedilum* y *Phragmipedium*, mientras que en el apéndice II se incluye al resto de la familia Orchidaceae (www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/cites/doctos/acerca_cites.html).

Por otra parte, México cuenta con una Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), que establece las bases para la protección de las áreas naturales y de la flora y fauna silvestres y acuáticas, así como el aprovechamiento general de los elementos naturales de manera que sea compatible la obtención de beneficios económicos con el equilibrio de los ecosistemas, estableciendo a su vez que el aprovechamiento de los recursos naturales se realice de manera que asegure la diversidad biológica (Conabio, 1998). Así mismo, existe una Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001), que protege legalmente las especies y subespecies de flora y fauna silvestre, terrestres y acuáticas, en peligro de extinción, raras, amenazadas y sujetas a protección especial, y dentro de estas categorías, las endémicas dentro de la República Mexicana, estableciendo también las especificaciones para su protección. Además, regula el aprovechamiento, posesión o uso a nivel de especies y hábitats, aunque no abarca aspectos genéticos de la diversidad biológica. Actualmente 181 especies de orquídeas están incluidas dentro de esta norma, en alguna categoría de riesgo: se considera que una especie se encuentra extinta en el medio silvestre, 15 especies están catalogadas en peligro de extinción, 58 amenazadas (entre ellas *Euchile mariae*) y 107 sujetas a protección especial (SEMARNAT, 2002), ejemplos de estas orquídeas son las que se muestran en la **Tabla 1**.

Sin embargo, aun existen vacíos legales como la normatividad en el uso de las especies que no están incluidas dentro de alguna categoría de riesgo, la regulación de viveros, de colecciones y el manejo de especies exóticas. En la práctica, existe una supervisión excesiva de las personas, empresas e instituciones establecidas, mientras que la supervisión es nula en el caso de los colectores y vendedores ilegales (Hágsater *et al.*, 2005).

Tabla 1. Algunas orquídeas endémicas de México incluídas dentro de la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002)

| Especie | Categoría de riesgo | Endemismo |
|---------------------------------|----------------------------|------------------|
| <i>Euchile mariae</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Barkeria melanocaulon</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Bletia urbana</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Clowesia rosea</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Cuitlautzina pendula</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Encyclia adenocaula</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Cuitlauzina pendula</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Encyclia adenocaula</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Oncidium stramineum</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Oncidium tigrinum</i> | Amenazada | Endémica |
| <i>Barkeria scandens</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Barkeria skinneri</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Clowesia glaucoglossa</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Encyclia atrorubens</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Encyclia pollardiana</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Euchile citrina</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Habenaria umbratilis</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Laelia speciosa</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Rhynchostele galeottiana</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Vanilla planifolia</i> | Protección especial | Endémica |
| <i>Encyclia kienastii</i> | Peligro de extinción | Endémica |
| <i>Laelia anceps dawsonii</i> | Peligro de extinción | Endémica |
| <i>Mexipedium xerophyticum</i> | Peligro de extinción | Endémica |
| <i>Mormodes uncia</i> | Peligro de extinción | Endémica |
| <i>Laelia gouldiana</i> | Extinta | Endémica |

2.6 *Euchile mariae* (Ames), Withner

Euchile mariae es una orquídea epífita y endémica de México, que actualmente se encuentra catalogada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) como una especie amenazada (SEMARNAT, 2002), debido a que sus poblaciones silvestres están siendo afectadas por las actividades humanas, principalmente por la colecta ilegal y la destrucción de su hábitat debida a la deforestación para la construcción de potreros (com. personal Vega, 2006).

2.6.1 Ubicación taxonómica (Dressler y Pollard, 1974).

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsidae

SUBCLASE: Liliidae

ORDEN: Orchidales

FAMILIA: Orchidaceae

SUBFAMILIA: Epidendroideae

TRIBU: Epidendreae

SUBTRIBU: Laeliinae

GÉNERO: *Euchile*

ESPECIE: *Euchile mariae* (Ames), Withner.

2.6.2 Descripción botánica

De acuerdo con Soto (2002), la descripción botánica de *Euchile mariae* es la siguiente: **Hierba epífita**, cespitosa, ascendente, de 17-25 cm de alto incluyendo la inflorescencia. **Raíces** subteretes, flexuosas, blanquecinas, de 0.8-2.5 mm de grosor. **Rizoma** abreviado, oculto, hasta de 8 mm de largo entre pseudobulbos contiguos, 6 mm de grosor. **Pseudobulbos** agrupados, cónico-ovoides a subglobosos, verde glauco, de 20-61 mm de alto, 13-28 mm de grosor; cuando jóvenes cubiertos por vainas fibrosas, fugaces, blanquecinas, hasta de 42 mm de largo. **Hojas** apicales, 2-3, oblongas o elíptico-oblongas, agudas, conduplicadas en la base, coriáceas, glaucas, carinadas en el envés, de 7-18.5 x 1.5-3.1 cm. **Inflorescencia** un racimo corto, erectoarqueado, de 5-27 cm de largo, 1.5-3 mm de grosor, con 1-5 flores; pedúnculo de 4-18 cm de largo, rollizo, con 2-4 brácteas triangulares, agudas, amplexicaules, escariosas, blanquecinas, de 4-6 x 3-6 mm. **Brácteas** florales abrazadoras, triangulares, agudas, escariosas, blanquecinas, de 2-7 x 2-3 mm. **Ovario** glabro, subterete, engrosado hacia el ápice, sulcado, de 20-35 mm de largo, 2.5-3 mm de grosor; cunículo aparentemente seco, penetrando casi de 4 mm en el ápice del ovario. **Flores** algo péndulas, grandes, de aprox. 5-7 cm de diámetro, tépalos subiguales, carnosos, cerosos, verde claro, verde olivo o verde amarillento, la superficie dorsal glauca, labelo blanco, de textura débil, con venas de color verde en la garganta y el disco; fragancia débil. **Sépalos** extendidos, frecuentemente recurvados en los ápices, 7-9-nervados; el dorsal elíptico a oblanceolado, obtuso o agudo, de 33-45 x 7-12 mm. Sépalos

laterales elípticos a oblanceolados, obtusos o agudos, de 31-44 x 7-12 mm. **Pétalos** extendidos, oblanceolados o elíptico-oblanceolados, agudos, 7-nervados, de 33-43 x 5-9.5 mm. **Labelo** de 47-75 x 30-51 mm, libre de la columna, panduriforme, formando dos lóbulos; más de la mitad del lóbulo basal infundibuliforme, envolviendo a la columna, con los márgenes sobrepuestos sobre ella, sus ápices y el lóbulo distal extendido-deflexos, ápice del lóbulo distal profundamente marginado, los márgenes ondulado-plegados; callo formado por 2 quillas longitudinales, de 18-30 mm de largo, que limitan un canal angosto. **Columna** de 17-21 mm de largo, 6-8 mm de ancho, recta, gruesa y masiva, trígona, el ápice con los márgenes ventrales proyectados, verticales, ampliamente flabelados pero sin formar alas definidas; con 2 quillas longitudinales prominentes en la superficie ventral y otras 2 quillas muy engrosadas, rugosas, en los márgenes basales, de aproximadamente 7 mm de largo; el clinandrio con 3 dientes carnosos, truncados, subiguales, el medio ligeramente más largo, más masivo y dentado-verrucoso. **Cavidad estigmática** transversalmente elíptica-obcordiforme, excavada, los lóbulos laterales prominentes, de 4.5-5 x 4.5-6 mm. **Rostelo** una lámina transversalmente semielíptica, convexa, con una proyección retrorsa donde se encuentra el viscario. Antera transversalmente elipsoide-subcuadrada, algo bilobada, 4-locular, de 2.8 x 2.8 mm. **Polinario** con 4 polinios obovoide-flabelados, lateralmente comprimidos, de aprox. 1.7 x 1.3 mm, unidos a caudículas, muy angostas, granuladas, de casi 3 mm de largo. **Cápsula** elipsoide, trígona, 3-quillada, sin alas, 30-40 x 12-17 mm. Número cromosómico $2n = 40$. (Figura 4).

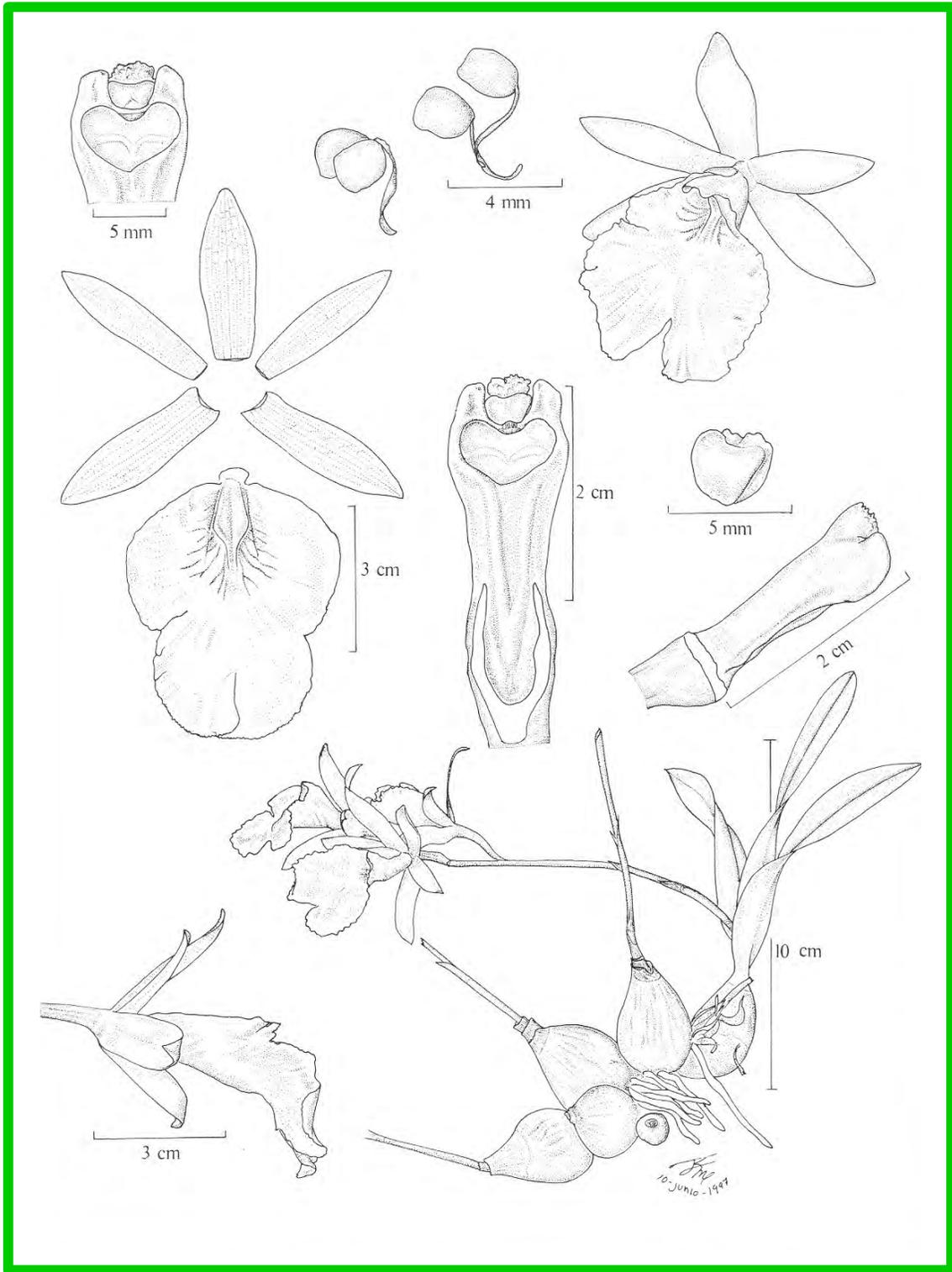


Figura 4. Lámina de *Euchile mariae* (Ames) Whitner, tomado de ICONES ORCHIDACEARUM. 2002.

2.6.3 Distribución geográfica e importancia ecológica

Euchile mariae, se distribuye en la Región Huasteca de la Sierra Madre Oriental, en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Guanajuato, Querétaro, Puebla y Veracruz. Es una especie epífita y endémica de México, abundante en bosques de encino (*Quercus rysophylla*, *Q. germana*) y menos frecuente en bosques de pino-encino y liquidámbar, a una altitud de 800 a 1350 metros sobre el nivel del mar. Con cerca de 150 especies, México es centro de diversidad de los encinos o robles, los cuales se han adaptado a todas las condiciones ecológicas del territorio; que junto con los pinares, son la vegetación más característica de las zonas montañas, templadas y húmedas o subhúmedas del país (Hágsater *et al.*, 2005).

Esta especie ha sido considerada como una de las orquídeas más hermosas de México, debido a que las plantas son pequeñas pero presentan flores muy grandes agrupadas en inflorescencias sencillas, constituidas por 2-4 flores. Los sépalos verdes, el enorme labelo blanco que envuelve la columna y el follaje verde-grisáceo de esta especie la hacen inconfundible (Dressler y Pollard, 1976) (**Fig. 5**). Su época de floración es durante los meses de abril a julio. Se le conoce con el nombre de María. En plantas cultivadas cerca de la Ciudad de México se ha observado que es polinizada por abejorros (Soto, 2002).



Figura 5. a) Planta madura de *Euchile mariae*. b) Inflorescencia de *Euchile mariae*. Barra = 5 cm.

2.6.4 Problemática y estado de conservación

A pesar de la belleza de esta especie y de que su distribución es muy común en la parte Noreste de México, esta orquídea no fue descubierta sino hasta 1937, porque paradójicamente, se encontró en una región cercana a la frontera de Texas, donde nadie había buscado orquídeas (Dressler y Pollard, 1974; Soto, 2002). A partir de entonces, se ha vuelto muy conocida y ha sido altamente apreciada por su valor ornamental (Withner, 1998), lo que ha conducido a que gran parte de estas plantas estén siendo sobrecolectadas para satisfacer la demanda comercial y aunado a esto, existe una continua perturbación de su hábitat natural. Álvarez (1993), señala que el bosque de encino está siendo objeto de rápidos cambios en el uso del suelo, razones por las que *Euchile mariae* actualmente se encuentra catalogada por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002) como una especie amenazada (A), aunque se plantea que quizás deba ser reclasificada como una especie bajo protección especial (PR), ya que su distribución en la parte norte es muy frecuente, pero en las localidades del sur es donde principalmente está siendo severamente afectada por las actividades humanas (Soto, 2002).

2.7 Conservación

La conservación biológica ha surgido en respuesta a la crisis ambiental y a la actual extinción masiva de especies, como una nueva ciencia multidisciplinaria que se ha propuesto dos objetivos centrales: 1) La investigación de los efectos humanos sobre los demás seres vivos, las comunidades biológicas y los ecosistemas y 2) El desarrollo de aproximaciones prácticas para: a) prevenir la degradación del hábitat y la extinción de especies; b) restaurar ecosistemas y reintroducir poblaciones y c) reestablecer relaciones sustentables entre las comunidades humanas y los ecosistemas (Rozzi *et al.*, 2001). Por tanto, las estrategias para la conservación de las especies deben basarse en al menos dos perspectivas: 1) en el conocimiento demográfico del crecimiento y disminución de las poblaciones y 2) en el mantenimiento de su potencial evolutivo (Ackerman, 1998).

De esta manera, la conservación de las especies debe basarse en dos estrategias fundamentales: la conservación *in situ* y *ex situ*, las cuales se deben de trabajar en conjunto, con la finalidad de establecer una estrategia de conservación integral (Falk, 1986; citado por Baltazar, 2004).

2.7.1 Conservación *in situ*

La conservación *in situ* se refiere a la conservación de las especies en sus hábitats naturales (Atwood, 1997). Es considerada como la estrategia de conservación más importante, debido a que permite mantener la variación genética de las especies, sus interacciones con otros organismos y la capacidad para continuar evolucionando. La permanencia de la mayor parte de las orquídeas en la naturaleza, depende en gran medida de la conservación de grandes áreas con ambientes primarios u originales (Hágsater *et al.*, 2005).

En México, se cuenta con un Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SINAP), conformado por ciertas áreas que por su diversidad y características ecológicas son consideradas con especial relevancia en el país y, que se pretende funcionen como verdaderos ejes de conservación y desarrollo sustentable. Las áreas naturales protegidas (ANP's), tienen como objetivos preservar los ambientes naturales representativos de las diferentes regiones biogeográficas y ecológicas del país, así como los ecosistemas más frágiles, para asegurar el equilibrio y continuidad de los procesos evolutivos y ecológicos; asegurar la conservación y el aprovechamiento sustentable de la biodiversidad en sus tres niveles de organización, en particular de las especies en peligro de extinción, amenazadas, endémicas, raras y las sujetas a protección especial; proporcionar un campo propicio para la investigación científica y el estudio de los ecosistemas, y rescatar y divulgar conocimientos que permitan rescatar la biodiversidad nacional (Conabio, 1998).

Sin embargo, la conservación *in situ* de las orquídeas mexicanas y de la biota del país enfrenta graves problemas que deben resolverse. Uno de éstos es que un gran número de regiones importantes para la conservación de la biodiversidad del país no están ubicadas dentro del SINAP, ni tampoco son protegidas por los pobladores locales. Otro problema, es que no existe una vigilancia adecuada de las ANP's, ya que continuamente se registran acciones ilegales como la tala, extracción de especies útiles, invasión de terrenos, ganadería y agricultura en estas zonas (Hágsater *et al.*, 2005).

2.7.2 Conservación *ex situ*

La conservación de especies *ex situ* es la que se desarrolla fuera de su hábitat natural. Se le considera como un complemento a los esfuerzos de conservación *in situ*, debido a que de esta manera es posible preservar parte de la diversidad genética y especies particulares que están en riesgo. Las especies y genes pueden conservarse *ex situ* por distintos mecanismos, como son los bancos de germoplasma y las colecciones de cultivo de tejidos o bien las colecciones de organismos vivos como zoológicos y jardines botánicos (Conabio, 1998). Esta estrategia de conservación presenta dos variantes principales: 1) la propagación y mantenimiento de las especies que ya no pueden subsistir en la naturaleza, y 2) la propagación masiva y subsecuente comercialización de la mayor cantidad de especies, con la finalidad de reducir y desalentar la colecta de plantas en sus hábitats naturales.

En la actualidad, un progreso considerable se ha realizado con la finalidad de establecer protocolos para la conservación *ex situ* de orquídeas, particularmente en lo que se refiere a bancos de semillas y a las técnicas de micropropagación (Cribb *et al.*, 2003).

Desafortunadamente, la conservación *ex situ* es costosa y enfrenta problemas complejos, sobre todo porque el objetivo principal es mantener una especie fuera de su hábitat por periodos muy largos y, a diferencia de la conservación *in situ*, es casi imposible preservar la variación genética y la capacidad evolutiva de las especies, por lo que debe ser vista como una estrategia complementaria de la conservación *in situ* (Hágsater *et al.*, 2005).

No obstante, el cultivo de tejidos vegetales es una excelente herramienta para el estudio, conservación y aprovechamiento sustentable de especies como las orquídeas que se encuentran tan amenazadas en su hábitat natural, por medio de la cual es posible lograr la germinación de semillas y la obtención de un gran número de plantas en tiempos relativamente cortos.

2.8 Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales, comprende un heterogéneo grupo de técnicas que consisten, esencialmente en aislar una porción de la planta, conocida como explante (por ejemplo, protoplasto, célula, tejido, órgano) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido, para lo cual es necesario establecer condiciones de asepsia que permitan mantener los cultivos libres de contaminación (Roca y Mroginski, 1991).

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902, con los intentos realizados por Haberlandt al cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencialidad celular, el cual es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998). La capacidad de cualquier célula vegetal para dividirse, crecer y desarrollarse como un organismo multicelular, hasta constituir una planta completa, es lo que se denomina como totipotencialidad celular (Razdan, 2002). Sin embargo, su hipótesis no pudo ser demostrada en aquel tiempo, debido a que no pudo lograr la división celular, ya que los medios de cultivo que empleaba no incluían reguladores de crecimiento, aún desconocidos en ese entonces. En 1934, White pudo mantener en forma ilimitada el crecimiento de raíces en medios líquidos a partir de ápices de jitomate. Al mismo tiempo se identificó el ácido indolacético (AIA), que posibilitó el mantenimiento indefinido *in vitro* de callos de zanahoria y tabaco. Más tarde, White en 1939, logró la inducción de yemas adventicias *in vitro* a partir del cultivo de callos de *Nicotiana glauca* x *N. langsdorfii*, y Gautheret y Nobecourt, en el mismo año, obtuvo la formación de raíces adventicias a partir de callo de zanahoria (*Daucus carota*). Estos experimentos respaldaron indirectamente la teoría de la totipotencialidad celular. Posteriormente, y en forma simultánea, Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958), reportaron la formación de embriones somáticos (embriones adventicios originados en células somáticas) originados a partir de células aisladas, con lo que se demostró la totipotencialidad de las células vegetales (Litz y Jarret, 1991).

De acuerdo con Pérez (1999), los aspectos fundamentales para lograr el éxito en un sistema de cultivo de tejidos vegetales son los siguientes:

Elección del explante. El explante es el órgano o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, tallo, cotiledón o raíz, entre otros. En teoría, cualquier segmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede ser utilizado como explante. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tipo de explante que se elija será determinante en la obtención de la respuesta deseada, ya que cada uno de ellos responderá de manera diferente al cultivo. Por regla general, entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*.

Elección del medio y condiciones de cultivo. El medio de cultivo junto con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo. A grandes rasgos, el medio de cultivo consiste en dos grupos de componentes. Los primeros son los esenciales, es decir, aquéllos que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del tejido cultivado. Este grupo incluye a los nutrientes minerales, la fuente de carbono y algunas vitaminas. El segundo grupo de compuestos, son los llamados opcionales, que si bien en ocasiones no son indispensables para mantener la vida del tejido en cultivo, sí determinan en gran medida el tipo de respuesta que se obtendrá de éste, y por lo tanto influyen en el éxito o fracaso del establecimiento y respuesta de los cultivos *in vitro*. A este grupo pertenecen las fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal. Además de la formulación del medio, es importante considerar las condiciones físicas del cultivo (luz, fotoperiodo, temperatura y humedad), ya que éstas también contribuyen a la respuesta del explante.

Condiciones asépticas. Para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo a cualquier microorganismo patógeno. Lo cual resulta difícil en muchos casos, debido a que los medios de cultivo utilizados, son muy ricos en nutrientes y generalmente tienen un alto contenido de carbohidratos, lo que los hace ideales para el desarrollo de prácticamente cualquier microorganismo. Por tanto, el material vegetal, debe desinfectarse para evitar cualquier tipo de contaminación.

El cultivo de tejidos vegetales constituye dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha proporcionado. Sus aplicaciones son múltiples, van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la micropropagación, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* y la ingeniería genética (Thorpe, 1990; Jiménez, 1998).

La aplicación del cultivo de tejidos vegetales, se justifica en especies que se propagan vegetativamente (ajo, papa, camote, etc.), en aquellas que producen semillas recalcitrantes (la mayor parte de los frutos tropicales) (Chávez y Rubluo, 1995), así como

cuando por los métodos tradicionales la germinación de las semillas y la producción de nuevos individuos es muy lenta y limitada, o bien resulta difícil establecer un sistema de propagación clonal y masiva (Murashige, 1974; citado por Martínez, 1991), como ocurre con la familia de las orquídeas, en donde a pesar de la gran cantidad de semillas que se producen por fruto (miles a millones), del 1-2% de las semillas logran germinar en condiciones naturales (Philip y Nainar, 1988). Además, por la sobrecolecta y pérdida de su hábitat son plantas muy vulnerables a la extinción, por lo que las técnicas de cultivo *in vitro*, proporcionan una estrategia sumamente útil para el rescate y conservación *ex situ* de estas plantas. Así mismo, presentan ventajas con respecto a las técnicas de propagación convencional, permitiendo una rápida multiplicación de la especie, libre de agentes patógenos, bajo condiciones controladas adicionando reguladores de crecimiento vegetal, logrando así obtener un gran número de brotes a partir de pequeñas cantidades de material inicial (Fay, 1994).

Dentro de los grupos de plantas que se han micropropagado en distintos jardines botánicos por medio del cultivo de tejidos vegetales, se encuentran, cactáceas, orquídeas, cícadas, agaves, coníferas y compuestas; entre otras, como las que se observan en la **Tabla 2**. (Martínez, 1985; Martínez, 1991; Rubluo *et al.*, 1993; Fay, 1994; Chávez *et al.*, 1992; Chávez y Rubluo, 1995; Martínez *et al.*, 2003; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

Tabla 2. Algunas especies de plantas propagadas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

| Especie | Explante | Medio y RCV | Vía de regeneración | Referencia |
|--|--|---------------------|--|--|
| <i>Chenopodium quinoa</i> (Chenopodiaceae) | Embriones inmaduros en diferentes estadios de desarrollo | MS , ANA y Kin | Formación de plantas completas | González, 2001. |
| <i>Piquería trinervia</i> (Asteraceae) | Nudos | MS, Kinetina | Organogénesis directa | Hernández, 1996 |
| <i>Ceratozamia euryphyllidia</i> , <i>Ceratozamia mexicana</i> , <i>Ceratozamia Hildae</i> (Zamiaceae) | Megagametofitos, embriones cigóticos y hojas inmaduras | Litz, Kin y 2,4-D | Embriogénesis somática | Chávez <i>et al.</i> , 1992; Chávez <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Zamia fischeri</i> , <i>Zamia furfuracea</i> , <i>Zamia pumila</i> (Zamiaceae) | Megagametofitos, embriones cigóticos y hojas inmaduras | Litz, Kin y 2-4,D | Organogénesis y embriogénesis somática | Chávez <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Picea chihuahuana</i> (Pinaceae) | Embriones maduros e inmaduros | SH, Kin | Organogénesis directa | López-Escamilla, 2000; Mata-Rosas, 2001 |
| <i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i> (Cactaceae) | Tubérculos de plantas germinadas <i>in vitro</i> | MS, ANA y BA | Organogénesis y embriogénesis somática directa e indirecta | Moebius-Goldammer; 2003 |
| <i>Turbincarpus laui</i> (Cactaceae) | Secciones longitudinales de plantas germinadas <i>in vitro</i> | MS, BA y ANA | Organogénesis indirecta | Mata-Rosas <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Bletia urbana</i> (Orchidaceae) | Protocormos | MS y KC, ANA y BA | Organogénesis directa | Martínez, 1985 |
| <i>Vanilla planifolia</i> (Orchidaceae) | Nudos | MS, ANA y BA | Organogénesis | Rojas, 2006 |
| <i>Agave victoriae-reginae</i> (Agavaceae) | Segmentos de tallo y yemas axilares | MS, BA, 2,4-D | Organogénesis y embriogénesis somática indirecta | Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Yuca aloifolia</i> (Agavaceae) | Yemas de plantas geminadas <i>in vitro</i> | MS, ANA y TDZ | Organogénesis directa | Atta-Alla & Staden, 1997. |
| <i>Agave sisalana</i> (Agavaceae) | Hojas maduras e inmaduras y rizomas | MS, 2,4-D, BA y Kin | Organogénesis indirecta | Hazra <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae) | Hojas | MS, Zeatina, BA | Embriogénesis somática indirecta | JayaSree <i>et al.</i> , 2001 |

2.9 Micropropagación

La micropropagación es una tecnología que se ha desarrollado en los últimos treinta años, y se refiere a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo *in vitro* (Debergh y Zimmerman, 1991). Las principales ventajas de este sistema de propagación se resumen en: 1) obtención de altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular cantidades elevadas de plantas en cortos periodos de tiempo, 2) es un sistema de propagación clonal, por lo que es ideal para la propagación masiva de plantas o variedades con características sobresalientes, 3) la producción de plantas es independiente de las condiciones ambientales, 4) se obtiene uniformidad en las plantas producidas y 5) mayor facilidad en la comercialización (Jiménez, 1998).

De acuerdo con Debergh y Zimmerman (1991), la micropropagación comprende las siguientes etapas:

Etapa 0: Etapa preparativa. Esta etapa consiste en la selección y preparación de la planta madre, la cual debe de ser típica de la variedad y estar libre de enfermedades.

Etapa 1: Iniciación del cultivo. Consiste en el establecimiento de un cultivo axénico a partir de la planta madre.

Etapa 2: Multiplicación. El objetivo de esta etapa es lograr la multiplicación de órganos y estructuras que son capaces de dar lugar a la formación de nuevas plantas. Es la fase más importante y determinante en todo el programa de propagación *in vitro*.

Etapa 3: Elongación y desarrollo de brotes y formación de raíces. Como su nombre lo indica, su objetivo es lograr el desarrollo de los brotes formados en la etapa 2 y el enraizamiento de los mismos antes de ser transferidos a condiciones *ex vitro*.

Etapa 4: Aclimatización. Consiste en el establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas.

Existen diversos factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación, como son: 1) El tipo de explante, en donde, su estado fisiológico influye significativamente en su capacidad morfogénica, 2) los reguladores de crecimiento empleados y sus concentraciones y 3) el medio de cultivo, en donde el éxito de la micropropagación dependerá de su composición y forma física (Villalobos y Thorpe, 1991).

La base de la micropropagación masiva de plantas es el cultivo de meristemos, yemas o ápices, debido a que en éstos las posibilidades de que sus células estén libres

de patógenos, principalmente virus, es mayor que en los tejidos más diferenciados de la planta, además tienen la ventaja de ser estructuras muy estables genéticamente, a partir de las cuales se pueden obtener cantidades elevadas de plantas (Jiménez, 1998). Por ejemplo, a partir de una sola yema de rosal subdividida cada mes en cuatro secciones es posible obtener de 200,000 a 400,000 plantas en un año, mientras que, en el mismo periodo de tiempo utilizando los métodos convencionales se obtienen de 30-50 plantas (Martin, 1985; citado por Rangel, 1995). En las orquídeas, las semillas y estructuras afines son explantes muy poco utilizados en su micropropagación, en la mayor parte de la literatura se reporta el empleo de otro tipo de explantes como: meristemas apicales, segmentos de hojas, ápices de raíz, entrenudos e inflorescencias, entre otros (Arditti, 1992). Sin embargo, la propagación *in vitro* de plantas a partir de semillas, tiene ciertas ventajas: 1) a partir de su germinación, es posible obtener plantas libres de agentes patógenos, 2) se incrementa la diversidad genética de las plantas formadas, puesto que cada una surge a partir de la fusión de un par de gametos distintos, 3) es posible inducir brotación múltiple en un estado precoz de desarrollo, con una tasa de multiplicación alta, debido a su bajo grado de diferenciación celular en un tejido con alto grado de estabilidad genética y 4) se incrementan notoriamente los porcentajes de germinación en comparación con las técnicas convencionales, con las que en ocasiones, no se logra una germinación o el porcentaje es muy bajo debido a la dormancia de las semillas, o a que presentan requerimientos específicos (George & Sherrington, 1984; Martínez, 1985; Fay, 1994; Rodríguez, 2000).

De acuerdo con George & Sherrington (1984), existen dos vías diferentes para lograr la regeneración de plantas *in vitro*: 1) la organogénesis y la embriogénesis somática. Éstas pueden ocurrir de manera directa a partir del explante inicial o bien mediante la formación de callo y su posterior diferenciación.

2.9.1 Micropropagación vía organogénesis

La organogénesis en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se refiere a la formación de *novo* de órganos a partir de los explantes cultivados. Entre los órganos que se pueden formar se encuentran las raíces, tallos o los llamados brotes adventicios, que son estructuras similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta después de elongarse y formar raíces. En la organogénesis, los brotes y raíces formados tienen un origen multicelular, además se trata de estructuras monopolares, que posteriormente desarrollan tejido procambial, el cual establecerá una conexión con el tejido vascular del explante cultivado (Terzi y Loschiavo, 1990).

Este fenómeno se basa en la totipotencialidad celular, es decir, cada célula posee toda la información genética necesaria para constituir una planta completa o desempeñar las funciones de cualquier órgano o tejido vegetal. La organogénesis puede ser directa, cuando tiene lugar en el explante original, o bien indirecta cuando primero se origina tejido calloso y luego se originan los órganos a partir de éste. Entre los factores que contribuyen a la inducción de los brotes adventicios destacan los reguladores de crecimiento, en particular, las auxinas y citocininas (Pérez *et al.*, 1999). Sin embargo, existen un gran número de factores que afectan el proceso de organogénesis como son: 1) El explante (su genotipo, estado general de la planta donadora del explante, tejidos y tipos celulares presentes en el explante, edad fisiológica y ontogénica del tejido de donde proviene el explante, posición del explante dentro de la planta donadora, estación del año en que toma el explante, entre otros). Los explantes que se han utilizado exitosamente incluyen ramas en floración, pedúnculos florales, embriones inmaduros, meristemos, yemas florales, partes de rizomas, etc., 2) El medio de cultivo (tipo, proporción y concentración de los reguladores de crecimiento, los macro y micronutrientes, las vitaminas, el nitrógeno orgánico, la fuente de carbono, los suplementos nutritivos, el tipo de medio (líquido o sólido), el tipo y concentración del gelificante, etc. y 3) El ambiente de incubación (factores como la luz, obscuridad, fotoperiodo, tipo de luz y la temperatura) (Litz y Jarret, 1991; Pérez *et al.*, 1999).

2.9.2 Micropropagación vía embriogénesis somática

La embriogénesis somática es una vía en la que las células somáticas o asexuales presentes en las células vegetales, forman un embrión sin la necesidad de la fusión de gametos, mediante un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica. Este proceso, también ocurre en la naturaleza y se le conoce como una forma de apoximis, llamada embrionía adventicia (Thorpe y Stasolla, 2001). De esta manera, los embriones somáticos son estructuras bipolares, con un eje radical-apical y que no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras son capaces de crecer y formar plantas completas (Gómez, 1998). Entre los principales factores que afectan la inducción de la embriogénesis somática se encuentran: el genotipo del material inicial, el origen del explante y la composición del medio de cultivo, particularmente con respecto a las hormonas presentes (Terzi y Loschiavo, 1990).

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa (ESD) y la indirecta (ESI). En la embriogénesis somática directa, los embriones aparecen directamente sobre el explante original, mientras que en la embriogénesis somática indirecta, como primer paso es indispensable obtener un tejido calloso a partir del cual se obtendrá la diferenciación de los embriones somáticos en un segundo paso. Éste es un proceso más complejo que la embriogénesis somática directa. La ESD, ocurre cuando en el explante original existen ya células proembriogénicas, por lo que no es necesario el proceso de inducción y sólo se requiere proporcionar al tejido las condiciones adecuadas para que suceda la diferenciación de los embriones somáticos. En la ESI, el explante original no tiene células proembriogénicas, por lo que se requiere primero darle al tejido las condiciones para que ocurra la inducción, y después cambiarlo a otras que sean propicias para la diferenciación de los embriones. Las células de tejidos muy jóvenes son en gran proporción células proembriogénicas, o si no, son fácilmente inducibles para que lo sean, mientras que las células más diferenciadas o de tejidos adultos, muy difícilmente o casi nunca se llegan a convertir en proembriogénicas. Esto explica por qué la embriogénesis somática resulta sencilla en algunos tejidos y prácticamente imposible en otros (Gómez, 1998; Pérez *et al.*, 1999).

De acuerdo con Pérez *et al.* (1999), el desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos: **Inducción.** Es el proceso de conversión de una célula somática a una célula proembriogénica. Los factores determinantes para que suceda este proceso son el

genotipo, el grado de diferenciación de las células del explante, la presencia de auxinas y el aislamiento celular.

Histodiferenciación. Las células proembriogénicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante una división y diferenciación celular simultáneas. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a una fase de diferenciación, se requiere la eliminación de las auxinas exógenas. El establecimiento de una polaridad en las masas de células proembriogénicas se mantendrá durante todo el desarrollo del embrión. Durante esta etapa, los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las dicotiledóneas estos estadios son: globular, corazón y torpedo (**Fig. 6A**); mientras que en las monocotiledóneas son, globular, coleoptilar y escutelar (**Fig. 6B**).

Maduración. Durante esta fase ocurre una elongación celular, pero sin división. En la mayoría de las especies uno de los estímulos que hacen posible la maduración son el ácido abscísico y la desecación. En el caso de las dicotiledóneas, al embrión somático maduro se le da el nombre de estadio cotiledonario.

Germinación y Conversión en plantas. Es el proceso de elongación y reactivación metabólica de un embrión somático maduro para convertirse en plántula, para lo cual se requieren estímulos como la luz, el ácido giberélico o la adición de citocininas al cultivo *in vitro*.

La embriogénesis somática es un sistema ideal para investigar el proceso completo de diferenciación en las plantas, así como los mecanismos de expresión de la totipotencialidad en las células vegetales, mostrando ciertas ventajas en comparación con la embriogénesis cigótica. Por ejemplo, a) el proceso de embriogénesis es fácilmente monitoreado, b) el ambiente del embrión puede ser controlado y c) un gran número de embriones pueden obtenerse fácilmente (Nomura y Komamine, 1999). Este método es ampliamente considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión y a la relativa facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existen sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se reporta una embriogénesis somática eficiente que permita un uso aplicado del método (Gómez, 1998).

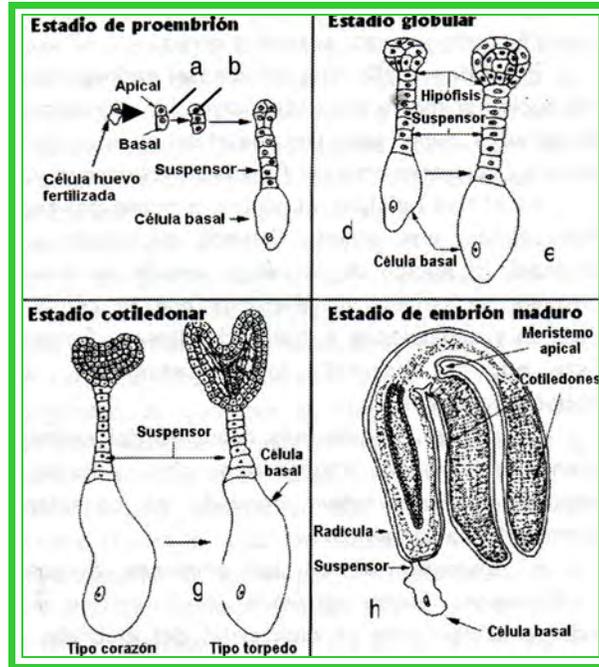
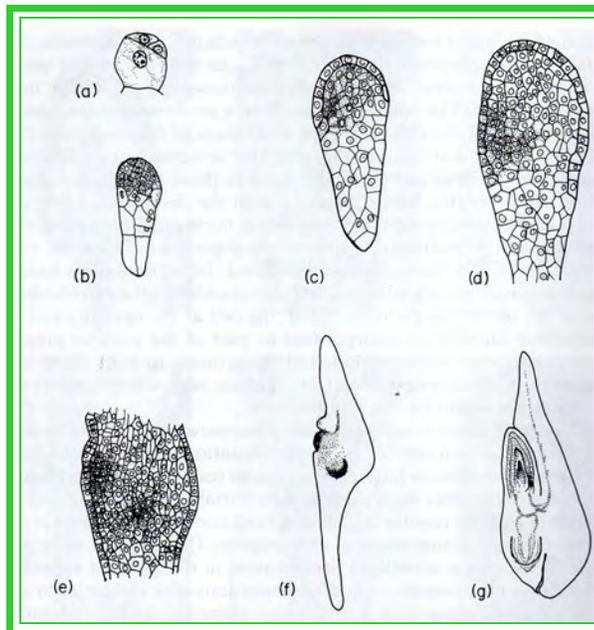
A**B**

Figura 6. Embriogénesis. Estadios de desarrollo de un embrión A) Dicotiledónea. Tomado de Romero *et al.*, 2002. B) Monocotiledónea (*Zea mays*). a) embrión mostrando la primera división celular, b) establecimiento de una polaridad, c) y d) embrión en etapa globular, e) embrión en etapa coleoptilar, f) embrión en etapa escutelar y g) Formación de una plántula. Tomado de Steeves y Sussex, 1989.

2.10 Reguladores de crecimiento vegetal

Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta, destacan las hormonas vegetales, también conocidas como reguladores de crecimiento vegetal (RCV) o fitohormonas. Los RCV, son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades modifican, estimulan o inhiben el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Pérez *et al.*, 1999).

Se reconocen cinco grupos básicos de reguladores de crecimiento vegetal, dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: 1) auxinas, 2) citocininas, 3) giberelinas, 4) etileno y 5) ácido abscísico. De todos éstos, los dos primeros son los más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis en el cultivo de órganos y tejidos (George & Sherrington, 1984). Estas sustancias eran desconocidas hasta 1928, cuando Went y Thimann descubrieron el ácido indolacético (AIA), y cuando Skoog en 1944 descubrió la cinetina (CIN). En 1957, Skoog y Miller fueron los primeros que consiguieron manipular la formación de brotes, raíces y tejido calloso, mediante el uso de diferentes combinaciones de una auxina (AIA) y una citocinina (Kin) (Pérez *et al.*, 1999).

Actualmente, se han aislado y estudiado otras sustancias que no pertenecen a ninguno de los grupos anteriores, que también se han considerado como reguladores de crecimiento vegetal, entre los que se incluyen los jasmonatos, las poliaminas, los brassinoesteroides y el ácido salicílico (Davies, 1995).

2.10.1 Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos ampliamente empleados en la micropropagación, derivados comúnmente del triptófano, sintetizados por lo general en los ápices de las plantas (sitios de crecimiento activo), los cuales están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular (Pérez *et al.*, 1999). Se ha visto que una vez que son incorporadas al medio de cultivo, promueven el crecimiento de callo, así como el crecimiento y elongación celular, la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces) (George y Sherrington, 1984). En las plantas completas, las auxinas tienen que ver con la dominancia apical, afectan la senescencia y abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas trópicas (Pérez *et al.*, 1999).

La auxina natural más común es el ácido-3-indolácetico (AIA), pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas naturales en los tejidos, como el ácido-4-cloroindol-3-ácetico, el ácido indol-3-acrílico o el ácido indol-3-butírico (IBA). En la actualidad, se conocen y utilizan varios compuestos sintéticos que tienen una fuerte actividad de auxinas, como los ácidos fenoxiacéticos que son utilizados como herbicidas en altas concentraciones. Ejemplos de auxinas sintéticas son, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido α -naftalenacético (ANA) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram) (George & Sherrington, 1984; Pérez *et al.*, 1999).

En las orquídeas, Hans Fitting en 1909, fue el primero en proveer evidencia de la presencia de hormonas en estas plantas, mientras estudiaba el proceso de polinización en *Phalaenopsis*, encontró una sustancia a la que denominó Polenhormona. Frits W. Went descubrió que la polenhormona era una auxina, que posteriormente se identificó como el ácido 3-indolácetico (AIA) (Arditti, 1992; Arditti y Krikorian, 1996). La evidencia disponible sugirió que en las orquídeas, sus funciones son las mismas que en otras plantas. Algunas de estas funciones son: la regulación del fototropismo (inclinación de las partes de la planta hacia la luz) y del geotropismo. Las auxinas producidas en los ápices de brote, inhiben el crecimiento de las yemas laterales. Este fenómeno conocido como dominancia apical, ha sido observado en tallos de *Dendrobium* y en inflorescencias de *Phalaenopsis*. También, es sabido que las auxinas en algunos casos pueden inducir la floración en algunas plantas. Sin embargo, en algunas orquídeas como *Dendrobium crumenatum* y *Phalaenopsis schilleriana*, las auxinas inhiben su floración. Por otro lado, se reporta que altas concentraciones de auxinas, pueden inducir la formación de raíces en plántulas obtenidas a partir del cultivo *in vitro*, de entrenudos de *Dendrobium*. Además, la formación del fruto en las orquídeas, y en otras plantas generalmente se inicia como resultado de la polinización de sus flores y el desarrollo del óvulo. Un factor clave en este proceso, son las auxinas, las cuales son provistas por medio del polen. En algunos géneros de orquídeas como *Paphiopedilum* y *Vanilla*, la aplicación de auxinas puede iniciar el desarrollo del fruto sin que ocurra la polinización. Las auxinas también estimulan el desarrollo del óvulo en los géneros *Cymbidium*, *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Vanda* y *Phaius*, entre otros (Arditti, 1992).

2.10.2 Citocininas

Las citocininas generalmente son derivados de la adenina, y son sintetizadas en tejidos jóvenes y raíces. Los embriones y frutos jóvenes, presentan concentraciones altas de citocininas, sin embargo, éstas necesitan ser aisladas a partir de raíces, hojas y flores, entre otras (Arditti, 1992). Poseen dos propiedades que las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; por un lado, estimulan la división celular y por otro rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. En las plantas completas, las citocininas promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia (Pérez *et al.*, 1999). La primer citocinina en ser descubierta, fue la kinetina (Kin), ésta fue aislada por el profesor Skoog, mientras realizaba experimentos para promover el crecimiento continuo en callo de tabaco. Se le denominó kinetina debido a que estimulaba la división celular, por lo que el término citocinina fue propuesto para denominar a todos los compuestos con una actividad similar (Skoog *et al.*, 1965; citado por George & Sherrington, 1984). Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, la isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina. Estas citocininas naturales se caracterizan por poseer un esqueleto de adenina con una cadena lateral isoprenoide (Davies, 1995). Las citocininas sintéticas benciladenina (BA) y kinetina (Kin), son las más utilizadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Algunos herbicidas sintéticos como las fenilureas tienen actividad de citocinina en bajas concentraciones. Un ejemplo de éstos es el N-fenil-N'-1,2,3-tidiazolil-5-urea (Tidiazurón) (Pérez *et al.*, 1999).

En las orquídeas, las citocininas se han utilizado principalmente para: 1) el inicio y mantenimiento de cultivos de tejidos vegetales, 2) mejorar la producción de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de callo, 3) inducir la floración en híbridos como *Dendrobium* y *Aranda* y 4) para incrementar el número de brotes laterales. También se ha visto que altas concentraciones de benciladenina rompen la dormancia de las yemas laterales en inflorescencias de *Phalaenopsis* (Arditti, 1992).

2.10.3 Interacción auxinas-citocininas

Junto con las auxinas, las citocininas regulan la división celular. Por tanto, el balance entre auxinas y citocininas en un cultivo *in vitro*, suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido (Pérez *et al.*, 1999), por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad

del método de micropropagación (Pérez, 1998). Skoog y Miller, encontraron que la formación de brotes se podía inducir en cultivos de callo de tabaco, utilizando concentraciones relativamente bajas de auxinas y altas de citocininas al adicionarlas al medio de cultivo (George & Sherrington, 1984). A partir de este descubrimiento, varios aspectos de la diferenciación celular y de la organogénesis durante el cultivo de tejidos se ha visto que están regulados por la interacción entre las auxinas y citocininas (aunque pueden presentarse variaciones notables entre especies y tejidos) (**Figura 7**). En las orquídeas, la información relacionada con los efectos de las interacciones hormonales sobre la formación de plántulas es muy escasa. En algunos trabajos, se reporta que la combinación de auxinas como el ANA y el 2,4-D y citocininas como la Kin o la BA, pueden incrementar el crecimiento, pero los efectos de estas combinaciones pueden variar dependiendo de los reguladores de crecimiento utilizados, sus concentraciones y las especies bajo estudio (Arditti y Ernst, 1984).

De acuerdo con George & Sherrington (1984), las respuestas que pueden esperarse del tejido ante el balance de auxinas y citocininas son las siguientes:

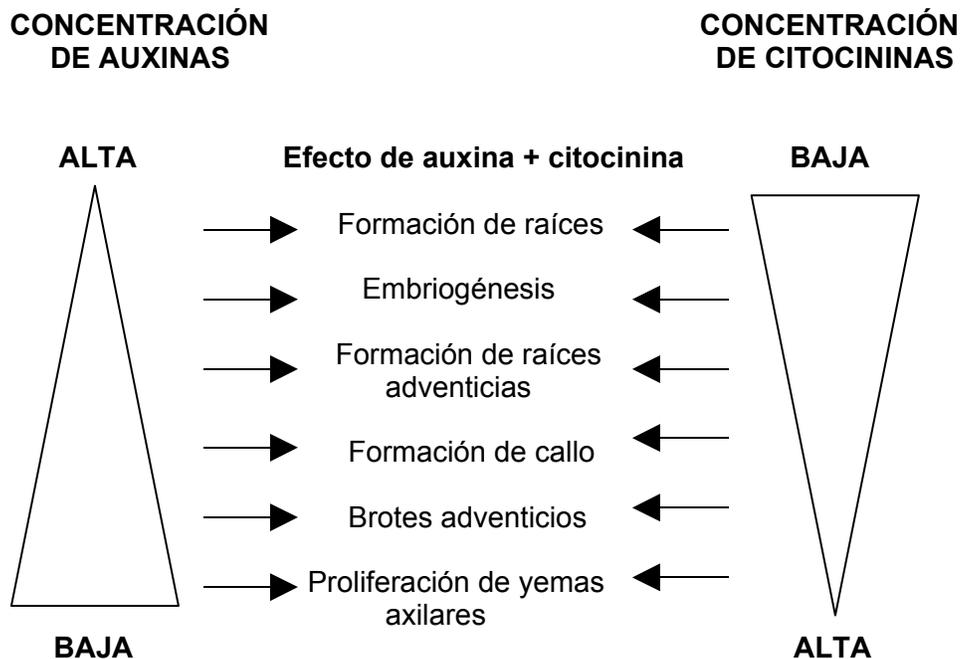


Figura 7. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas que generalmente son requeridas durante la morfogénesis *in vitro*.

2.11 Micropropagación de orquídeas

2.11.1 Germinación simbiótica y asimbiótica

Estructuralmente, los embriones de las orquídeas carecen de endospermo. El embrión está integrado por una masa de células, que son muy similares unas con otras y no es evidente ningún tejido especializado. Las principales reservas alimenticias de las semillas están almacenadas en el propio embrión. Sin embargo, las semillas de las orquídeas carecen de un mecanismo metabólico apropiado para utilizar sus propias reservas durante la germinación (Luna *et al.*, 2004). Por tanto, en la naturaleza necesitan ser infestadas por un hongo micorrízico, que produce enzimas hidrolíticas (endopoligalacturonasas, protopectinasas, celulasas y otras hidrolasas) que son capaces de romper las macromoléculas, y de esta forma permiten que el embrión de las orquídeas asimile los nutrientes que necesita para su germinación. Así, Noel Bernard (1899), fue el primero en descubrir de forma accidental que los hongos juegan un papel importante en la germinación de las semillas de orquídea, primero en *Neotia nidus-avis* y después en otras orquídeas, incluyendo *Phalaenopsis* (Arditti, 1992). Posteriormente, al morir Bernard, Hans Burgeff desarrolló un método simbiótico para la germinación de semillas de orquídeas, el cual consistía en inocular en tubos de cultivo las semillas junto con el hongo, en un medio de cultivo que contenía un extracto de los tubérculos de *Ophrys*, llamado “salep”. A pesar de que su método no fue exitoso se utilizó por un tiempo (Stewart 1988).

De tal forma, que entre 1841 y 1921, éste fue el único método para lograr la germinación de las semillas de orquídeas, hasta que en 1922, Knudson analizó el “salep” y encontró que éste consistía de 48% de mucílago, 27% de almidón y 5% de proteínas, algunos azúcares y minerales solubles (Arditti, 1967). A partir de esto, Knudson demostró que era posible la germinación de las semillas sobre un medio de cultivo simple que contuviera minerales y azúcares, sin necesitar la presencia del hongo. La investigación desarrollada por Knudson revolucionó el mundo de las orquídeas, ya que permitió que semillas de *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, y de muchas otras orquídeas, pudieran germinar de manera asimbiótica *in vitro*, en un medio de cultivo que denominó solución B, el cual fue una modificación de la formulación propuesta por W. Pfeffer (Arditti, 1992).

Años más tarde, Knudson estableció que las semillas de orquídeas deben germinar en un medio sólido, constituido por una mezcla balanceada de minerales y una fuente de sacarosa, dando como resultado la formulación del medio Knudson C en 1946 (Arditti, 1967). De esta manera, Knudson fue el primero en dar a conocer un medio

exitoso para la germinación asimbiótica de las semillas de orquídeas, el cual es ampliamente utilizado hoy en día, con sólo algunas pequeñas modificaciones en su composición. Sin embargo, el medio de cultivo MS que originalmente fue diseñado para maximizar el crecimiento de callo en tabaco, se ha observado que también favorece la germinación y desarrollo de diferentes especies de orquídeas, debido a que es el medio de cultivo con la concentración más alta de sales minerales, concentración 136 veces más elevada que el contenido de sales minerales presentes en el tronco de un árbol. Además, éste contiene altas concentraciones de nitrógeno en forma de amonio y nitrato (Arditti y Ernst, 1984; Razdan, 2002).

El cultivo asimbiótico *in vitro* tiene varias ventajas: se tienen más posibilidades de éxito en la germinación de las semillas que en condiciones naturales, debido a que es posible sustituir la acción del hongo por un medio nutritivo (germinación asimbiótica). Además, la germinación y desarrollo tienen lugar más rápidamente *in vitro*, ya que se realiza en un ambiente acondicionado, y sin competencia con hongos y bacterias (Pierik, 1990). Tan sólo entre 1893 y 1974, una estimación realizada reveló que se logró la producción de 106,410 híbridos de orquídeas en diferentes partes del mundo, de los cuales un 80-85% fueron obtenidos a partir del cultivo asimbiótico de semillas (Rao, 1977).

2.11.2 Propagación clonal

Probablemente las orquídeas fueron las primeras plantas en ser propagadas mediante el cultivo *in vitro*, a partir de semillas (Arditti, 1977). Desde que Knudson desarrolló un método para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas, las técnicas de cultivo *in vitro*, han jugado un papel sumamente importante en el cultivo, propagación y preservación de un gran número de especies e híbridos de orquídeas (Sagawa, 1991). La primer propagación clonal de orquídeas, por medio del cultivo de tejidos vegetales, fue desarrollada por Gavino Rotor en 1949, quien cultivó secciones de nudos (cada uno con una yema) de inflorescencias de *Phalaenopsis*, utilizando el medio Knudson C, con la finalidad de que a partir de cada yema se pudieran formar plantas completas. Después de 14-60 días de cultivo, logró la formación de brotes con hojas, los cuales formaron raíces una vez formadas 2-3 hojas. Solamente 7 de las 65 yemas utilizadas como explantes murieron durante el cultivo. De esta forma, Rotor inició la micropropagación de orquídeas y fue el primero en publicar un reporte científico de la

multiplicación clonal de una planta superior *in vitro*, utilizando un medio nutritivo, explantes y condiciones asépticas (Arditti y Krikorian, 1996).

Sin embargo, el acontecimiento que revolucionó la propagación clonal de orquídeas fue en 1960, con George Morel, quien introdujo la técnica del cultivo de meristemos como una forma de propagación vegetativa. Morel, intentó obtener plantas de *Cymbidium* libres de virus por medio del cultivo de meristemos, para lo cual aisló meristemos apicales *in vitro*, a partir de los cuales obtuvo cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) que eran extremadamente idénticos a los que se forman después de la germinación de la semillas, encontrando que era posible producir de 6-8 nuevos protocormos, a partir de uno inicial en alrededor de seis semanas. De esta forma, Morel produjo millares de plantas en un año, a partir de un único ápice (meristemo apical con algunos primordios foliares), convirtiéndose así el cultivo de meristemos en la primera aplicación comercial para la propagación vegetativa *in vitro* (Pierik, 1990). Arditti (1977), empleando el mismo sistema que Morel, reportó que a partir de una sola yema de *Cymbidium* es posible obtener en un año cuatro millones de plantas. Este método, que originalmente se desarrolló para *Cymbidium*, se modificó más tarde y se utilizó para *Cattleya* y muchos otros géneros más de orquídeas. En la actualidad, la técnica desarrollada por Morel se realiza a gran escala en todo el mundo y ha sido aplicada exitosamente para la producción comercial de ciertas orquídeas. La producción de grandes cantidades de plantas de calidad, el establecimiento de nuevos híbridos y la multiplicación y preservación de germoplasma son algunos de los beneficios que han derivado de la aplicación de esta tecnología (Sagawa, 1991). A partir de esto, con el paso de los años se han desarrollado algunos otros métodos, para la propagación de orquídeas *in vitro*, empleándose diferentes tipos de explantes, tales como protocormos, meristemos de raíz, hojas, yemas, tallos, inflorescencias y rizomas, entre otros (**Tabla 3**). Murashige en 1974, enumeró 22 géneros de orquídeas que podían propagarse mediante el cultivo de tejidos vegetales, mientras que, Arditti en 1977 registró el cultivo para 35 géneros, incluyendo algunos híbridos intergenéricos (Goh, 1990). Posteriormente, Sagawa y Kunisaki (1984), señalaron numerosas técnicas para la propagación clonal de orquídeas, y Arditti y Ernst en 1993, reportaron el protocolo de propagación para 83 géneros de orquídeas, utilizando diferentes explantes como raíces, hojas, inflorescencias, yemas florales, tallos, protoplastos y meristemos, entre otros.

Tabla 3. Explantes más utilizados en la micropropagación de orquídeas.

| GÉNERO O ESPECIE | EXPLANTE | MEDIOS DE CULTIVO Y RCV | RESPUESTA | REFERENCIA |
|---|---------------------------------------|--|-------------------------------|---------------------------------|
| <i>Laelia anceps</i> y <i>Catasetum interrgerrimum</i> | Protocormos | MS, KC y Vacin y Went, BA y ANA | Formación de PLB's * | Hernández <i>et. al.</i> , 2001 |
| <i>Oncidium stramineum</i> | Ápices de tallo | KC, 2-4-D y kinetina | Formación de PLB's * | Rangel, 1995 |
| <i>Catasetum fimbriatum</i> | Meristemo de raíz | Vacin y Went, sin reguladores de crecimiento | Formación de PLB's * | Peres y Kerbauy, 1999 |
| <i>Paphiopedilum</i> | Protocormos | MS al 50% 2,4-D y TDZ | Formación de PLB's ** | Lin <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Phalaenopsis</i> | Hoja | Vacin y Went, 2,4-D y BA | Formación de PLB's ** | Ishii <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Vanilla planifolia</i> | Meristemos de raíz, y nudos | MS y KC, 2,4-D, ANA, IBA, AIA y Kinetina | Formación de brotes y PLB's * | Philip y Nainar, 1986 |
| <i>Cattleya</i> | Meristemo de raíz | Vacin y Went, 2,4-D y ANA | PLB's ** | Kerbauy, 1991 |
| <i>Mormodes tuxtlensis</i> , <i>Cuitlauzina pendula</i> y <i>Lycaste skinneri</i> | Protocormos | MS y KC, ANA y BA | Formación de PLB's * | Salazar, 2003 |
| <i>Oncidium</i> | Meristemo de raíz y segmentos de hoja | MS al 50%, ANA y TDZ | PLB's ** | Chen y Chang, 2000 |
| <i>Cattleya mossiae</i> | Tallo | MS, BA y TDZ | Formación de brotes * | Torres y Mogollón, 2000 |
| <i>Oncidium tigrinum</i> | Protocormos | MS y KC, ANA y BA | Formación de PLB's * | Baltazar, 2004 |
| <i>Phalaenopsis</i> | Yemas laterales de inflorescencias | MS, medio sin reguladores de crecimiento | Formación de PLB's * | Ichihashi, 1992 |
| <i>Oncidium</i> | Hoja | MS, TDZ, 2ip, Kinetina, | Formación de PLB's ** | Chen y Chang 2001 |
| <i>Geodorum densiflorum</i> | Rizoma | MS y KC, ANA y BAP | Formación de brotes * | Bhadra y Hossain, 2003 |
| <i>Phalaenopsis</i> y <i>Doritaenopsis</i> | Entrenudos de inflorescencias | Vacin y Went, BA | Formación de PLB's * | Lin, 1986. |
| <i>Laelia albida</i> | Yemas | KC, BAP, ANA y agua de coco | Formación de PLB's * | Santos <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Oncidium</i> | Hoja | MS al 50%, 2,4-D y TDZ | Formación de PLB's * | Chen y Chang, 1999 |
| <i>Bletia urbana</i> | Protocormos | MS y KC, ANA y BA | Formación de brotes * | Martínez, 1985 |
| <i>Laelia speciosa</i> | Hojas jóvenes | MS modificado, ANA y 2ip | Formación de brotes ** | Barrera, 2006 |

(*)= Vía directa

(**)=Vía indirecta

2.12 Propagación *in vitro* de protocormos

Cuando una semilla de orquídea germina (absorbe agua, se hincha y la cubierta seminal se rompe), se forma una estructura esférica de color verde denominada protocormo (Arditti, 1966). El término protocormo, fue acuñado por el botánico francés Noel Bernard para designar una etapa de desarrollo en el embrión de las orquídeas (Morel, 1974). La diferenciación de éste, comienza con la formación de un meristemo apical en el ápice y pelillos epidérmicos (rizoides), en la parte basal. 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 cercano a la base de las hojas (Betchel *et al.*, 1992; citado por Rodríguez, 2000). Por tanto, con la aparición de las raíces se completa la formación de una pequeña plántula de orquídea (Arditti, 1966). Como los protocormos son estructuras que provienen directamente de las semillas, Champagnat y Morel (1972), consideraron que la aparición de estas estructuras durante el cultivo *in vitro* de orquídeas eran una manifestación de la embriogénesis (George & Sherrington, 1984).

Morel en 1964, observó que al cultivar ápices de brote de *Cymbidium*, se formaban estructuras esféricas de color verde semejantes a los protocormos que surgían de la germinación de las semillas (cuerpos parecidos a protocormos o PLB's), a partir de los cuales se logró la formación de plántulas. Más tarde, Morel descubrió que si los PLB's de *Cymbidium* se seccionaban en varias partes y se transferían a un nuevo medio de cultivo, cada uno de ellos era capaz de formar un grupo con cuatro o cinco nuevos protocormos, los cuales podían dividirse nuevamente y formar plantas completas. Si se repetía sucesivamente el mismo proceso, Morel estimó que en un año a partir de un solo ápice de brote era posible obtener más de cuatro millones de plantas (Goh, 1990).

Arditti (1967), también observó que cuando un protocormo era seccionado en distintas fracciones y éstas eran colocadas en un medio nutritivo, podían dar lugar a la formación de nuevos protocormos. Esta capacidad puede ser interpretada como parte de la naturaleza embrionaria de las células de los protocormos, lo cual representa un método útil de propagación, en donde a partir de pocas semillas o protocormos, es posible obtener una producción masiva de plantas. Además, el empleo de protocormos como explante inicial para la micropropagación de orquídeas presenta ciertas ventajas, debido a que la multiplicación vegetativa puede realizarse en un estado precoz de desarrollo con un nivel de proliferación no igualado por otras especies (Margara, 1984), a partir de un tejido con un alto grado de estabilidad genética, debido a que los protocormos provienen

de la germinación de las semillas, cada una de las cuales a su vez proviene de la fusión de un par de gametos distintos (Martínez, 1985).

En la literatura se reportan algunos trabajos para la propagación *in vitro* de distintos géneros de orquídeas, utilizando protocormos como explante inicial. Martínez (1985), reportó la propagación rápida y masiva de *Bletia urbana* a partir de protocormos seccionados, obteniendo brotación múltiple en las regiones apicales y basales. Lin *et al.*, (2000), a partir del cultivo de protocormos de un híbrido de *Paphiopedilum*, obtuvieron la formación de callos que posteriormente dieron lugar a la regeneración de plántulas. Rodríguez (2000), utilizó secciones de protocormos de *Paphiopedilum exstaminodium* y *Paphiopedilum caudatum*, con la finalidad de obtener brotación múltiple, sin embargo, estos explantes no mostraron crecimiento ni desarrollo, por lo que sugiere el empleo de protocormos sin seccionar o bien, otro tipo de explante. Hernández *et al.*, (2001), lograron la formación de plántulas de *Laelia anceps* y *Catasetum intergerrimum*, a partir del cultivo de mitades longitudinales de protocormos. Salazar (2003), logró la regeneración de plántulas de *Mormodes tuxtlensis*, *Cuitlantzina pendula* y *Lycaste skinneri*, a partir del cultivo de protocormos completos. Recientemente, Baltazar (2004), reportó la formación de plantas completas de *Oncidium tigrinum*, a partir del cultivo *in vitro* de protocormos enteros y seccionados.

Respecto a *Euchile mariae*, en la literatura no existe ningún reporte sobre su micropropagación, por lo que el presente estudio pretende desarrollar un protocolo eficiente para la obtención de plantas a partir del cultivo de secciones apicales y basales de protocormos, como una medida para su estudio, conservación y aprovechamiento sustentable, así como establecer mediante el análisis histológico realizado la caracterización de los regenerantes formados, para definir la vía morfogénica obtenida.

3. JUSTIFICACIÓN

Las orquídeas constituyen una de las familias más interesantes y atractivas dentro del reino vegetal. Por la belleza y rareza de sus flores, atractivos aromas y por la enorme diversidad de especies que comprende, son altamente apreciadas como ornamentales, esto ha sido causa de su colecta masiva e ilegal, y de la destrucción de su hábitat, lo que ha eliminado muchas poblaciones y disminuido otras, por lo que un gran número de especies se encuentran amenazadas y otras en peligro de extinción. Aunado a esto, los métodos convencionales no cubren la intensa demanda de esta familia de plantas. Por esto, resulta indispensable establecer estrategias eficientes para la conservación tanto *in situ* como *ex situ* de estas especies, en las que la presión en su ambiente natural se incrementa diariamente (UICN/SSC Orchid Specialist Group, 1996).

Euchile mariae, es una especie endémica de México, que al igual que otras orquídeas es de lento crecimiento, largo ciclo de vida, alto riesgo de que sus poblaciones silvestres sean constantemente alteradas, por la destrucción de su hábitat y la colecta y comercio ilegal, razones que han conducido a que se encuentre catalogada como una especie amenazada por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, (SEMARNAT, 2002). En este sentido, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales deben aplicarse como una herramienta de gran utilidad para el estudio, propagación y conservación de estas especies.

En esta investigación se sugiere el planteamiento de una estrategia para la conservación y aprovechamiento sustentable de *Euchile mariae*, que a su vez fomente el estudio y propagación *in vitro* de otras especies de orquídeas que se encuentren amenazadas o en peligro de extinción con la finalidad de reducir la presión en las poblaciones silvestres.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema eficiente para la regeneración *in vitro* de *Euchile mariae*, a partir de secciones de protocormos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Encontrar un medio de cultivo conveniente para lograr la germinación asimbiótica de semillas de *Euchile mariae*.
- Determinar las concentraciones adecuadas de los reguladores de crecimiento para la regeneración *in vitro* de *Euchile mariae*, a partir del cultivo de secciones de protocormos.
- Evaluar la respuesta morfogénica *in vitro* utilizando secciones apicales y basales de protocormos.
- Determinar la identidad de los regenerantes obtenidos por medio de estudios histológicos, así como los contenidos celulares presentes por medio de pruebas histoquímicas.
- Establecer las condiciones para la aclimatización de las plántulas generadas *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

El material biológico utilizado inicialmente consistió en semillas de *Euchile mariae* (Fig. 8a), provenientes de una cápsula aún no dehiscente (Fig. 8b); que presentaba todavía restos de la flor. Este material fue colectado en el Municipio Xalpa de Serra, en el estado de Querétaro.



Figura 8. a) Semillas de *E. mariae*, 0.8x. b) Cápsula aún no dehiscente de *E. mariae*. Barra = 1cm.

Una vez cortada la cápsula de la planta madre, fue colocada en un sobre de papel estraza y almacenada durante 7 días en refrigeración a 4° C hasta su utilización.

5.2 Desinfección y siembra del material biológico

Para llevar a cabo la desinfección de la cápsula, ésta se lavó con una solución jabonosa durante un minuto, se enjuagó con agua corriente y posteriormente se colocó en una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) al 30% (v/v) durante 30 minutos manteniéndola en agitación constante. Bajo condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada previamente esterilizada en autoclave a 1.5 kg/cm² de presión y 121° C, durante 20 minutos.

Una vez desinfectada la cápsula, se llevó a cabo la siembra de las semillas de la siguiente manera: 1) en una caja petri estéril bajo condiciones asépticas, se disectó la cápsula en tres partes iguales, cortando las líneas de dehiscencia de la misma para liberar las semillas de su interior; 2) con ayuda de una espátula fueron tomadas las semillas y 3) se sembraron en dos medios de cultivo distintos.

5.3 Medios de cultivo

Para la germinación de las semillas se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- 1) Medio Murashige & Skoog (1962) modificado por la reducción al 25% de los macronutrientes y al 50% del resto de los componentes y enriquecido por la adición de 500 mg/l de extracto de banana, 500 mg/l de caseína hidrolizada, 500 mg/l de carbón activado y 30 g/l de sacarosa (Apéndice A).
- 2) Medio Knudson C (1946) modificado por la adición de vitaminas y Fe-EDTA del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 500 mg/l de extracto de banana, 500 mg/l de carbón activado y 20g/l de sacarosa (Apéndice B).

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.5 utilizando un potenciómetro y soluciones de NaOH y de HCl a 0.1, 0.5 y 1N. Posteriormente se agregó a los medios 4 g/l de gelrite. Los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 121° C y 1.5 kg/cm² durante 15 minutos. Todos los medios de cultivo empleados, fueron esterilizados bajo las mismas condiciones.

5.4 Fase de inducción

A partir de la germinación de las semillas **Diagrama 1. (Fig. A)** se obtuvieron estructuras esféricas de color verde denominadas protocormos (**Fig. B**), que fueron utilizados como explantes. Una vez que los protocormos presentaron una etapa de desarrollo más avanzada, caracterizada por presentar un diámetro aproximado de 2-5 mm y la presencia de los primeros primordios foliares, que tenían una longitud de aproximadamente 1-2 mm fueron utilizados como patrón. Bajo condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar y con ayuda de una espátula, los protocormos se

colocaron en una caja petri estéril a la cual se le agregó a su vez un poco de agua destilada esterilizada, en donde se procedió a seccionarlos transversalmente (**Fig. C**), con ayuda de un bisturí y pinzas de disección obteniéndose así, secciones apicales (**Fig. D**) y secciones basales de protocormos (**Fig. E**), caracterizadas por presentar de 1-2 primordios foliares y pequeños rizoides, respectivamente.

Ambas secciones de protocormos, fueron sembradas en cajas petri en medio Murashige & Skoog (1962) modificado, adicionado de distintas concentraciones de reguladores de crecimiento (**Tabla 4**).

El barrido hormonal empleado para inducir una respuesta morfogénica a partir de secciones apicales y basales de protocormos, se constituyó empleando distintas concentraciones de ácido α -naftalenácetico (ANA) 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l y benciladenina (BA) 0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l, dando lugar a 16 combinaciones, sembrando 10 explantes por caja petri obteniéndose así un total de 40 explantes para cada tratamiento.

Tabla 4. Tratamientos hormonales empleados para inducir una respuesta morfogénica, a partir de secciones apicales y basales de protocormos de *Euchile mariae*, cultivadas *in vitro* en medio MS modificado durante 165 días.

| ANA | 0 | 0.1 | 0.5 | 1 |
|----------------|----------|------------|------------|----------|
| BA mg/l | | | | |
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 2 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 3 | 13 | 14 | 15 | 16 |

La siembra de las secciones apicales y basales de protocormos, se realizó colocando la superficie del corte del explante siempre en contacto con el medio de cultivo.

Se llevó a cabo un registro periódico de los cultivos a los 30, 60, 110 y 165 días de incubación para evaluar su crecimiento y desarrollo. Se cuantificó con ayuda de un microscopio estereoscópico el número de PLB's formados por explante para cada tratamiento.

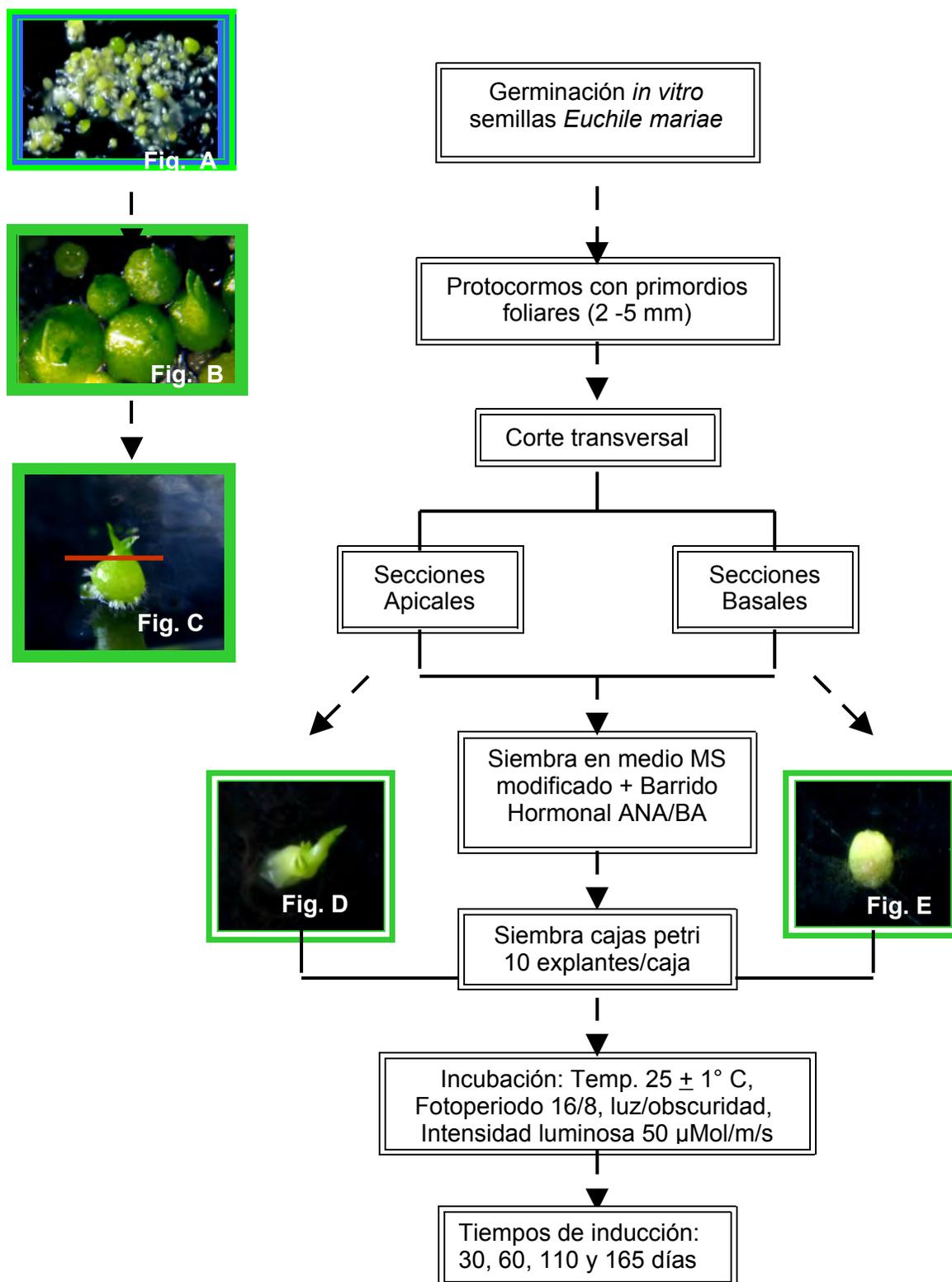


Diagrama 1. Inducción de una respuesta morfogénica a partir de secciones de protocormos de *Euschile mariae*, cultivadas *in vitro* en medio MS modificado.

5.5 Análisis estadístico

Para evaluar el número de PLB's formados por explante, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se aplicó un análisis de Tukey y Kramer (SAS 2000) para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas entre tratamientos.

El análisis se realizó con ayuda del paquete estadístico SAS 2000. JMP Statistic and Graphics Guide. Versión 4. SAS

5.6 Fase de desarrollo e individualización

Una vez concluida la etapa de inducción (después de 165 días de cultivo) y con la finalidad de que la respuesta obtenida continuara su expresión, dentro de la campana de flujo laminar se llevó a cabo la individualización de los PLB's formados a partir de los explantes apicales y basales. Con ayuda de pinzas de disección, se tomaron las masas de PLB's y se colocaron en una caja de petri estéril en donde se individualizaron cada uno de los brotes formados, colocándolos por separado en una caja de petri para posteriormente ser subcultivados en frascos con medio MS basal modificado, con el propósito de que dichos brotes continuaran su crecimiento y desarrollo hasta lograr la formación de plantas completas.

5.7 Condiciones de incubación

Las condiciones de incubación bajo las cuales se mantuvieron los medios con las semillas para su germinación asimbiótica, fueron de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y $50\ \mu\text{Mol/m/s}$ de intensidad luminosa.

Los cultivos con las secciones apicales y basales de protocormos se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo, pero en este caso se redujo inicialmente la intensidad lumínica, cubriendo los cultivos con hojas de papel para evitar que los explantes presentaran una oxidación por efecto del corte, manteniéndolos bajo estas condiciones durante 2 semanas. Posteriormente fueron expuestos a $50\ \mu\text{Mol/m/s}$ de intensidad luminosa, proporcionada por lámparas fluorescentes (luz de día) de 75 W.

5.8 Fase de aclimatización

Se realizó un ensayo de aclimatización con dos lotes de 20 plantas, obtenidas a partir de las secciones apicales y basales de protocormos, después de un periodo de 9 meses de cultivo *in vitro*.

Las plantas regeneradas que presentaron una talla promedio de 4-6 cm de longitud, la presencia de 3 a 6 raíces bien desarrolladas y la formación de al menos un pseudobulbo, se extrajeron de los frascos de cultivo con pinzas de disección, se enjuagaron cuidadosamente con agua destilada tibia para retirar los restos de agar adheridos en las raíces y así evitar una posible contaminación por hongos, se colocaron en charolas de plástico sobre toallas de papel humedecidas con agua destilada, y permanecieron ahí durante 5 días, evitando la luz solar directa.

Los sustratos empleados fueron troncos de encino y tepozán más una mezcla de *Sphagnum* y agrolita en proporción 3:1, humedecido con agua destilada y esterilizado en horno de microondas por 30 minutos. Los troncos de encino y tepozán empleados, fueron previamente desinfectados en agua con cloro comercial, sumergiéndolos durante 24 hrs y finalmente enjuagándolos con agua corriente.

Posteriormente, un lote de 20 plantas fue colocado sobre pequeños troncos de encino y otro lote de 20 plantas se colocó sobre troncos de tepozán de aproximadamente 20-25 cm de longitud, poniendo de 3 a 4 plántulas por tronco, dejando un espacio aproximado de 3 cm entre cada una. Sobre las raíces se agregó una pequeña cantidad del sustrato previamente esterilizado, y a su vez sobre éste fue colocada una porción de gasa adhiriéndola al tronco con hilo de cáñamo, con la finalidad de que cubriera perfectamente las raíces y a su vez permitiera una aireación constante de las mismas.

Las plantas se mantuvieron en un invernadero automatizado con una humedad relativa del 65-80%, con riego cada tercer día para evitar una deshidratación de las mismas, y a una temperatura mínima de 18° C y una máxima de 22 ± 2 °C.

Se evaluó la sobrevivencia de las plantas obtenidas después de 35 días de estar en condiciones *ex vitro*.

5.9 Análisis histológico

Se tomaron muestras de los regenerantes formados a partir de las secciones apicales y basales de protocormos de *E. mariae* después de 35, 65 y 120 días de su cultivo *in vitro*, para realizar un estudio histológico de los mismos con la finalidad de determinar histológicamente las estructuras desarrolladas y corroborar la vía morfogénica obtenida.

El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo a la siguiente metodología.

- a. **Obtención de las muestras.** Se tomaron muestras tanto de secciones apicales como basales de protocormos, considerando aquéllas que presentaran regenerantes en distintas etapas de desarrollo.
- b. **Fijación.** Se utilizó el fijador Navashin, colocándose las muestras en una solución de Navashin A y B en proporción 1:1 durante 24 horas en agitación constante, para después lavar las muestras con agua corriente durante 2 horas.
- c. **Deshidratación.** Se colocaron los tejidos en una serie gradual de soluciones agua-alcohol etílico-alcohol butílico terciario (TBA), en las siguientes concentraciones: 35%, 50%, 60%, 70%, 85%, 95% y TBA absoluto, en éste último se realizaron tres cambios. Las muestras se dejaron 24 horas en cada una de las concentraciones señaladas.
- d. **Infiltración.** Se realizó en una mezcla de TBA absoluto y parafina en partes iguales; las muestras se dejaron en frascos con una cantidad de TBA absoluto que únicamente las cubriera, y posteriormente se agregaron escamas de parafina. Las muestras se colocaron en la estufa a una temperatura de 60° C, en donde se siguieron agregando escamas de parafina cada 15 minutos hasta duplicar el volumen inicial. Los frascos se dejaron destapados con las muestras dentro de la estufa para que se evaporara el TBA y se eliminó la parafina restante 24 horas después. Las muestras se colocaron dentro de la estufa con parafina pura durante 48 horas más.
- e. **Inclusión.** Se realizó en bloques de parafina pura, las muestras fueron colocadas en cajas de papel encerado de 1-2 cm de lado tratando de centrar la muestra, posteriormente se agregó parafina pura líquida hasta cubrir completamente la muestra.
- f. **Cortes histológicos.** Los bloques de parafina con las muestras se colocaron sobre cubos de madera con la finalidad de que éstos dieran soporte. Se realizaron los cortes histológicos con un micrótopo de rotación American Optical 820, a 5 µm de grosor. Se utilizó un baño de flotación que se mantuvo a una temperatura de 45° C, al cual se

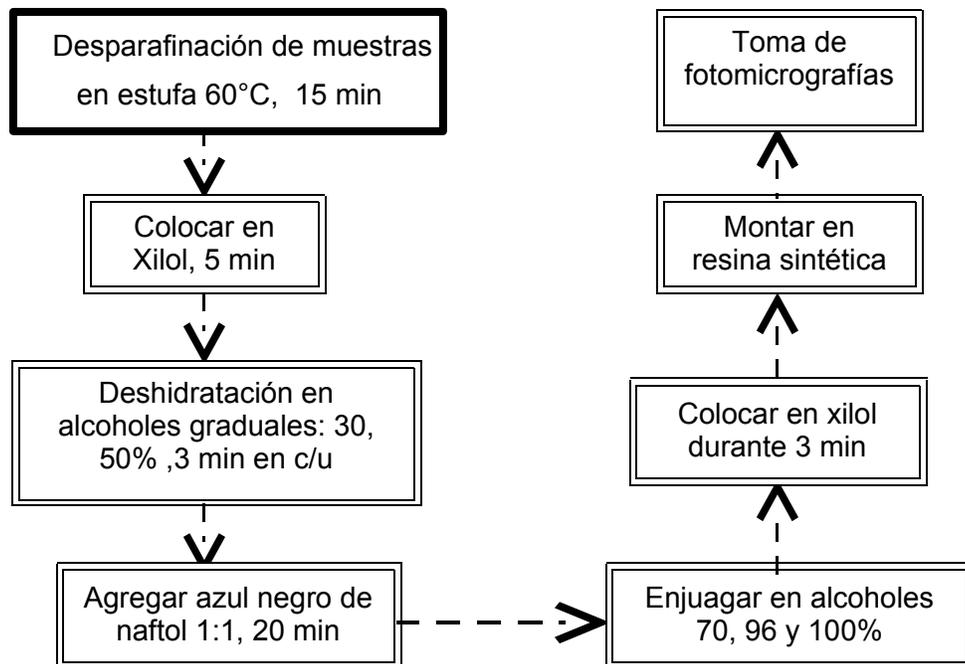
agregó un poco de grenetina hasta que ésta se disolvió completamente, para adherir los cortes histológicos obtenidos a portaobjetos, éstos se dejaron secar durante 24 horas.

- g. Desparafinación.** Los portaobjetos se colocaron con las secciones histológicas obtenidas en canastillas de metal para posteriormente introducirlos en la estufa a 60° C de temperatura durante 30 minutos para que las muestras se desparafinaran.
- h. Rehidratación.** Las preparaciones se sacaron de la estufa y se colocaron durante 15 minutos en una solución de xileno puro y en una mezcla de xileno-alcohol absoluto en proporción 1:1, para posteriormente rehidratar las preparaciones en una serie gradual de alcoholes en orden decreciente durante 15 minutos en cada uno en las siguientes concentraciones: alcohol absoluto, 96, 70, 50 y 30% y finalmente se dejaron en agua destilada por 10 minutos.
- i. Tinción.** Se realizó una doble tinción con safranina O - verde rápido, dejando las preparaciones en safranina durante 24 horas, posteriormente se lavaron con agua destilada y se deshidrataron con una serie gradual de alcoholes en concentraciones de 30, 50, 70 y 96% durante 5 minutos en cada uno. Se colocó verde rápido en cada una de las muestras durante 3 minutos, se realizaron dos cambios de alcohol absoluto durante un minuto cada uno, se agregó aceite de clavo durante 8 minutos y se enjuagó con xilol durante 5 minutos.
- j. Montaje.** Se agregó resina sintética sobre la muestra y se colocó un cubreobjetos sobre ésta. Las preparaciones se dejaron secar durante dos semanas en un horno a 60° C de temperatura.
- k. Limpieza y etiquetado.** Las preparaciones se limpiaron con ayuda de una navaja, algodón y alcohol al 95% para eliminar los restos de colorante y resina. Los portaobjetos se etiquetaron con los siguientes datos: Nombre de la especie, familia a la que pertenece, tipo de corte, estructura, tipo de tinción, nombre del procesador y fecha de elaboración de la muestra.
- l. Toma de fotomicrografías.** Se llevaron a cabo las observaciones y toma de fotomicrografías de las muestras con un microscopio Carl-Zeiss-Axioskop.

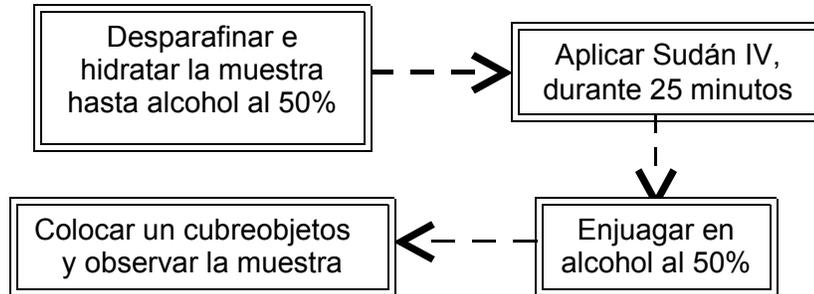
5.10 Pruebas histoquímicas

Una vez determinada la vía de regeneración obtenida para *Euchile mariae* a partir de las secciones apicales y basales de protocormos, se realizaron pruebas histoquímicas para identificar los contenidos celulares presentes en los PLB's, ya que mediante la aplicación de colorantes específicos que reaccionan y producen coloraciones determinadas, es posible reconocer microscópicamente la presencia de distintas sustancias presentes en los tejidos vegetales ya sean como metabolitos primarios, secundarios, formando parte estructural de la célula o como sustancias de reserva (Sandoval, 2005). Las pruebas histoquímicas utilizadas fueron para identificación de proteínas, almidón y lípidos.

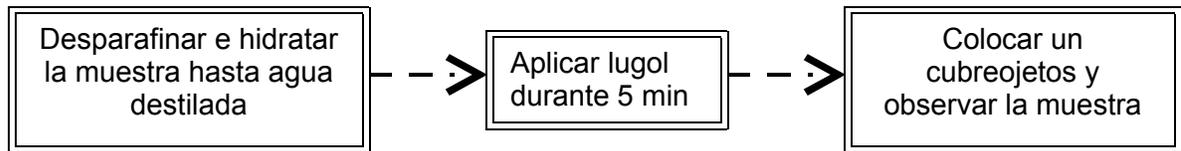
5.10.1 Identificación de proteínas. Se utilizó el reactivo azul negro de naftol para detectar la presencia de proteínas, de acuerdo a la siguiente metodología:



5.10.2 Identificación de lípidos. Para detectar la presencia de lípidos se empleó Sudán IV. Los pasos a seguir son los siguientes:



5.10.3 Identificación de almidón. Se empleó yodo en yoduro de potasio (Lugol) para identificar la presencia de almidón en los tejidos de acuerdo a los siguientes pasos:



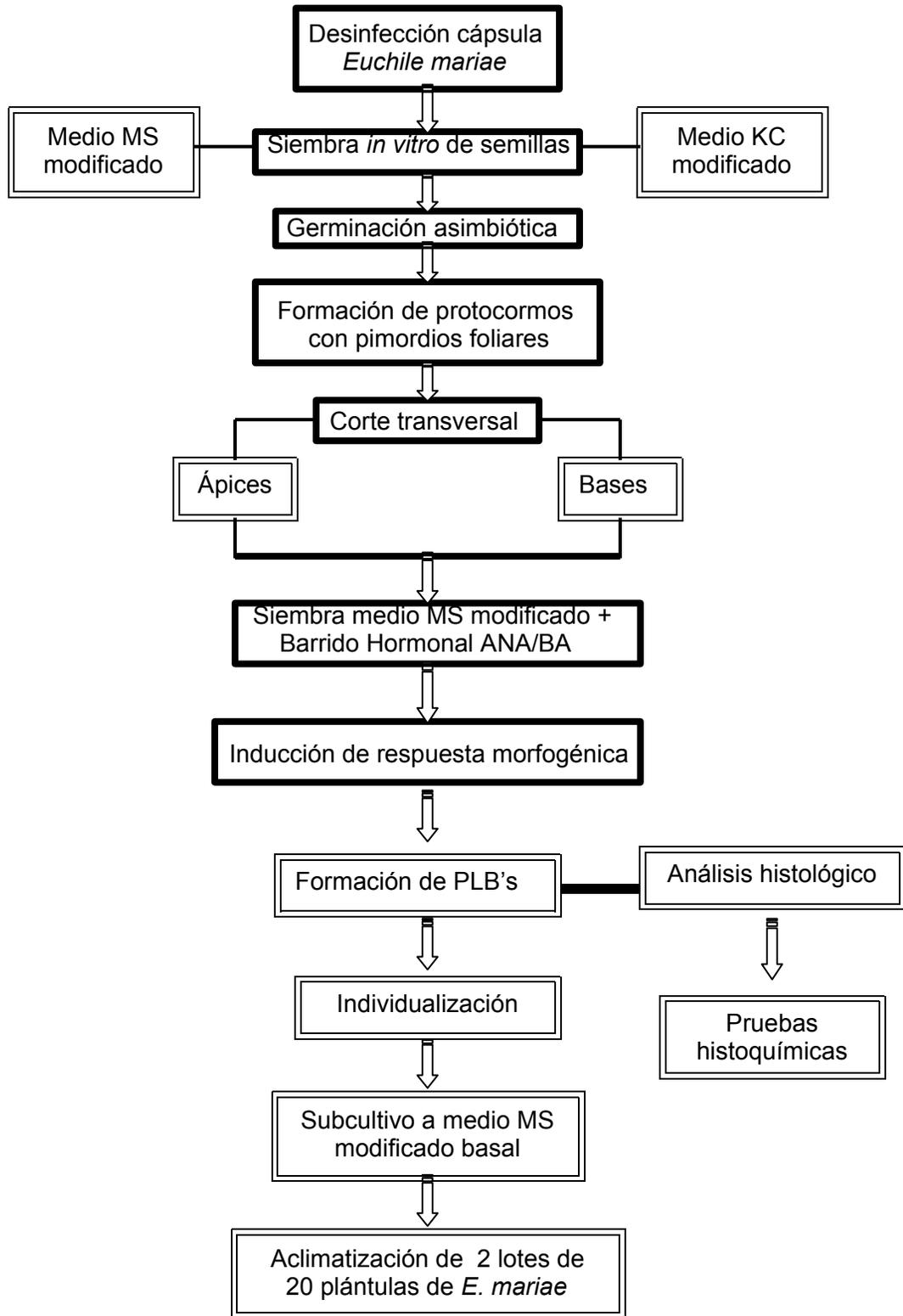


Diagrama 2. Metodología general para la regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* a partir de secciones de protocormos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Material biológico

El fruto de *Euchile mariae* utilizado como material biológico inicial se almacenó en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta el momento de su desinfección. De acuerdo con Arditti, (1967) la longevidad de las semillas de las orquídeas es altamente variable, algunas pueden perder su viabilidad dentro de los primeros nueve meses (Humphreys, 1960), algunas otras en períodos más cortos de dos meses (Brummitt, 1962) o menos si permanecen a temperatura ambiente (Hey, 1963), mientras que otras, pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo si son almacenadas en rangos de temperatura de 4-8° C (Arditti, 1992).

Según Davis (1946), se han encontrado semillas de orquídeas que han germinado después de cuatro años o más si son almacenadas en refrigeración. Martínez (1985), reporta un elevado porcentaje de germinación en semillas de *Bletia urbana* después de 7 años de almacenadas en refrigeración a 8°C. Así mismo, Cornejo (2002) encontró que al almacenar en refrigeración semillas de *Laelia speciosa*, éstas tienen un mayor tiempo de viabilidad, en comparación con las semillas almacenadas a temperatura ambiente, en donde registró una significativa disminución del porcentaje de germinación.

6.2 Desinfección y siembra del material biológico

En la naturaleza, las plantas crecen en un ambiente en el cual se encuentran en contacto constante con un gran número de microorganismos como bacterias y hongos, por lo que antes de iniciar un cultivo *in vitro*, el material vegetal debe de encontrarse libre de contaminantes. Además, para garantizar el éxito de los sistemas de propagación *in vitro* de plantas, se debe evitar la contaminación por microorganismos en su posterior incubación y manipulación (Roca & Mroginski, 1991). Con base en estas observaciones, la cápsula indehisciente de *E. mariae* se desinfectó superficialmente antes de iniciar la siembra *in vitro* de sus semillas.

Para llevar a cabo la desinfección superficial de los explantes, se emplean distintos compuestos químicos, siendo el blanqueador comercial o hipoclorito de sodio (NaOCl), el comúnmente empleado por su efectividad y fácil adquisición (Sweet & Bolton, 1979). El cloro es un agente oxidante que al disolverse en agua produce un ion ClO⁻ que destruye a las bacterias por oxidación de compuestos vitales para ellas (Chang, 1999).

El procedimiento empleado para la desinfección superficial de la cápsula de *E. mariae* utilizando hipoclorito de sodio como agente desinfectante resultó ser eficiente, debido a que se logró establecer su germinación y cultivo en condiciones asépticas, sin presentarse problemas de contaminación en ninguna etapa del cultivo.

Otros de los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de calcio ($\text{Ca}[\text{OCl}]_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el etanol y el cloruro de mercurio HgCl_2 . Los dos primeros se emplean en concentraciones de 1 a 3%, en tiempos de 10 a 20 minutos, el etanol se utiliza de 1-2 min y generalmente al 70% y en combinación con otros desinfectantes, mientras que el cloruro de mercurio se emplea en dosis bajas de 0.1% en tiempos de 1 a 3 minutos por su alta toxicidad (Dodds & Roberts, 1995; Jiménez, 1998).

La sensibilidad de los explantes utilizados varía ante las distintas concentraciones empleadas del agente desinfectante (George & Sherrington, 1984). En nuestros experimentos se utilizó hipoclorito de sodio a una concentración del 30% durante un periodo de 30 minutos debido a que las semillas no se encontraban en contacto directo con la solución desinfectante, ya que se sabe que en el caso de semillas, el empleo de altas concentraciones de agentes desinfectantes por largos periodos de tiempo puede causar un daño al embrión y como consecuencia, reducir el porcentaje de germinación (Sweet & Bolton, 1979).

Cuando se trata de desinfectar semillas individuales se utilizan concentraciones del 10 al 20% de hipoclorito de sodio con tiempos de exposición de 5 a 20 minutos (Constabel & Shyluk, 1994; Santos *et al.*, 2005), si se trata de frutos indehiscentes se pueden emplear concentraciones mayores de hipoclorito de sodio, debido a que el interior de las cápsulas se mantiene estéril si éstas permanecen cerradas. Por lo que, si se esteriliza la parte exterior de las mismas y se abren las cápsulas bajo condiciones de esterilización, las semillas podrán mantenerse estériles (McKendrick, 2002).

6.3 Germinación asimbiótica de semillas de *Euchile mariae*

Las semillas son un explante conveniente a emplear para iniciar un cultivo experimental *in vitro*, a partir de su germinación se logra la obtención de plántulas libres de agentes patógenos (George & Sherrington 1984). Además, para la conservación de especies que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción es recomendable utilizar estructuras que provengan directamente de la germinación de semillas, debido a que se incrementa la diversidad genética de las plantas formadas (Fay, 1994), pues cada una de ellas se origina a partir de la fusión de gametos distintos (Martínez, 1985). Si la germinación de las semillas es baja cuando se utilizan métodos convencionales, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar los porcentajes de germinación (Fay *et al.*, 1999; citado por Salazar, 2003).

Por estas razones el material vegetal empleado para la inducción de brotación múltiple fueron protocormos provenientes de la germinación *in vitro* de semillas de *E. mariae*. De acuerdo con Margara (1988), el empleo de protocormos permite la propagación *in vitro* de orquídeas en un estado precoz del desarrollo, con un nivel de proliferación no igualado por otras especies, por lo que resulta ser un modelo experimental de gran interés para la micropropagación de esta familia de plantas.

Cada género de orquídeas e inclusive cada especie, tienen requerimientos distintos de nutrientes para su desarrollo. En algunos casos, la germinación de las semillas *in vitro* es lenta e ineficiente. Por lo tanto, para mejorar el proceso de germinación y el crecimiento de las plántulas de orquídeas *in vitro*, se han propuesto distintas formulaciones en las que se han modificado los componentes del medio de cultivo y adicionado diferentes complejos orgánicos (Mayer, 1945; Vacin & Went, 1949; Lawrence & Arditti, 1964). En algunas especies de orquídeas, la adición de complejos orgánicos como el extracto de plátano, el agua de coco y de sustancias como el carbón activado al medio, se ha visto que mejoran la germinación de las semillas, así como el crecimiento y desarrollo de las plántulas formadas *in vitro* (Ernst, 1967, 1975; Arditti y Ernst, 1984; Butcher y Marlow, 1989; Rubluo *et al.* 1989; Kerbauy, 1991).

Muchas especies de orquídeas amenazadas o en peligro de extinción han germinado y crecido de esta forma. Por ejemplo, en *Dendrobium spectatissimum*, orquídea que en la actualidad es extremadamente rara en la naturaleza, se logró la germinación de sus semillas y la obtención de un gran número de plantas en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) al 50% adicionado de con carbón activado y en medio KC (Knudson, 1946) también adicionado con carbón activado (Fay, 1994). En *Bletia urbana*

se logró la germinación de sus semillas en medio KC y MS adicionado con complejos orgánicos (Rubluo *et al.*, 1989). Considerando estos aspectos, para obtener una respuesta en la germinación de las semillas de *Euchile mariae* se emplearon dos diferentes medios de cultivo modificados (MS modificado y KC modificado).

Se logró la germinación asimbiótica de las semillas de *E. mariae* en medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) modificado (**Fig. 9b**), así como en medio Knudson C modificado (**Fig. 9c**), registrándose en ambos casos un elevado porcentaje de germinación de las semillas, mayor al 90%. Existen un gran número de trabajos en los que se han reportado altos porcentajes de germinación utilizando frutos no dehiscentes en diferentes géneros de orquídeas (George & Sherrington, 1984). Martínez (1991), reportó la germinación asimbiótica de distintas especies, como *Lycaste aromatica*, *Lycaste skinneri*, *Oncidium maculatum* y *Laelia anceps*, entre otras, utilizando frutos indehiscentes con porcentajes de germinación del 90 y 100%. Rodríguez (2000), logró la germinación de semillas inmaduras provenientes de frutos verdes en dos especies de orquídeas del género *Paphiopedilum* en medio Knudson C. Cornejo (2000), registró para semillas de *Laelia speciosa* provenientes de un fruto indehiscente y sembradas en medio KC modificado por la adición de extractos orgánicos, un 99.5% de germinación. Así mismo, Hernández *et al.*, (2001), reportaron la germinación de semillas de *Laelia anceps* y *Catasetum intergerrinum* cercana al 100% en medio Knudson C a partir de cápsulas indehiscentes.

En el caso de *E. mariae*, una semana después de realizada la siembra de las semillas se observó un cambio en su coloración, inicialmente su aspecto era amarillo pálido, el cual fue tomando una coloración café oscuro. Zettler (1997), señala que la germinación se logra cuando el embrión se hincha y se rompe la testa de la semilla. En nuestros cultivos se observó este comportamiento, apreciándose una hidratación y aumento de tamaño de las semillas (**Fig. 9a**), así como la ruptura de la testa seminal dando lugar a la formación de estructuras esféricas de color verde denominadas protocormos evidenciándose así la germinación. Según Ishii *et al.*, (1998), los protocormos son un órgano único en las orquídeas, y son la primera estructura que se forma durante el desarrollo del embrión de las semillas.

De acuerdo a Vacin y Went (1949), una forma de medir el crecimiento y desarrollo en las orquídeas es considerando un aumento en el diámetro de los protocormos. En nuestros experimentos, después de 30 días de cultivo se observó en el protocormo la formación de los primeros primordios foliares en la parte apical que corresponde al meristemo apical de brote (**Fig. 9d**) y una semana después en la parte basal la aparición

de rizoides, (**Fig. 9e**) en la zona que corresponderá al meristemo apical de raíz. A los 65 días de cultivo se logró la formación de plántulas con la presencia del tercer primordio foliar y de la raíz en la parte basal (**Figs. 9f y g**). Arditti (1967b), reporta este mismo patrón de desarrollo en la germinación de las semillas de orquídeas en general.

De los dos medios de cultivo utilizados para la fase de germinación de las semillas, el medio MS modificado fue en el cual se obtuvo la germinación y desarrollo de los protocormos más rápidamente. La germinación de las semillas de *E. mariae* se registró 15 días después de realizada su siembra, mientras que, en el medio KC modificado, se logró la germinación hasta los 21 días.

Arditti y Ernst (1993), reportan el empleo del medio de cultivo KC como eficiente para lograr la germinación de las semillas en distintas especies de orquídeas. Por otro lado, el medio de cultivo MS originalmente fue desarrollado para aumentar el crecimiento de callo en tabaco. De acuerdo con Arditti y Ernst (1984), el medio MS posee la concentración más alta de sales minerales, además de contener altos niveles de nitrógeno en forma de nitrato de amonio (Razdan, 2002). Por lo tanto, como se trata de un medio rico en sales, se utilizó su fórmula a una concentración menor lográndose así la germinación de las semillas de *E. mariae* en menor tiempo, ya que se ha visto que si se emplea este medio a su concentración original, actúa de forma inhibitoria en la germinación de algunas semillas de orquídeas (Martínez, 1991; Cornejo, 2002).

Se ha reportado en diferentes experimentos realizados en orquídeas, que el medio de cultivo MS favorece la obtención de respuestas morfogénicas en comparación con diferentes medios de cultivo (Kishi y Tagaki, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Bhadra y Hossain, 2003; citados por Baltazar, 2004). Con base en estas observaciones se eligió este medio de cultivo para realizar los distintos tratamientos hormonales con secciones de protocormos.

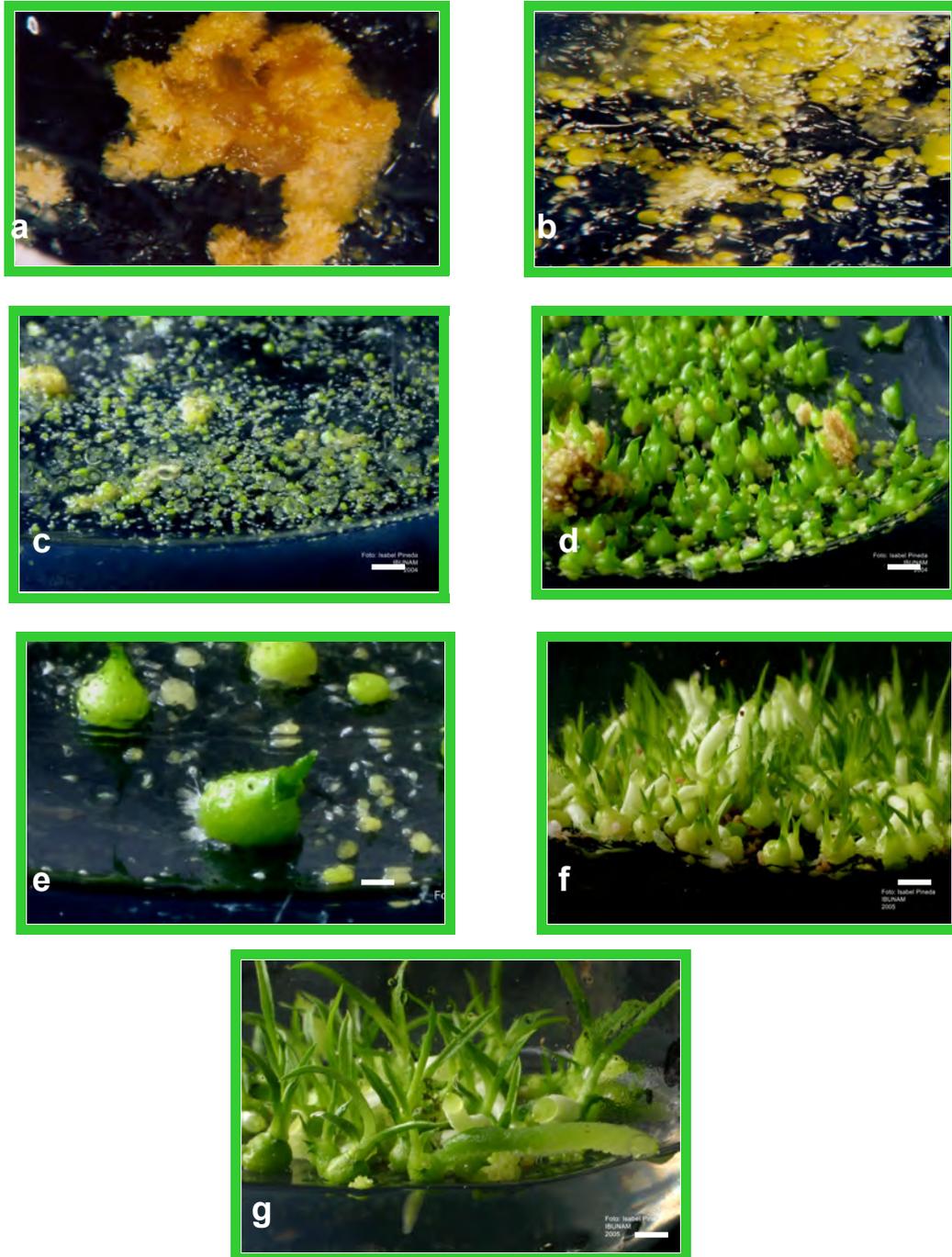


Figura 9. Germinación asimbiótica de semillas y formación de plántulas *in vitro* de *Euchile mariae*. a) Semillas hidratadas, 1.2x, b) Semillas germinadas en medio MS modificado a los 15 días de cultivo, 1.6x, c) Semillas germinadas en medio KC modificado después de 21 días de cultivo, d) Protocormos con primordios foliares, e) Protocormos con primordios foliares y rizoides en la base, f y g) Formación de plántulas mostrando el desarrollo foliar y radicular en medio MS modificado. Barra= 3 mm.

6.4 Fase de inducción

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo favorece el crecimiento y desarrollo del material vegetal *in vitro* (George & Sherrington, 1984). Se requiere de un balance apropiado entre auxinas y citocininas en el medio de cultivo para lograr la formación de plantas a partir del explante utilizado. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citocininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante (Jiménez, 1998).

En el presente trabajo se logró la inducción de brotación múltiple a partir de secciones apicales y basales de protocormos de *Euchile mariae*, cultivadas en medio MS modificado, adicionado con distintas concentraciones de ácido α -naftalenácetico (ANA) y benciladenina (BA).

La respuesta morfogénica obtenida a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos en *Euchile mariae*, fue la misma para las secciones apicales y basales respecto al desarrollo y formación de regenerantes; sin embargo, fue más abundante la formación de éstos en las secciones basales, razón por la que se eligió dicho explante para representar gráficamente los cambios morfológicos observados (**Fig. 10a**).

En ambos explantes utilizados, el primer cambio perceptible fue un aumento de tamaño, así como la presencia de rizoides en la base del explante que se encontraba en contacto con el medio de cultivo (**Fig. 10b**). Posteriormente se pudo apreciar una apariencia nodular en toda la superficie del explante que se hizo evidente a partir de los 30 días de cultivo (**Fig. 10c**).

A los 65 días de cultivo los nódulos formados mostraron un cambio en su tamaño y morfología, éstos comenzaron a adquirir una forma redondeada semejante a la de un protocormo, denominándose a las estructuras formadas cuerpos parecidos a protocormos o PLB's (protocorm like bodies) que surgieron de manera directa del explante (**Fig. 10d**), es decir, sin pasar por la formación de callo. En esta etapa, en algunos de los PLB's formados inició la aparición de los primeros primordios foliares en la región apical que corresponde al meristemo apical de brote, así como la aparición de rizoides en la región basal (**Fig. 10e**). Rangel (1995), reportó la formación de PLB's de manera directa a partir del cultivo de ápices de *Oncidium stramineum* a las cuatro semanas de iniciados los cultivos.

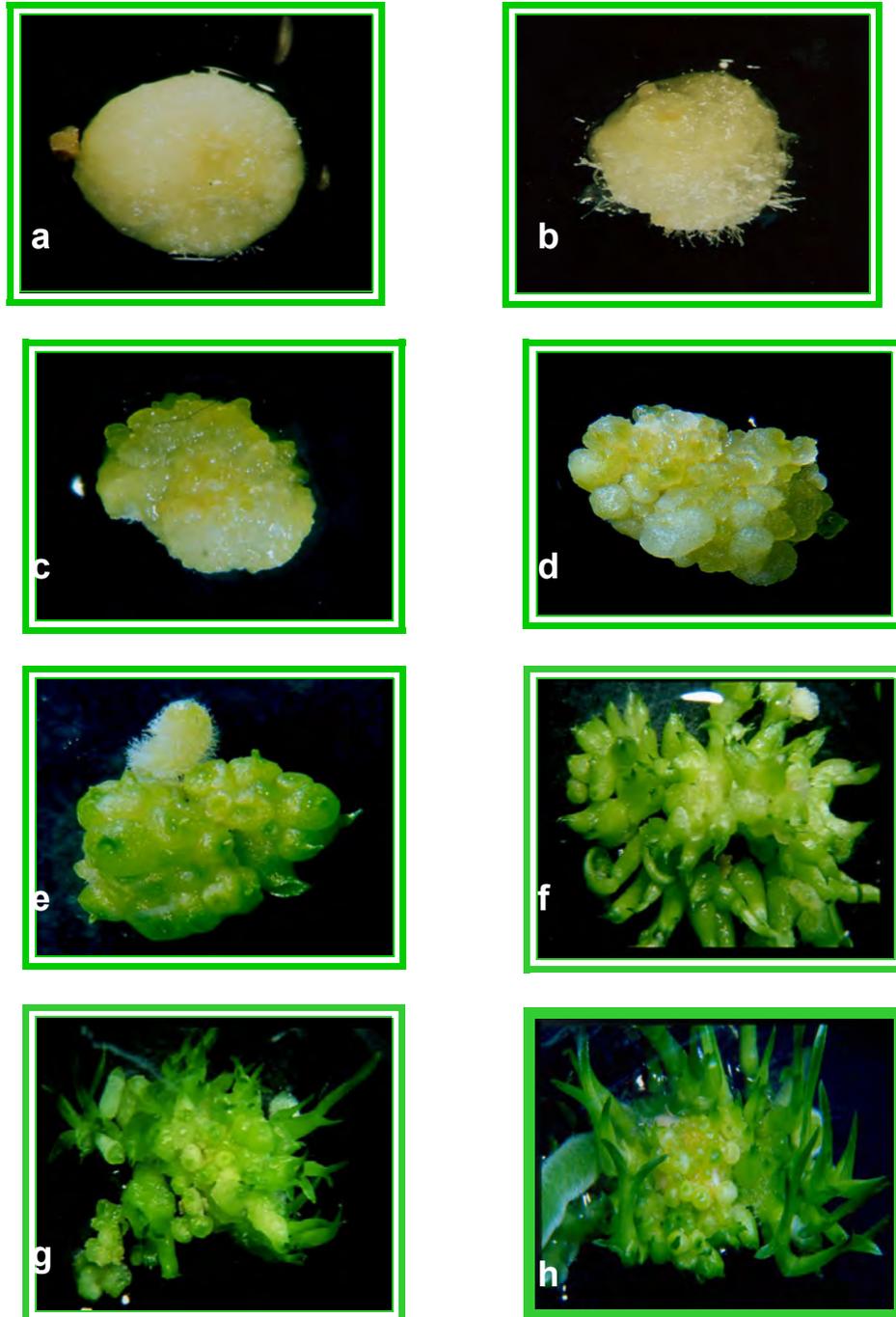


Figura 10. Respuesta morfogénica obtenida a partir del cultivo *in vitro* de secciones basales de protocormos de *Euschile mariae* en medio MS modificado. a) Vista superior explante inicial, 2.0x, b) Hinchamiento del explante y presencia de rizoides, a los 15 días, 1.6 x, c) Desarrollo de nódulos en la superficie del explante a los 30 días, 2.0x, d) Formación directa de PLB's a partir del explante, a los 65 días, 2.0x, e) Formación de primordios foliares en la parte apical de los PLB's y de rizoides en la parte basal, a los 65 días, 0.6x f) Elongación de los PLB's, a los 120 días, 0.6x, g) Presencia de raíces, a los 120 días, 0.8 x, h) Desarrollo foliar y radicular, a los 165 días, 0.8x.

A los 120 días de cultivo, era notoria la elongación que estaba iniciando en los PLB's formados, puesto que presentaban una forma ovalada (**Fig. 10f**), los primordios foliares continuaron su crecimiento (0.3-0.5 cm de longitud) y comenzó la aparición de la primer raíz (0.3-0.5 cm) en la región basal que corresponde al meristemo apical de raíz (**Fig. 10g**). A los 165 días de cultivo, los PLB's presentaban hojas más desarrolladas de mayor tamaño (0.5 -1.0 cm) y de igual forma se incrementó el tamaño de la raíz (1-1.5 cm) (**Fig. 10h**). El mismo patrón morfogénético a partir del cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* y *Catasetum intergerrimum* fue observado por Hernández *et al.*, (2001), por Salazar (2003), al cultivar protocormos de *Cuitlautzina pendula* y *Lycaste skinneri*, y por Baltazar (2004), al cultivar mitades de protocormos de *Oncidium tigrinum*.

Por otra parte, la formación de PLB's observada en ambos explantes (apicales y basales) fue una producción primaria, es decir, los PLB's registrados una vez concluida la etapa de expresión, eran los mismos PLB's formados durante el periodo de inducción, no observándose una segunda generación de PLB's. Cabe señalar que hasta esta etapa los PLB's formados permanecieron unidos al explante; sin embargo, éstos eran fácilmente disgregables del explante original, lo cual facilitó su posterior individualización.

6.4.1 Cultivo *in vitro* de mitades de protocormos en medio MS modificado sujetos a la interacción de ANA y BA

La respuesta morfogénética obtenida durante el cultivo *in vitro* en los dos explantes ensayados (ápices y bases de protocormos) fue la producción de PLB's, cambiando únicamente el número de PLB's finales formados, así como su velocidad de formación. Desde el inicio de los cultivos, se observó un crecimiento y proliferación continuos en todo el tejido que conformaba al explante; sin embargo, la formación de los PLB's fue asincrónica.

La región en la cual comenzó a darse una mayor diferenciación y crecimiento de los PLB's en ambas secciones de protocormos, fue hacia los bordes del explante, mientras que hacia la zona central se encontraban los PLB's menos desarrollados, es decir, mientras que hacia los bordes se encontraban cuerpos parecidos a protocormos con la presencia de 2 a 4 primordios foliares y una raíz, en la parte central, apenas iniciaba la aparición de los primeros primordios foliares hacia la zona del meristemo apical de brote (**Fig. 11**).

Lin (1986), observó la formación de PLB's en *Phalaenopsis* y *Doritaenopsis*, a partir de la epidermis, así como de las heridas superficiales de entrenudos de inflorescencias. Kerbauy (1993), reportó la formación de PLB's en *Oncidium varicosum* exclusivamente de la zona más externa de los explantes (ápices de raíz). Chen *et al.*, (1999), a partir del cultivo de hojas de *Oncidium* Gower Ramsey, también observaron la formación de agregados de PLB's de manera directa, a partir de las células epidérmicas y de las heridas superficiales del explante. Así mismo, Baltazar (2004), que cultivó mitades de protocormos de *Oncidium tigrinum*, reportó la formación de los primeros PLB's a partir de la zona disectada del explante que estaba en contacto directo con el medio de cultivo o bien a partir de la región epidérmica del mismo.

Lo anterior, se puede explicar porque hacia los bordes del explante las células más externas son las que están en contacto más directo con los nutrientes y reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo, en comparación con las células de la zona central del explante, en donde la competencia por el espacio y los nutrientes es mayor y por consiguiente el crecimiento y desarrollo es más lento. Así mismo, es muy probable que en la periferia de los explantes se encuentren múltiples células competentes (para formar nuevos PLB's) que no tengan una especialización definida.

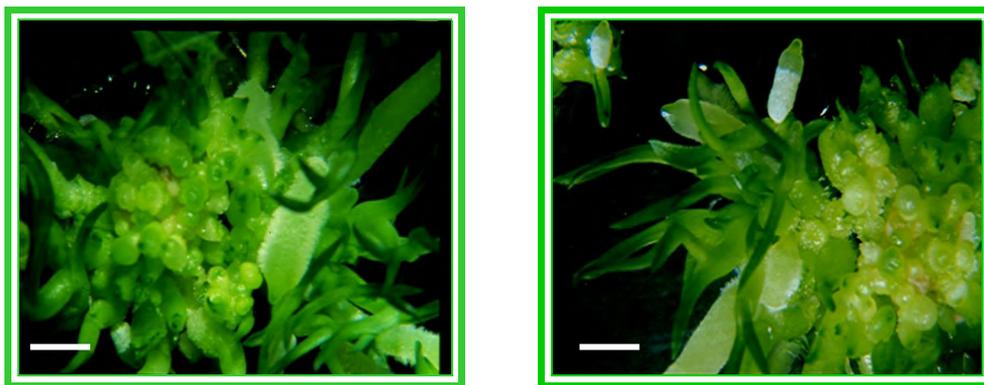


Figura. 11. Formación asincrónica de cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) originados de manera directa a partir de mitades basales de protocormos de *Eucharis mariae* cultivadas *in vitro* a los 120 días de cultivo en medio MS modificado. Barra = 1 cm.

La inducción de una respuesta morfogénica en *Euchile mariae*, a partir del cultivo de mitades de protocormos (apicales y basales) en medio MS modificado, fue diferencial respecto al número de PLB's formados. En la mayoría de las secciones apicales se observó oxidación y necrosis de los explantes, por lo que a partir de éstas fue menor el número de PLB's obtenidos (**Figs. 12 a, b y c**), mientras que las secciones basales fueron las que presentaron una mejor respuesta a la inducción en los diferentes tratamientos, dado que en éstas fue en donde se observó una elevada sobrevivencia de los explantes así como la formación de un mayor número de PLB's por explante (**Figs. 12 d, e y f**).

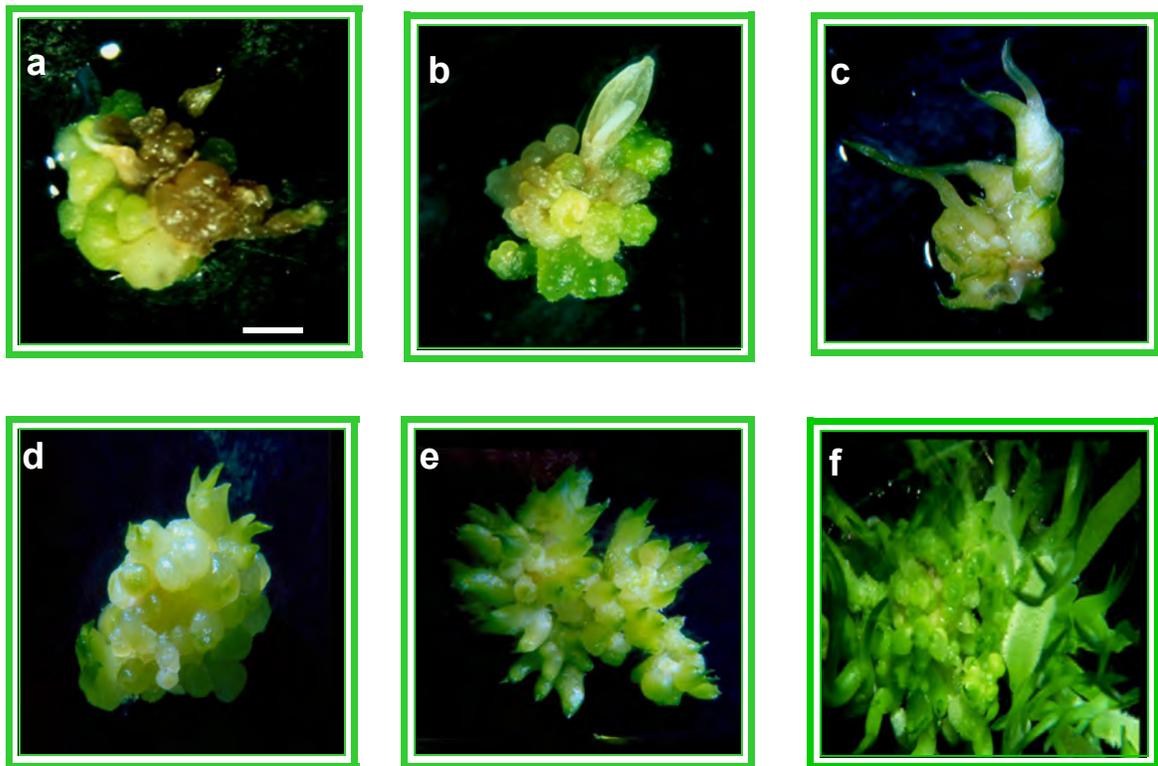


Figura 12. Formación de PLB's en *Euchile mariae* a partir de secciones apicales y basales de protocormos cultivadas *in vitro* en medio MS modificado. a, b y c) Formación directa de PLB's a partir de secciones apicales de protocormos de *E. mariae*. d, e y f) Formación de PLB's de manera directa a partir de secciones basales de protocormos de *E. mariae*. Barra = 1 cm.

Morel (1974), demostró que a partir del cultivo *in vitro* de meristemos apicales de *Cymbidium* se formaban masas de cuerpos semejantes a protocormos (PLB's), los cuales podían ser seccionados y colocados nuevamente en un medio nutritivo, dando lugar así a la formación de un gran número de PLB's que a su vez podían seccionarse nuevamente hasta formar más PLB's, por lo que a partir de un sólo meristemo, era posible generar

PLB's de manera exponencial, pero en estos reportes no se explica una diferencia en la respuesta entre las fracciones de los protocormos seccionados.

Martínez (1985), reportó la inducción de brotación múltiple a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos en *Bletia urbana*, encontrando una diferencia en la respuesta de los dos explantes utilizados, siendo las regiones basales las que presentaron una mayor potencialidad con respecto a las regiones apicales, para originar brotación múltiple. La dominancia apical se expresa en las secciones apicales al registrarse una menor respuesta en la inducción de brotes.

En nuestros experimentos, la respuesta morfogénica obtenida a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Euchile mariae* resulta ser diferencial dependiendo de la región del protocormo de que se trate. Estos resultados se pueden explicar considerando los siguientes aspectos: 1) diferenciación celular, 2) dominancia apical y 3) reguladores de crecimiento. Hacia el ápice existe una mayor diferenciación celular de los tejidos que conforman al protocormo; puesto que en esta zona se forma el primer meristemo que dará origen al resto de las estructuras que conformarán a la planta, que corresponde al meristemo apical de brote. Morel (1960), investigó la totipotencialidad del meristemo apical en orquídeas y señala que en muchas especies este órgano es capaz de regenerar nuevas plantas. Sin embargo, como se trata de una región de crecimiento activo es probable que no permita la formación de otros centros meristemáticos o bien de otras yemas laterales que pudieran estar presentes; mientras que, hacia la base del protocormo el tejido se encuentra menos diferenciado y por lo tanto presenta una mayor capacidad morfogénica. Según Jiménez (1998), a medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*.

Por otra parte, la remoción del meristemo apical de brote generalmente resulta en el crecimiento de una o más yemas laterales (Taiz, 1998), por lo que una vez que se rompe la dominancia apical, las células basales presentan un mayor grado de plasticidad morfogénica y a su vez, éstas presentan un menor grado de determinación genética, para sufrir un proceso de rediferenciación celular hacia una ruta de desarrollo y formar varios centros meristemáticos que den lugar al surgimiento de yemas laterales y por tanto, a la formación de nuevos brotes a partir del tejido. Así mismo, estas capacidades se logran potenciar por la adición de reguladores de crecimiento vegetal al medio de cultivo, los cuales estimulan la división celular y por consiguiente la formación de nuevos PLB's.

Se ha reportado que la interacción de auxinas y citocininas es necesaria para inducir la división celular y el crecimiento en el cultivo de los tejidos vegetales (Skoog y

Miller, 1957; citados por Gaspar *et al.*, 2003). Así mismo, se ha establecido que el mecanismo que inhibe la formación de yemas laterales en el ápice de una planta, está regulado por la producción de auxinas en el mismo, las cuales suprimen el crecimiento de las yemas laterales presentes en el tejido, mientras que, las citocininas estimulan el crecimiento de dichas yemas y permiten liberar la dominancia apical (Sachs y Timan, 1967; citados por Gaspar *et al.*, 2003). Sin embargo, la respuesta a los reguladores de crecimiento vegetal para influenciar la formación de PLB's, dependerá a su vez de la composición mineral y orgánica del medio de cultivo, de la presencia de compuestos orgánicos, del tipo de fuente de carbono presentes en el medio y del estado fisiológico del explante.

Existen especies de orquídeas en las que el empleo de protocormos enteros favorece la formación de un mayor número de PLB's. Rodríguez (2000), reportó que la respuesta obtenida a partir de secciones longitudinales de protocormos en *Paphiopedium exstaminodium* y *Paphiopedilum caudatum* fue nula, por lo que sugiere el empleo de protocormos completos o de algún otro explante para la micropropagación de orquídeas del género *Paphiopedilum*. Baltazar (2004), también reportó la formación de un mayor número de PLB's en *Oncidium tigrinum*, a partir del cultivo de protocormos enteros, en comparación con el número de PLB's obtenidos a partir de mitades de protocormos en medio MS y KC.

Sin embargo, distintos trabajos realizados con secciones de protocormos, han mostrado resultados satisfactorios. Arditti (1967), reportó que al mutilar o seccionar protocormos, los fragmentos obtenidos de éstos dan lugar a la formación de nuevos protocormos y finalmente plántulas. Esta capacidad puede ser interpretada como parte de la naturaleza embrionaria de las células de los protocormos. Esto representa un método útil de propagación, en donde a partir de pocas semillas o protocormos, es posible obtener una producción masiva. Margara (1984), también señaló que la fragmentación de protocormos provocó la formación de protocormos adventicios a partir de tejidos superficiales. En *Dendrobium* a partir del cultivo de meristemas se logró la formación de PLB's, que al ser seccionados tanto longitudinal como transversalmente, dieron lugar a la formación de un gran número de PLB's adicionales (Sagawa y Shoji, 1967). Los resultados obtenidos en este estudio a partir del análisis de varianza (ANOVA) sugieren el empleo de secciones de protocormos en especies como *Euchile mariae*, ya que a partir de estos explantes se favorece la formación un gran número de PLB 's.

Al analizar el efecto de las secciones apicales con respecto a las secciones basales, con base a la formación de PLB's por explante, tomando el conjunto de todos

los tratamientos, se estableció una diferencia significativa. Se observó que la mayor formación de PLB's se obtuvo a partir de las secciones basales de los protocormos, donde se desarrollaron en promedio 11.44 ± 9.64 PLB's por explante. La formación de PLB's a partir de las secciones apicales fue menor, desarrollándose en promedio 4.98 ± 5.33 PLB's por explante (**Tabla 5**).

Tabla 5. Promedio total de PLB's generados por explante, a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Euchile mariae*, en medio MS modificado a los 165 días.

| Explante | Promedio de PLB's \pm D. S. |
|--------------------|---|
| Secciones apicales | 4.98 ± 5.33 |
| Secciones basales | 11.44 ± 9.64 |

D. S. = Desviación estándar
 PLB's= Cuerpos parecidos a protocormos

6.4.2 Formación de PLB's a partir de mitades de protocormos en medio de cultivo MS modificado

6.4.3 SECCIONES APICALES DE PROTOCORMOS

La gráfica 1 muestra el promedio de PLB's obtenidos a partir de las secciones apicales de protocormos, como resultado de la interacción de distintas concentraciones de ANA y BA, a los 30, 60, 110 y 165 días de cultivo. De manera general se observó una relación directa entre el tiempo y la tasa de formación de PLB's, es decir, el número de

PLB's generados a partir de los explantes apicales se incrementó conforme transcurrió el tiempo.

Al analizar los resultados obtenidos de la interacción de ANA y BA sobre la formación de PLB's por explante en cada uno de los tratamientos, se registró una diferencia altamente significativa ($p \leq 0.0001$), entre las diferentes concentraciones empleadas a los 30, 60, 110 y 165 días de cultivo.

A los 30 días de cultivo el mayor número de PLB's se formó en el tratamiento adicionado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BA obteniéndose un promedio de 1.60 ± 1.59 PLB's por explante. El segundo mejor tratamiento respecto al número de PLB's formados fue el que presentaba 3 mg/l de BA en ausencia de ANA donde se desarrollaron en promedio 1.42 ± 1.46 PLB's por explante. Por otro lado, las combinaciones en las cuales se obtuvieron las menores cantidades de PLB's fueron con 0.1 mg/l de ANA en ausencia de BA, formándose un promedio de 0.25 ± 0.54 PLB's por explante y con 1 mg/l de ANA en ausencia de la citocinina formándose un promedio de 0.17 ± 0.44 PLB's (**Tabla 6**).

Gráfica 1. Formación in vitro de PLB's, a partir de secciones apicales de protocormos de *Euchile mariae*, en medio MS modificado en combinación con ANA y BA, en 4 tiempos de evaluación.

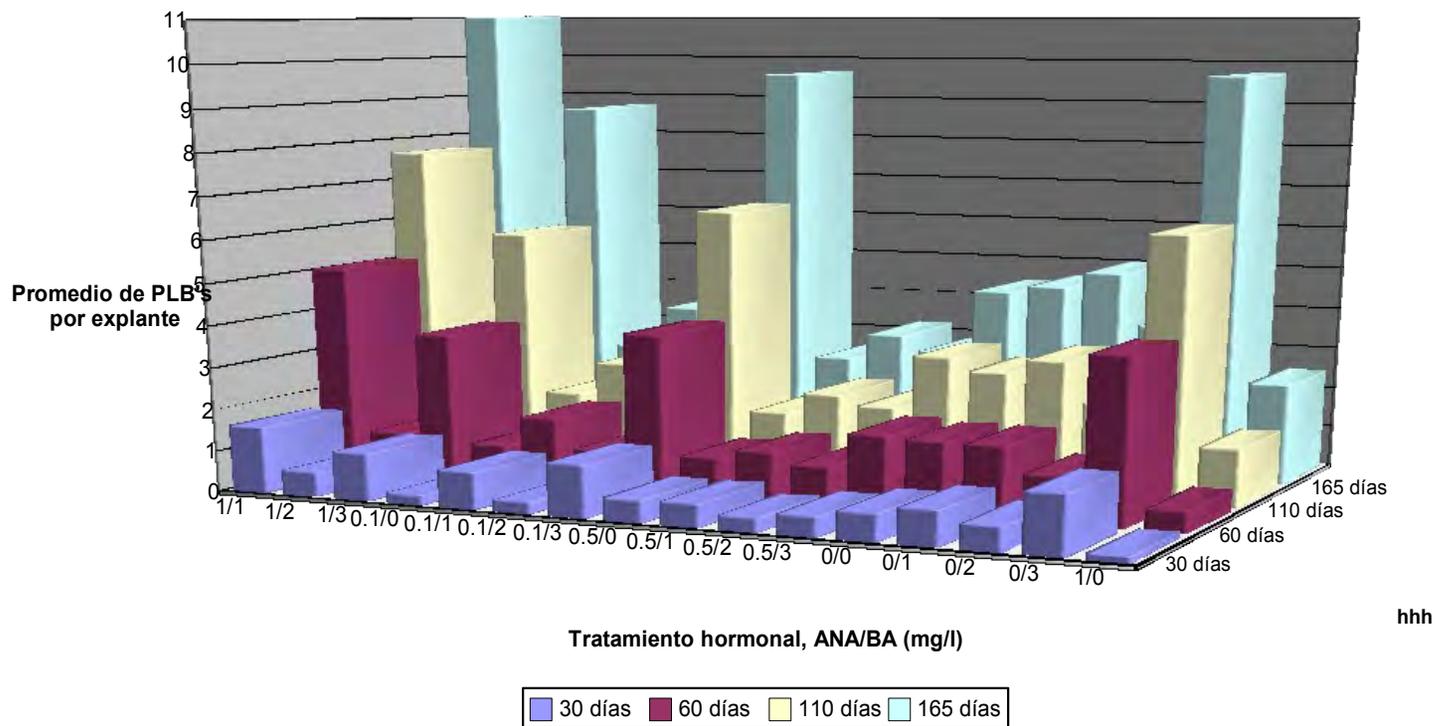


Tabla 6. Promedio de PLB's generados por explante a los 30 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones apicales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante \pm D.S. |
|------------------------------------|-------------------|---|
| 1/1 | 64 | 1.60 \pm 1.59^a |
| 0/3 | 57 | 1.42 \pm 1.46^a |
| 0.1/3 | 51 | 1.27 \pm 1.97^{ab} |
| 1/3 | 46 | 1.15 \pm 1.68^{abc} |
| 0.1/1 | 36 | 0.90 \pm 1.05^{bcd} |
| 0/1 | 34 | 0.85 \pm 1.12^{bcd} |
| 0/0 | 27 | 0.67 \pm 0.91^{cd} |
| 1/2 | 21 | 0.60 \pm 0.91^{cd} |
| 0/2 | 24 | 0.60 \pm 0.84^{cd} |
| 0.5/1 | 23 | 0.57 \pm 0.93^{cd} |
| 0.5/0 | 22 | 0.55 \pm 0.78^{cd} |
| 0.5/3 | 20 | 0.50 \pm 0.84^{cd} |
| 0.5/2 | 14 | 0.35 \pm 0.62^d |
| 0.1/2 | 12 | 0.30 \pm 0.56^d |
| 0.1/0 | 10 | 0.25 \pm 0.54^d |
| 1/0 | 7 | 0.17 \pm 0.44^d |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)
D. S.= Desviación estándar
PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

A los 60 días de cultivo los mejores resultados coincidieron con los encontrados a los 30 días de cultivo, formándose un promedio de 5.05 ± 4.66 PLB's por explante con un 1mg/l de auxina y 1mg/l de citocinina y un promedio de 3.92 ± 3.51 PLB's con solo 3 mg/l de BA, en ausencia de auxina. Las concentraciones hormonales en que se formaron el menor número de PLB's fueron con 0.1 mg/l de ANA y sin la adición de BA con un promedio de 0.91 ± 1.31 PLB's y 0.52 ± 1.19 PLB's con sólo 1 mg/l de ANA sin BA (Tabla 7).

Tabla 7. Promedio de PLB's generados por explante a los 60 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones apicales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante \pm D.S. |
|------------------------------------|-------------------|--|
| 1/1 | 202 | 5.05 ± 4.66 ^a |
| 0/3 | 157 | 3.92 ± 3.51 ^a |
| 0.1/3 | 153 | 3.82 ± 5.38 ^{ab} |
| 1/3 | 142 | 3.55 ± 4.37 ^{abc} |
| 0.5/3 | 71 | 1.77 ± 2.35 ^{bcd} |
| 0/0 | 69 | 1.72 ± 1.97 ^{cd} |
| 0/1 | 69 | 1.72 ± 2.18 ^{cd} |
| 0.1/1 | 66 | 1.65 ± 1.68 ^{cd} |
| 0.5/1 | 48 | 1.20 ± 1.95 ^d |
| 0/2 | 45 | 1.12 ± 1.63 ^d |
| 1/2 | 42 | 1.05 ± 1.41 ^d |
| 0.5/0 | 39 | 0.97 ± 1.29 ^d |
| 0.1/2 | 39 | 0.97 ± 1.09 ^d |
| 0.5/2 | 38 | 0.95 ± 1.70 ^d |
| 0.1/0 | 32 | 0.91 ± 1.31 ^d |
| 1/0 | 21 | 0.52 ± 1.19 ^d |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)

D. S.= Desviación estándar

PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

A los 110 días de cultivo con el empleo de 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BA se indujo un promedio de 7.67 ± 6.91 PLB's por explante. El siguiente mejor tratamiento fue al utilizar 0.1 mg/l de ANA y 3 mg/l de BA formándose un promedio de 6.45 ± 8.58 PLB's, mientras que en los tratamientos en los cuales se formaron el menor número de PLB's fueron con 0.1 mg/l de ANA y sin BA (2.55 ± 3.78), con 0.5 mg/l de ANA en ausencia de BA formándose un promedio de 1.57 ± 2.06 PLB's y con 1 mg/l de ANA también en ausencia de BA la formación de PLB's por explante fue de 1.40 ± 2.37 (Tabla 8).

Tabla 8. Promedio de PLB's generados por explante a los 110 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones apicales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante \pm D.S. |
|------------------------------------|-------------------|---|
| 1/1 | 307 | 7.67 ± 6.91^a |
| 0.1/3 | 258 | 6.45 ± 8.58^{ab} |
| 0/3 | 251 | 6.27 ± 5.06^{ab} |
| 1/3 | 228 | 5.70 ± 6.21^{abc} |
| 0/1 | 129 | 3.22 ± 3.45^{bcd} |
| 0.5/3 | 127 | 3.17 ± 4.30^{bcd} |
| 0/0 | 115 | 2.87 ± 3.04^{cd} |
| 0.1/1 | 103 | 2.57 ± 2.35^{cd} |
| 0/2 | 90 | 2.25 ± 2.85^d |
| 0.5/1 | 84 | 2.10 ± 3.11^d |
| 0.1/2 | 77 | 1.92 ± 1.83^d |
| 0.5/2 | 75 | 1.87 ± 2.83^d |
| 1/2 | 62 | 1.77 ± 2.17^d |
| 0.1/0 | 70 | 1.75 ± 2.14^d |
| 0.5/0 | 63 | 1.57 ± 2.06^d |
| 1/0 | 56 | 1.40 ± 2.37^d |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)

D. S.= Desviación estándar

PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

A los 165 días de cultivo el mejor tratamiento en cuanto al número de PLB's formados fue el que presentaba 1 mg/l en ambos tipos de reguladores empleados (ANA y BA) dando lugar a un promedio de 11.00 ± 9.55 PLB's por explante. Los siguientes mejores resultados se encontraron en los tratamientos que presentaban 3 mg/l de BA con diferentes concentraciones de ANA, mientras que en los tratamientos sin citocinina con diferentes concentraciones de ANA fueron en los cuales se obtuvieron el menor número de PLB's, obteniéndose el promedio más bajo (2.45 ± 2.69) al utilizar 1 mg/l de ANA sin presencia de BA (**Tabla 9**). Estos resultados coinciden con los encontrados por Salazar (2003), quien reportó el mayor promedio de brotes por explante, a partir del cultivo de protocormos de *Mormodes tuxtlensis* al utilizar una concentración de 3 mg/l de BA. Así mismo, señala que la formación de brotes fue directamente proporcional al incremento en las concentraciones de citocininas, de manera que las concentraciones más altas de BA (1, 2 y 3 mg/l) principalmente en ausencia de ANA, presentaron los promedios de brotes por explante más altos.

Tabla 9. Promedio de PLB's generados por explante a los 165 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones apicales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante \pm D.S. |
|------------------------------------|-------------------|---|
| 1/1 | 440 | 11.00 ± 9.55^a |
| 0/3 | 388 | 9.70 ± 8.06^a |
| 0.1/3 | 385 | 9.62 ± 11.79^a |
| 1/3 | 348 | 8.70 ± 9.07^{ab} |
| 0/1 | 199 | 4.97 ± 5.31^{bc} |
| 0/0 | 183 | 4.57 ± 4.34^{bc} |
| 0.5/3 | 176 | 4.40 ± 6.18^{bc} |
| 0/2 | 149 | 3.72 ± 4.46^c |
| 0.1/1 | 145 | 3.62 ± 3.29^c |
| 0.5/1 | 127 | 3.17 ± 4.57^c |
| 0.1/2 | 123 | 3.07 ± 2.67^c |
| 1/2 | 100 | 2.85 ± 2.86^c |
| 0.5/2 | 113 | 2.82 ± 3.67^c |
| 0.1/0 | 102 | 2.55 ± 3.78^c |
| 0.5/0 | 101 | 2.52 ± 2.91^c |
| 1/0 | 98 | 2.45 ± 2.69^c |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)

D. S.= Desviación estándar

PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

Al analizar el efecto de la interacción entre los dos reguladores de crecimiento ensayados (ANA y BA), sobre la formación de PLB's a partir de las secciones apicales de protocormos, se observó que la mayor formación de brotes desde las primeras cuatro semanas de inducción hasta la última toma de datos realizada, fue cuando se encontraba presente en el medio de cultivo la misma concentración de auxina y de citocinina (1 mg/l). Resultados similares fueron observados en el cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* donde obtuvieron la mayor formación de brotes por explante en cultivos en medio Knudson C adicionado con 0.5 mg/l de BA y con 1 mg/l de ANA (Hernández *et al.*, 2001).

En el resto de los tratamientos hormonales empleados se observó de manera general, que la mayor formación de PLB's por explante se obtuvieron cuando se encontraba presente en el medio de cultivo una concentración mayor de BA con respecto a la concentración de ANA, principalmente en los tratamientos en los que se empleó 3 mg/l de BA en combinación con diferentes concentraciones de auxina, mientras que en los tratamientos en los cuales no estaba presente la citocinina, se obtuvieron los valores más bajos respecto al número de PLB's por explante. La función del ANA al parecer no jugó un papel preponderante en la formación de PLB's, inclusive en algunos casos inhibió el desarrollo de los mismos, como en el caso de los tratamientos que contenían 1mg/l de ANA (**Tablas 6, 7, 8 y 9**). Taiz (1998), establece que la aplicación directa de citocininas al medio de cultivo estimula el crecimiento de yemas laterales en muchas especies, anulando el efecto inhibitor del meristemo apical de brote.

Los resultados obtenidos se asemejan a los reportados en la literatura para distintos géneros de orquídeas. Pierik y Steegmans (1972), encontraron que altas concentraciones de bencilaminopurina (10^{-6} y 10^{-5} M) favorecen la formación de PLB's y plántulas de *Cattleya aurantiaca*, mientras que a bajas concentraciones de BA (10^{-8} y 10^{-7} M) las plántulas no producen PLB's o brotes adventicios. Mauro *et al.* (1994), sugieren utilizar altas concentraciones de BA y bajas concentraciones de ANA para lograr la formación de un gran número de brotes y PLB's en *Cattleya aurantiaca* en medio MS, encontrando la máxima formación de PLB's utilizando 10 mg/l de BA en combinación con 0.1 mg/l de ANA. Martínez (1985), obtuvo el 100% de respuesta con brotación múltiple a partir del cultivo *in vitro* de regiones apicales de protocormos de *Bletia urbana* utilizando una concentración de 5 μ M de BA (1mg/l). Así mismo, observó que en ausencia de BA o a una concentración de 20 μ M (4mg/l) se inhibe o disminuye la brotación múltiple. Torres y Mogollón (2000), detectaron una tendencia al incremento del número de brotes en

Cattleya mossiae al aumentar la concentración de TDZ, encontrando la mayor formación de brotes a concentraciones de 1 y 3.3 $\mu\text{M/L}$ de TDZ. Así mismo, Ranjan *et al.*, (1997), lograron incrementar el número de brotes en *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* y *Dendrobium moschatum* al incrementar la concentración de TDZ en el medio de cultivo. Chen y Chang (2000), al utilizar únicamente ANA en concentraciones de 0.1 y 1 mg/l de ANA no obtuvieron un resultado significativo en la formación de PLB's a partir del cultivo de callo en *Oncidium*. Sin embargo, al emplear un concentración baja de ANA (0.1 mg/l) en combinación con concentraciones mayores de TDZ (0.3, 1 ó 3 mg/l) observaron un incremento significativo sobre la formación de PLB's.

6.4.4 SECCIONES BASALES DE PROTOCORMOS

En la gráfica 2 se observan los resultados obtenidos de la interacción entre ANA y BA, respecto a la formación de PLB's a los 30, 60, 110 y 165 días de cultivo, a partir de las secciones basales de protocormos. De igual forma que en el caso de las secciones apicales se encontró una relación directa entre el tiempo y el promedio de PLB's formados.

Al analizar estadísticamente la formación de PLB's por explante en cada uno de los tratamientos como resultado de la interacción de ANA y BA, se pudo establecer una diferencia altamente significativa ($p \leq 0.0001$) a los 30, 60, 110 y 165 días de cultivo, entre las diferentes concentraciones ensayadas.

En las secciones basales la respuesta al cultivo *in vitro* desde las primeras cuatro semanas de inducción hasta la última observación realizada (165 días) fue elevada, pero dicha respuesta varió dependiendo de la concentración de reguladores de crecimiento empleados.

En la tabla 10 se puede observar que a los 30 días de cultivo, el mayor número de PLB's se formaron en el tratamiento que contenía 1 mg/l de BA en ausencia de ANA, produciendo un promedio de 9.10 ± 8.24 PLB's por explante, seguido del tratamiento hormonal utilizado como control (sin reguladores de crecimiento), en donde se formaron un promedio de 4.47 ± 5.88 PLB's y por el tratamiento adicionado con 0.5 mg/l de ANA y 3 mg/l de BA (3.82 ± 4.38), mientras que en el tratamiento hormonal con 1 mg/l de ANA y 3 mg/l de BA, la formación de PLB's por explante disminuyó a 0.35 ± 0.80 .

Gráfica 2. Formación in vitro de PLB's, a partir de secciones basales de protocormos de *Euchile mariae*, en medio MS modificado en combinación con ANA y BA, en 4 tiempos de evaluación.

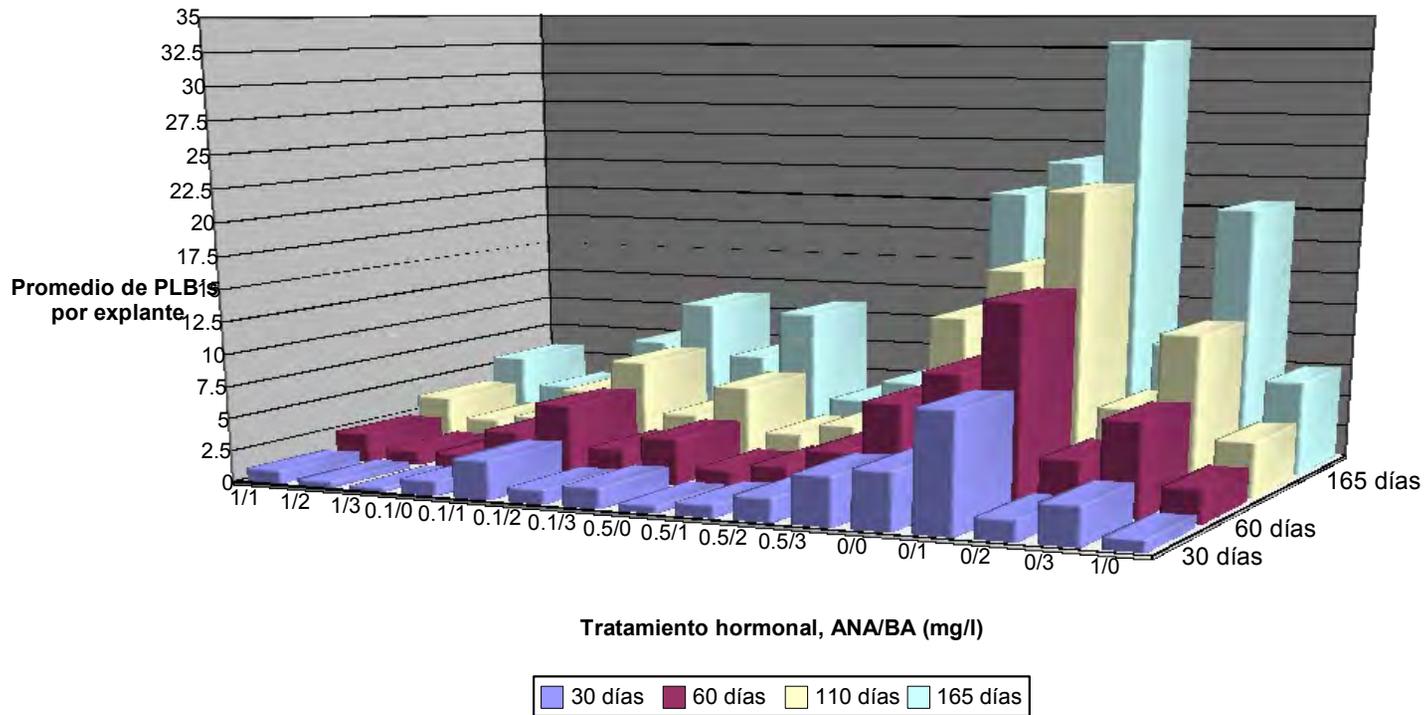


Tabla 10. Promedio de PLB's generados por explante a los 30 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones basales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante ± D.S. |
|------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| 0/1 | 364 | 9.10 ± 8.24 ^a |
| 0/0 | 179 | 4.47 ± 5.88 ^b |
| 0.5/3 | 153 | 3.82 ± 4.38 ^{bc} |
| 0.1/1 | 123 | 3.07 ± 3.68 ^{bcd} |
| 0/3 | 121 | 3.02 ± 3.27 ^{bcd} |
| 0.5/2 | 75 | 1.87 ± 2.70 ^{bcd} |
| 0/2 | 68 | 1.7 ± 2.53 ^{cde} |
| 0.1/3 | 66 | 1.65 ± 2.13 ^{cde} |
| 0.1/0 | 48 | 1.20 ± 1.60 ^{cde} |
| 0.1/2 | 46 | 1.15 ± 2.06 ^{de} |
| 1/1 | 42 | 1.05 ± 2.61 ^{de} |
| 0.5/1 | 41 | 1.02 ± 2.21 ^{de} |
| 1/0 | 39 | 0.97 ± 1.40 ^{de} |
| 0.5/0 | 26 | 0.65 ± 1.27 ^{de} |
| 1/2 | 18 | 0.51 ± 0.85 ^{de} |
| 1/3 | 14 | 0.35 ± 0.80 ^e |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)

D. S.= Desviación estándar

PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

En las tablas 11, 12 y 13 se observa que a los 60, 110 y 165 días de cultivo la mejor respuesta coincidió con la observada desde los primeros 30 días de inducción. En el tratamiento con 1 mg/l de BA sin la adición de ANA, se formaron un promedio de 15.40 ± 12.23 , 22.47 ± 16.73 y 33.07 ± 20.75 PLB's respectivamente por explante, presentándose en los tres tiempos un 100% de respuesta con brotación múltiple.

Estos resultados coinciden con los reportados por distintos autores para diferentes géneros de orquídeas. Lin (1986), obtuvo el mayor porcentaje de formación de PLB's (73.4%), al cultivar secciones de entrenudos de inflorescencias de *Phalaenopsis* y *Doritaenopsis* en medio de cultivo adicionado con 1 mg/l de BA. Ramírez (1990), logró la mayor formación de PLB's a partir del cultivo de protocormos de *Mormodes badia*, en medio de cultivo adicionado con 5 μ M de BA (1mg/l) y 0.1 μ M de ANA. Martínez (1985), estableció el 100% de respuesta de brotación múltiple a partir del cultivo de regiones basales de protocormos de *Bletia urbana*, a las 7 semanas de inducción a una

concentración de 5 μM de BA obteniendo 5.4 brotes por explante. Hernández *et al.*, (2001), al cultivar *in vitro* mitades de protocormos de *Laelia anceps* en medio MS con 1 mg/l de BA, reportaron la mayor formación de PLB's. Estos mismos autores encontraron en *Catasetum intergerrimum*, la mayor formación de PLB's por explante en medio MS adicionado con 2 mg/l de BA sin auxina presente en el medio de cultivo, observando a su vez que la formación de los brotes disminuía considerablemente en aquellos tratamientos con bajas o nulas concentraciones de BA. Saiprasad *et al.*, (2002), observaron una alta formación de PLB's en tres géneros de orquídeas: *Dendrobium*, *Oncidium* y *Cattleya*, a partir del cultivo de fracciones de protocormos en medio MS adicionado con 4.44 μM de BA. Salazar (2003), al cultivar protocormos de *Mormodes tuxtensis*, *Cuitlautzina pendula* y de *Lycaste skinneri* en medio de cultivo MS, obtuvo los porcentajes de respuesta más altos (90%) con los tratamientos adicionados con BA (1mg/l) en ausencia de ANA. Lee y Lee (2003), a partir del cultivo de callo de *Cypripedium formosanum* obtuvieron un elevado porcentaje de PLB's (96.2%), así como el mayor número de PLB's por explante utilizando 4.44 μM de BA.

El segundo mejor tratamiento en los tres periodos de observación fue el tratamiento que no presentaba reguladores de crecimiento (control), formándose un promedio de 9.95 ± 9.27 , 16.40 ± 13.24 y 23.85 ± 16.25 PLB's por explante a los 60, 110 y 165 días de cultivo respectivamente. Se ha reportado la formación de PLB's sin la adición de reguladores de crecimiento vegetal al medio de cultivo, a partir de distintos explantes. De acuerdo con Jiménez (1998), algunas especies son cultivadas sin la adición de ningún regulador externo, probablemente debido a que existe suficiente cantidad endógena de hormonas. Ramírez (1990), obtuvo a partir del cultivo de protocormos de *Encyclia vitellina*, en medio de cultivo sin hormonas de crecimiento, un 80% de brotación múltiple a las 4 semanas y un 70% a las 8 semanas. Lam *et al.*, (1991), reportaron un alto porcentaje (80%) de formación de PLB's a partir de secciones de protocormos de *Phalaenopsis* en medio sin reguladores de crecimiento y la formación del mayor número de PLB's por sección de protocormo en medio de cultivo adicionado únicamente con complejos orgánicos. Colli y Kerbauy (1993), observaron en *Catasetum fimbriatum* la formación de PLB's a partir de meristemas de raíz, en ausencia de reguladores de crecimiento. De igual forma, Rangel (1995), al cultivar ápices de tallo de *Oncidium stramineum* reportó la formación de PLB's en los tratamientos sin fitorreguladores. Peres y Kerbauy (1999), observaron en *Catasetum fimbriatum* la formación y desarrollo de PLB's a partir de meristemas de raíz en medio libre de hormonas. Así mismo, Chen y Chang (2000),

lograron la formación de PLB's a partir del cultivo de callo derivado de segmentos de raíces, tallos y hojas de *Oncidium* en medio de cultivo MS al 50% libre de hormonas.

El siguiente tratamiento que indujo la mayor formación de PLB's fue el que contenía 0.5 mg/l de ANA y 3 mg/l de BA formando 7.45 ± 6.47 (60 días), 12.60 ± 9.93 (110 días) y 21.32 ± 15.61 (165 días) PLB's por explante. Los tratamientos hormonales en los cuales se formó el menor número de brotes en las tres observaciones realizadas, fueron aquellos en los que se encontraba presente en el medio de cultivo 1 mg/l de ANA y 3 mg/l de BA y con 1 mg/l de ANA y 2 mg/l de BA obteniéndose a los 165 días de cultivo un promedio de 3.50 ± 5.20 y 3.48 ± 4.57 PLB's por explante, respectivamente.

Tabla 11. Promedio de PLB's generados por explante a los 60 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones basales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante \pm D.S. |
|------------------------------------|-------------------|---|
| 0/1 | 616 | 15.40 ± 12.23^a |
| 0/0 | 398 | 9.95 ± 9.27^b |
| 0.5/3 | 298 | 7.45 ± 6.47^{bc} |
| 0/3 | 289 | 7.22 ± 6.01^{bc} |
| 0.1/1 | 228 | 5.70 ± 5.88^c |
| 0/2 | 165 | 4.12 ± 4.83^{cd} |
| 0.1/3 | 145 | 3.62 ± 3.66^{cd} |
| 0.5/2 | 141 | 3.52 ± 3.99^{cd} |
| 0.1/0 | 132 | 3.30 ± 3.10^{cd} |
| 1/0 | 105 | 2.62 ± 3.29^d |
| 0.1/2 | 101 | 2.52 ± 3.21^d |
| 1/1 | 92 | 2.30 ± 4.10^d |
| 0.5/1 | 82 | 2.05 ± 3.32^d |
| 0.5/0 | 58 | 1.45 ± 2.03^d |
| 1/3 | 48 | 1.20 ± 1.68^d |
| 1/2 | 41 | 1.17 ± 1.67^d |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)

D. S.= Desviación estándar

PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

Tabla 12. Promedio de PLB's generados por explante a los 110 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones basales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante \pm D.S. |
|------------------------------------|-------------------|--|
| 0/1 | 899 | 22.47 \pm 16.73^a |
| 0/0 | 656 | 16.40 \pm 13.24^b |
| 0.5/3 | 504 | 12.60 \pm 9.93^{bc} |
| 0/3 | 486 | 12.15 \pm 8.15^{bcd} |
| 0.1/1 | 309 | 7.72 \pm 7.88^{cd} |
| 0/2 | 253 | 6.32 \pm 7.68^{de} |
| 0.1/3 | 245 | 6.12 \pm 5.46^e |
| 0.1/0 | 202 | 5.05 \pm 4.20^e |
| 0.5/2 | 192 | 4.80 \pm 5.18^e |
| 1/0 | 174 | 4.35 \pm 4.78^e |
| 1/1 | 150 | 3.75 \pm 5.54^e |
| 0.1/2 | 145 | 3.62 \pm 4.13^e |
| 0.5/1 | 142 | 3.55 \pm 6.09^e |
| 0.5/0 | 106 | 2.65 \pm 3.71^e |
| 1/3 | 104 | 2.60 \pm 2.97^e |
| 1/2 | 75 | 2.14 \pm 2.79^e |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)

D. S.= Desviación estándar

PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

Tabla 13. Promedio de PLB's generados por explante a los 165 días de cultivo y su número total por tratamiento, a partir de secciones basales de protocormos de *Euchile mariae* cultivadas *in vitro*, en medio MS modificado adicionado con distintas concentraciones de ANA y BA.

| Tratamiento hormonal ANA/BA (mg/l) | N° total de PLB's | Promedio de PLB's por explante \pm D.S. |
|------------------------------------|-------------------|---|
| 0/1 | 1323 | 33.07 \pm 20.75^a |
| 0/0 | 954 | 23.85 \pm 16.25^b |
| 0.5/3 | 853 | 21.32 \pm 15.61^b |
| 0/3 | 823 | 20.57 \pm 11.89^b |
| 0.1/1 | 452 | 11.30 \pm 9.75^c |
| 0.1/3 | 435 | 10.87 \pm 8.58^c |
| 0/2 | 393 | 9.82 \pm 11.08^c |
| 0.1/0 | 317 | 7.92 \pm 5.56^c |
| 0.5/2 | 309 | 7.72 \pm 8.24^c |
| 1/0 | 296 | 7.40 \pm 8.12^c |
| 0.1/2 | 282 | 7.05 \pm 6.79^c |
| 1/1 | 232 | 5.80 \pm 8.48^c |
| 0.5/1 | 224 | 5.60 \pm 8.92^c |
| 0.5/0 | 155 | 3.87 \pm 4.47^c |
| 1/3 | 140 | 3.50 \pm 5.20^c |
| 1/2 | 122 | 3.48 \pm 4.57^c |

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.0001$)

D. S.= Desviación estándar

PLB's = Cuerpos parecidos a protocormos

En el resto de los tratamientos de manera general, se observó que los mejores resultados se presentaron cuando en el medio de cultivo era mayor la concentración de citocinina (BA) con respecto a la concentración de auxina (ANA), por lo que se pudo establecer que la formación de PLB's a partir de las secciones basales de protocormos, fue favorecida por la presencia de BA en el medio de cultivo. Al analizar el efecto del ANA sobre la formación de PLB's por explante, se observó que no influyó significativamente en la formación de los mismos, pero es posiblemente requerida en el proceso de elongación y división celular indispensables en el desarrollo vegetal.

Nuestros resultados coinciden parcialmente con los encontrados en la literatura en distintos trabajos. Martínez (1985), al cultivar regiones basales de protocormos de *Bletia urbana*, reportó un promedio de 5.45 brotes por explante en medio KC adicionado con 2 mg/l de BA. En *Catasetum fimbriatum* se observó que la presencia de auxinas exógenas en el medio de cultivo redujo drásticamente el número de PLB's formados a partir de meristemas de raíz, mientras que al utilizar BA se aceleró el proceso de conversión del meristemo de raíz, formándose así un gran número de PLB's (Colli y Kerbauy, 1993).

Así mismo, Baltazar (2004), reportó la formación del mayor número de PLB's en medio MS a partir del cultivo *in vitro* de protocormos enteros de *Oncidium tigrinum*, en los tratamientos con bajas concentraciones de ANA y en combinación con diferentes concentraciones de BA, señalando que los tratamientos que presentaban 0.1/1 y 0.1/0.5 mg/l de ANA/BA fue en los cuales se logró la formación del mayor número de PLB's y cuando la citocinina no estaba presente en el medio, la cantidad de PLB's fue menor. Este mismo autor también al cultivar mitades de protocormos de *Oncidium tigrinum*, encontró que el mejor tratamiento para la formación de PLB's y su desarrollo a plántulas, fue el que presentaba solamente 1 mg/l de BA, obteniéndose a su vez en éste el porcentaje más elevado de sobrevivencia para los explantes.

6.4.5 SECCIONES APICALES Y BASALES DE PROTOCORMOS

En la gráfica 3 se observa el comportamiento que presentaron las secciones apicales y basales de protocormos con diferentes concentraciones de ANA y BA, respecto a la formación de PLB's por explante, en la última toma de datos realizada (165 días de cultivo).

Se ha reportado que la adición de auxinas exógenas en el medio de cultivo, generalmente es esencial para iniciar la formación de embriones somáticos *in vitro*; no obstante, para lograr el crecimiento y desarrollo de éstos se requiere de un medio libre de auxinas, debido a que altos niveles de éstas pueden inhibir el desarrollo y crecimiento del meristemo apical de brote (Razdan, 2002). Sin embargo, las citocininas han sido ampliamente reportadas por inducir la formación de brotes en el cultivo de orquídeas, principalmente con la presencia de altas concentraciones de citocininas en ausencia de auxinas, la producción de brotes por explante es mayor (Kerbaui, 1997; Nahuat, 2001; citado por Salazar 2003). Así mismo, George & Sherrington (1984), señalan que se requieren de bajas concentraciones de auxinas en combinación con altos niveles de citocininas para inducir la formación de brotes, aunque también en algunos casos el empleo de citocininas solas es suficiente. Arditti y Ernst (1993), reportan diversos trabajos en los cuales se ha logrado inducir brotación múltiple adicionando al medio de cultivo BA con bajas o nulas concentraciones de auxina. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estas observaciones, debido a que para ambos explantes ensayados (ápices y bases), de manera general se observó que la mayor formación de PLB's, se obtuvo en los tratamientos con una concentración menor de ANA y una concentración mayor de BA, por lo que la adición de esta citocinina al medio de cultivo, favorece la inducción de brotación múltiple.

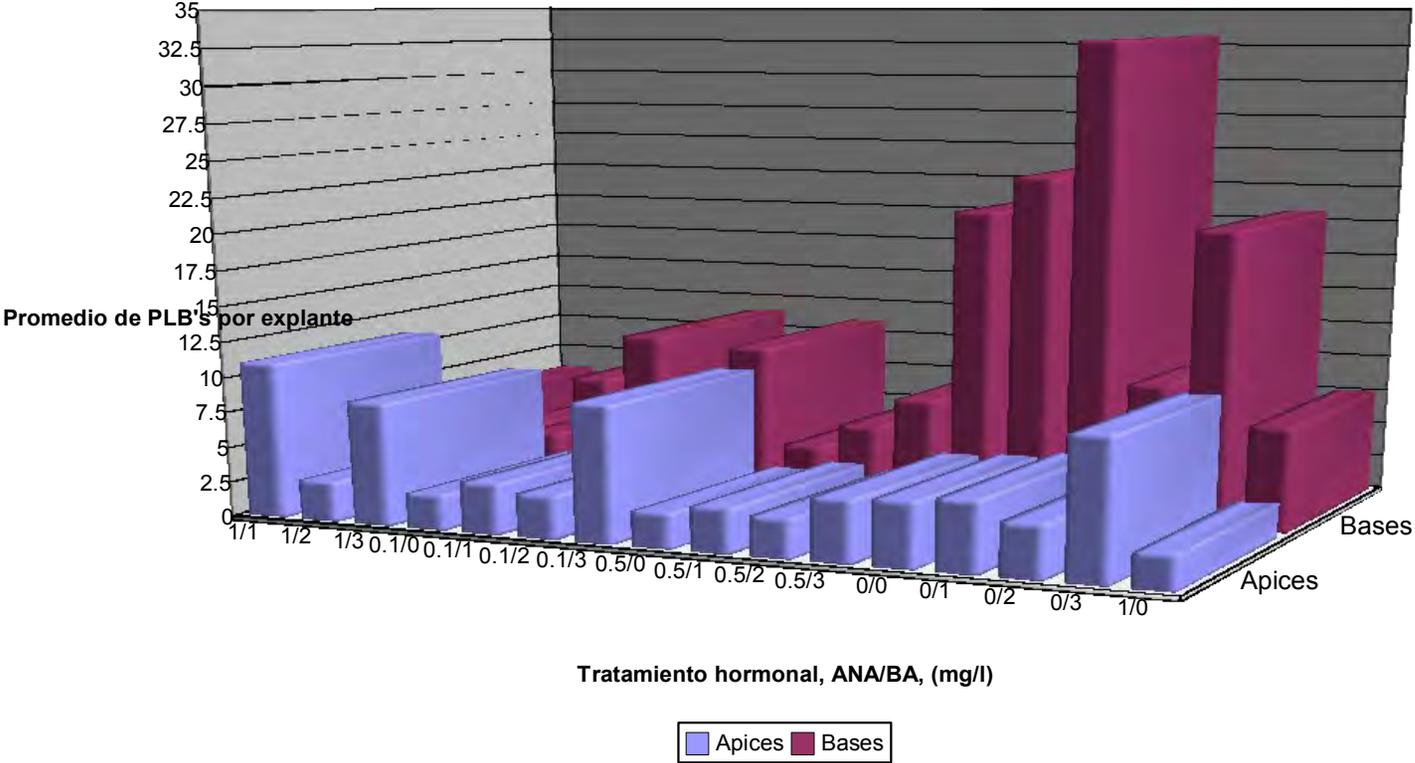
Para el caso de las secciones apicales, se observó que 3 mg/l de BA en combinación con distintas concentraciones de ANA, favorecieron la formación de un mayor número de PLB's, mientras que para las secciones basales los promedios más altos de PLB's, se obtuvieron cuando se encontró únicamente en el medio 1 mg/l de BA y sin la adición de auxinas, o bien en el tratamiento sin reguladores de crecimiento también se obtuvieron un gran número de PLB's, pero al adicionar BA se incrementó notablemente el número de los mismos, por lo que su efecto es favorable para acelerar la formación, el crecimiento y desarrollo de los PLB's.

De igual forma que en el presente estudio, Martínez (1985), reportó los mejores resultados para la inducción de brotación múltiple a partir de regiones apicales y basales

de protocormos de *Bletia urbana*, cuando en el medio de cultivo estaba ausente el ANA y se incrementaba la concentración de BA, encontrando la mejor respuesta a la concentración de 15 μM (3 mg/l). Así mismo, estableció que al adicionar ANA en concentraciones de 5, 10 y 15 μM (1, 2 y 3 mg/l) al medio se presentaba necrosamiento de los brotes y se inhibía su formación. Rangel (1995), señaló la mayor formación de PLB's a partir de ápices de *Oncidium stramineum*, en los tratamientos con 1 mg/l de citocinina (kinetina) y sin la adición de auxina. Chen *et al.*, (1999), obtuvieron masas nodulares, que posteriormente dieron lugar a la formación de PLB's a partir del cultivo de meristemos de hojas de *Oncidium Gower Ramsay*, a los 20 días de su cultivo en medio MS al 50%, al adicionar únicamente citocinina (TDZ) con concentraciones de 0.3-1 mg/l, mientras que al adicionar solamente auxinas al medio, (2,4-D) se inhibía la formación de PLB's.

No obstante, de manera contraria a los resultados obtenidos, existen diversos reportes en los cuales se ha logrado acelerar el desarrollo en algunas especies, adicionando bajas concentraciones de auxinas al medio (George & Sherrington, 1984). Por ejemplo, Kerbauy (1991), logró la formación de PLB's en *Cattleya* a partir de la formación de callo, obtenido del cultivo *in vitro* de meristemos de raíz, en medio adicionado con 2,4-D. Así mismo, se reportó que 0.1 mg/l de ANA en ausencia de citocininas era esencial para iniciar el crecimiento y sobrevivencia de meristemos de *Cattleya*. De igual forma se encontró en plántulas de *Cattleya*, que el empleo únicamente de ANA a 1 y 5 mg/l incrementa el número de brotes formados (Ichihashi y Kako, 1973; Kusumoto, 1979a; citados por Mauro *et al.*, 1994). En *Cymbidium* se encontró que con la adición de 0.01 y 0.1 mg/l de ANA al medio MS, se logró la mayor formación de brotes (Kusumoto, 1978; citado por Salazar, 2003). También se reporta en la literatura que la adición exógena de citocininas al medio de cultivo han mostrado un efecto inhibitor para la formación de yemas y embriones somáticos (Kerbauy, 1981; Kunieda y Kerbauy, 1986; Wenck *et al.*, 1988; citados por Kerbauy, 1993).

PLB's, a partir de secciones apicales y basales de protocormos de *Euchile mariae*, en medio MS modificado en combinación con AN



6.5 Fase de individualización

George & Sherrington (1984), reportan la formación de plántulas a partir de fracciones de protocormos en varias especies de los géneros *Cattleya*, *Paphiopedilum* y *Cymbidium*. Arditti (1992), señala que la formación de PLB's, es una respuesta que se reporta generalmente en trabajos sobre la propagación *in vitro* de orquídeas, como uno de los pasos obligados para la formación de plántulas. Así mismo, Chen y Chang (2000), al subcultivar los PLB's obtenidos a partir del cultivo de callo de *Oncidium* Gower Ramsey a un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, observaron la formación de plántulas completas y saludables.

De esta manera, una vez concluida la etapa de inducción (después de 165 días de cultivo), cada uno de los PLB's obtenidos a partir de las secciones apicales (**Fig. 13a**) y basales (**Fig. 13b**) de protocormos de *E. mariae*, al ser individualizados (**Fig. 13c y d**) y subcultivados en medio MS modificado sin reguladores de crecimiento, después de 60 días se desarrollaron hacia la formación de plántulas completas con una altura promedio de 3-4 cm, con hojas (3-4 cm) y raíces (3-5 cm) bien definidas (**Fig. 13e y f**). A los 90 días, hacia la base del tallo se observó un ensanchamiento, que correspondió a la formación del pseudobulbo (0.5 cm) (**Fig. 13g y h**). A los 110 días las plantas tenían una altura promedio de 4-6 cm, con hojas que medían de 4-5cm, raíces de 5-6 cm y el pseudobulbo medía un 1cm.

La formación de pseudobulbos en las plántulas obtenidas, resulta una respuesta favorable para su posterior sobrevivencia en condiciones *ex vitro*, debido a que estas estructuras permiten el almacenamiento de nutrientes y agua y por consiguiente pueden soportar mayores condiciones de sequía.

Se ha reportado que la presencia de ANA o cualquier otra auxina en el medio, en concentraciones mayores sobre la concentración de citocinina, estimula la formación de raíces (Gamborg y Shyluk, 1981; citados por Martínez, 1985; George & Sherrington, 1984). También se ha logrado la formación de raíces en orquídeas, únicamente con la adición de auxinas al medio de cultivo (Ranjan *et al.*, 1997; Kerbauy, 1997; Sheelavantmath *et al.*, 2000; Bhadra y Hossain, 2003), o bien con la interacción de auxinas y citocininas. Por ejemplo, Baltazar (2004), observó la formación de raíces en las plántulas obtenidas a partir del cultivo de mitades de protocormos de *Oncidium tigrinum* en medio MS, mediante la influencia de los reguladores de crecimiento ANA y BA en la etapa de inducción. Sin embargo, como los brotes jóvenes en desarrollo son una fuente rica en la producción de auxinas, la adición de estas a los medios de cultivo durante esta

fase, se ha encontrado que es innecesaria para muchas especies (Orellana, 1995; citado por Pérez, 1998).

En nuestros experimentos, no fue necesario inducir el enraizamiento de los PLB's formados en un medio de cultivo sólo con auxinas, debido a que la aparición y desarrollo de las raíces hacia la zona basal de éstos ocurrió de manera espontánea en ambos tipos de explantes (ápices y bases), durante el periodo de cultivo en el medio de inducción (MS modificado), en presencia de ambos reguladores de crecimiento (ANA y BA). Estos resultados coinciden con lo observado por Salazar (2003), quien reporta el empleo de medio MS, como favorable para el desarrollo de raíces en plántulas de *Cuitlautzina pendula* y *Lycaste skinneri*, observando un alto porcentaje de plántulas con raíz en la mayoría de los tratamientos hormonales ensayados obteniendo porcentajes entre 71 y 91%. Así mismo, señala que la formación de raíces se logró sin realizar un subcultivo de los brotes formados a un medio con concentraciones mayores de auxina.

La individualización de los PLB's obtenidos permitió que éstos pudieran desarrollarse a una mayor velocidad y que formaran nuevas hojas y raíces, aumentando su talla y diferenciación, puesto que, ya no se encontraban compitiendo por el espacio y los nutrientes como cuando estaban unidos entre sí.

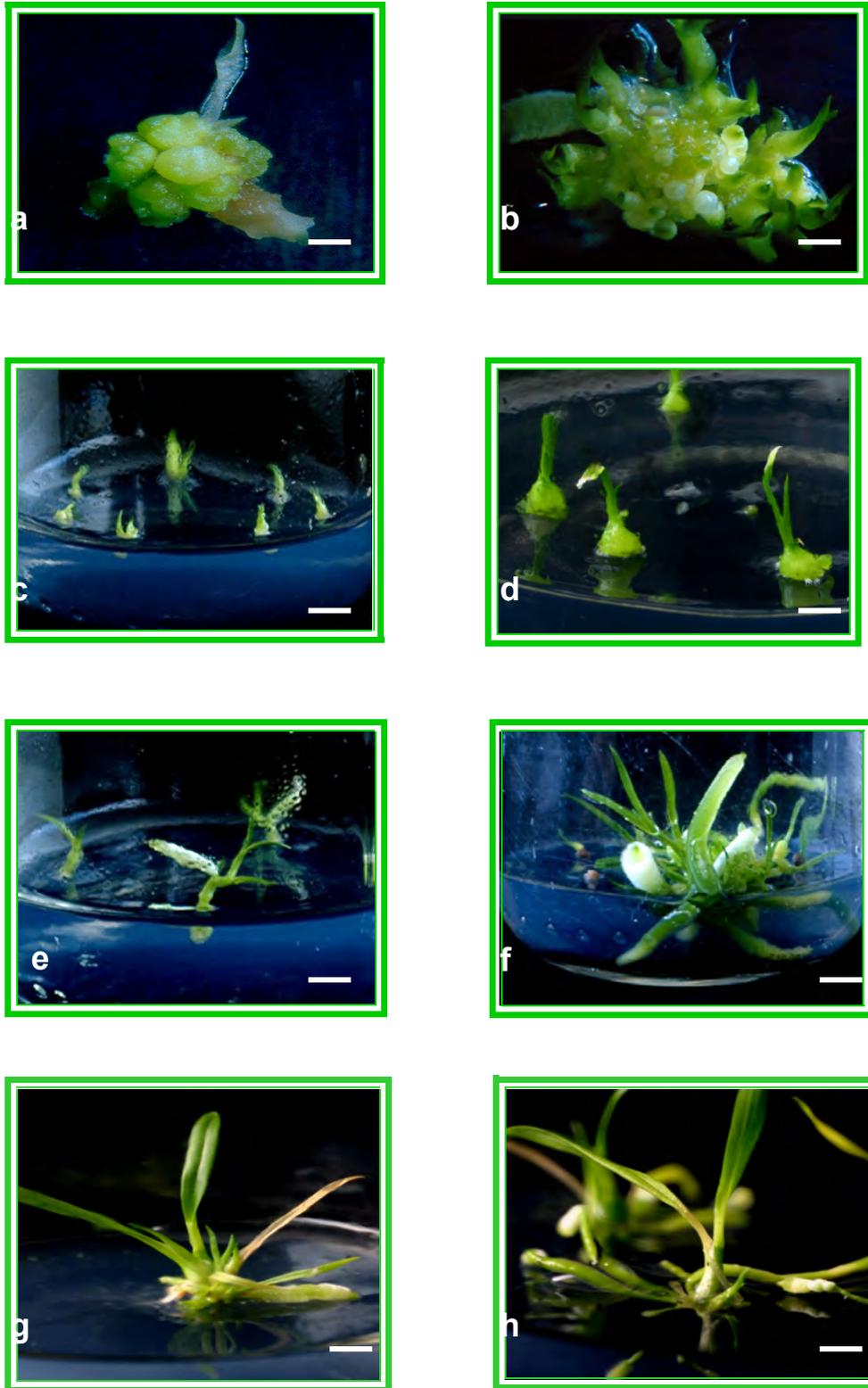


Figura 13. Formación y desarrollo de plántulas de *Euchile mariae*, a partir de mitades apicales y basales de protocormos cultivadas *in vitro* en medio MS modificado después de 110 días de cultivo. Barra = 1 cm.

6.6 Fase de aclimatización

La transferencia y aclimatización *ex vitro* es la última fase, pero frecuentemente la más crítica, para que un sistema de micropropagación pueda ser considerado eficiente (Kadleček *et al.*, 2001). El término aclimatización denota una intervención por parte del humano, durante el proceso de adaptación de las plantas micropropagadas, a condiciones ambientales (Debergh, 1991). En esta etapa un número substancial de las plantas micropropagadas no logran sobrevivir a la transferencia en condiciones *ex vitro*, por lo que esta fase resulta extremadamente importante y debe llevarse a cabo con extremos cuidados para evitar una pérdida considerable de plántulas, ya que éstas presentan ciertas diferencias con las plantas producidas en invernadero o en condiciones naturales (George & Sherrington, 1984; Hazarika, 2003).

Las plántulas desarrolladas *in vitro*, están continuamente expuestas a un microambiente, que ha sido seleccionado para proveer el mínimo estrés y las óptimas condiciones para su multiplicación, además se encuentran en un medio con abundantes compuestos orgánicos, especialmente sacarosa, y a su vez en una atmósfera con altos niveles de humedad, baja intensidad luminosa, temperatura constante y escaso intercambio gaseoso, por lo que al ser transferidas a condiciones ambientales en donde la humedad atmosférica es más baja y la intensidad luminosa es mayor, pierden agua rápidamente (Agramonte *et al.*, 1998; Hazarika, 2003).

Además, en condiciones *in vitro* las plantas fijan poco CO₂, debido a que la mayor parte de los carbohidratos que necesitan para su crecimiento y desarrollo los obtienen de la sacarosa proporcionada por el medio de cultivo, por lo que no son dependientes de su propia fotosíntesis, convirtiéndose así en plantas mixotróficas. En algunas ocasiones los cloroplastos no están completamente desarrollados, los estomas tienen baja funcionalidad y las ceras cuticulares y epicutelares de las hojas son muy delgadas, por lo que al cambiarlas de ambiente a un medio más agresivo tienen que pasar a una nutrición completamente autótrofa, motivo por el cual un porcentaje muy alto de plántulas, no logran su establecimiento *ex vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Es entonces cuando necesitan un sustrato que les permita realizar el cambio de condiciones ambientales, de manera gradual, y continuar el desarrollo de su sistema radicular y vegetativo para completar su establecimiento (Thompson, 1977; citado por Salazar, 2003). En el caso de *Euchile mariae*, las plantas obtenidas a partir de mitades de protocormos (apicales y basales) (**Fig. 14a**) después de 9 meses de cultivo *in vitro*, que

presentaron una altura promedio de 4-6 cm, hojas (4-5 cm), raíces (5-6 cm) (**Fig. 14b**) y un pseudobulbo (1 cm) (**Fig. 14c**) lograron establecerse en condiciones *ex vitro*.

En muchas especies de plantas, las hojas y raíces formadas *in vitro*, no tienen la capacidad para seguir desarrollándose en condiciones *ex vitro*, por lo que éstas son reemplazadas por la formación de nuevas hojas (Preece & Sutter, 1991; Diettrich *et al.*, 1992, citados por Pospíšilová *et al.*, 1999). En el presente trabajo, durante el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*, se observó la pérdida de algunas hojas provenientes del cultivo *in vitro* (**Fig. 14d**), así como el surgimiento de nuevas hojas más vigorosas y en algunas plantas se observó la formación de un segundo pseudobulbo (**Figs. 14e y f**).

El sustrato es uno de los elementos más importantes para el buen cultivo y crecimiento de las orquídeas. Uno de los sustratos más empleados en toda América tropical es el maquique, constituido por las raíces adventicias de los helechos arborescentes. Desafortunadamente es un recurso de difícil renovación y se ha agotado en algunas regiones (Hágsater, 1974). Una alternativa que contribuye a la conservación de los helechos arborescentes, es el empleo de troncos de encino o tepozán. El empleo de ramas de encino, se ha reportado como propicio para el establecimiento de orquídeas propagadas *in vitro*, su principal ventaja radica en que las raíces se adhieren perfectamente a la superficie, quedando muy bien ventiladas, y generalmente la rama se mantiene en buen estado durante cinco años o más y a su vez es un material barato y sobre todo renovable, por lo que no destruye un recurso como lo es el maquique (Hágsater, 1974). Barrera (2006), reporta el establecimiento *ex vitro* de plantas de *Laelia speciosa* en troncos de tepozán, obteniendo buenos resultados. Así mismo, el peat-moss (*Sphagnum*), se ha visto que proporciona ciertas ventajas para el cultivo de las orquídeas, debido a que mejora el crecimiento de las raíces y pseudobulbos, es muy ligero, retiene en gran parte la humedad y a su vez permite la aireación de las raíces (Moss, 1955; citado por Poole y Sheehan, 1977). En nuestros experimentos, se pudo establecer un lote de 20 plantas en troncos de tepozán y otro lote de 20 plantas en troncos de encino, más una mezcla de peat-moss y agrolita (proporción 3:1), colocada sobre las raíces de las plantas obtenidas. En ambos casos el resultado fue favorable, permitiendo la adaptación y desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro* (**Figs. 14g, h, i**).



Figura 14. Sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas obtenidas a partir de mitades de protocormos apicales y basales de *Eucybe mariae*, después de 35 días en condiciones *ex vitro*. Barra = 2 cm.

Los porcentajes de sobrevivencia que se reportan en la literatura para plantas de orquídeas de distintos géneros propagadas *in vitro*, son variables. Rodríguez (2000), registró porcentajes de sobrevivencia de 83%, para plántulas de *Paphiopedilum exstaminodum* y *Paphiopedilum caudatum* después de un mes en condiciones de invernadero, utilizando como sustrato *Sphagnum*, perlita y carbón; y al emplear una mezcla de musgo y tezontle obtuvo un 88% de sobrevivencia. Chen y Chang (2000), reportaron un porcentaje de sobrevivencia cercano al 100% para plantas de *Oncidium Gower Ramsay*, al ser establecidas en macetas con *Sphagnum* en condiciones de invernadero. Baltazar (2004), al aclimatizar plantas de *Oncidium tigrinum* en tepetzil y en una mezcla de corteza de encino, tepetzil y carbón vegetal, obtuvo porcentajes de sobrevivencia cercanos al 100% en ambos sustratos empleados. Barrera (2006), registró 15% de sobrevivencia para plantas de *Laelia speciosa* establecidas en peat moss con tezontle, un 40% en peat moss mezclado con trozos de encino y el mayor porcentaje (100%) lo registró en las plantas establecidas sobre troncos de tepozán.

En general, se reportan resultados satisfactorios; sin embargo, existen trabajos en los que no se obtiene el éxito esperado durante la aclimatización de las plantas propagadas *in vitro*. Por ejemplo, Ramírez (1990), reportó el 0% de sobrevivencia para plántulas de *Encyclia vitellina* propagadas *in vitro*, las cuales al ser transferidas a sustrato no resistieron el periodo de aclimatización y perecieron. Por otro lado, también se han reportado resultados favorables para orquídeas establecidas en condiciones naturales. Martínez (1991), al reintroducir plantas de *Lycaste skinneri* var. *skinneri* y de *Lycaste aromatica* a su hábitat natural, plantándolas sobre troncos de encino con restos de materia orgánica y en rocas con sustrato orgánico, reportó porcentajes de sobrevivencia entre 68% y 96%, mientras que al reintroducir plantas de *Oncidium stramineum* a su hábitat natural, también sobre troncos de distintas especies, registró un porcentaje de sobrevivencia del 40%, estos resultados son después de un año de estar en condiciones naturales.

En el presente trabajo, todas las plantas aclimatizadas de *Euchile mariae*, después de 35 días de haber sido transferidas a condiciones *ex vitro* sobrevivieron exitosamente obteniéndose un porcentaje de sobrevivencia del 100%, por lo que el sistema utilizado para su aclimatización resultó eficaz.

Tabla 14. Secuencia cronológica de desarrollo de *Euchile mariae*, hasta lograr la formación de plantas completas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos en medio MS modificado.

| SIEMBRA DE SEMILLAS | |
|---|----------|
| Germinación | 15 días |
| Formación de protocormos | 45 días |
| Protocormos con primordios foliares | 60 días |
| CULTIVO DE SECCIONES DE PROTOCORMOS | |
| Formación de PLB's y aparición de los primordios foliares en la región apical y de rizoides en la región basal | 65 días |
| PLB's con primordios foliares de 0.3-0.5 cm de longitud y aparición de la primera raíz (0.1-0.5 cm). | 120 días |
| PLB's con hojas de 0.5-1 cm de longitud y raíces de 1-1.5 cm | 165 días |
| INDIVIDUALIZACIÓN | |
| Formación de plantas completas (3-4 cm de altura), con hojas de 3-4 cm y raíces de 3-5 cm de longitud | 60 días |
| Formación del primer pseudobulbo (0.5 cm) hacia la base del tallo. | 90 días |
| Formación de plantas con una altura promedio de 4-6 cm, con hojas (4-5cm), raíces (5-6 cm) y un pseudobulbo (1cm) | 110 días |
| ACLIMATIZACIÓN | |
| Dos lotes de 20 plantas | 35 días |
| Sobrevivencia | 100% |

Como se observa en la Tabla 14, de manera general, el tiempo que abarcó el desarrollo de las plantas de *Euchile mariae*, desde su germinación hasta su aclimatización fue de 12 meses (370 días). En condiciones naturales se cuenta con muy poca información sobre el proceso de germinación de semillas de orquídeas y su posterior desarrollo hasta la formación de plantas completas. En la naturaleza menos del 5% de las semillas logran germinar, debido a que presentan pocas reservas de alimento y tienen un endospermo poco diferenciado, presentan una baja polinización y fertilización de los óvulos, es difícil que caigan en lugares con condiciones de luz, acidez, humedad y materias nutritivas favorables y para germinar necesitan asociarse con un hongo micorrízico, que provea al embrión de nutrientes hasta que se formen plantas que sean capaces de fabricar su propio alimento. Si los porcentajes de germinación de las semillas

de orquídeas en la naturaleza fueran elevados, las orquídeas ya habrían invadido todos los hábitats presentes en el mundo en un tiempo relativamente corto. Por ejemplo, se han realizado cálculos con la especie *Cycnoches ventricosum* var. *chlorochilon*, la cual produce cuatro millones de semillas por cápsula y en teoría puede producir en cuatro generaciones la cantidad de $65,536 \times 10^{24}$ semillas (Arditti, 1992). Además, se sabe que en esta familia de plantas las especies presentan bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y el escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales (Ávila y Oyama 2002). En especies como *Laelia speciosa*, también se ha reportado que un fruto contiene de 250 000 a 1 000 000 de semillas de las cuales, sólo una en 5 000 a una en 20 000, dependiendo del sitio, es capaz de germinar (Hernández, 1992). Esto refleja la importancia de establecer un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de especies como *Euchile mariae*, orquídea endémica de México, ya que mediante las técnicas del cultivo *in vitro*, es posible germinar asimbióticamente semillas con porcentajes mayores al 80% y lograr la formación de plantas completas en un tiempo relativamente corto y más rápido a comparación de lo que ocurre en condiciones naturales, por lo que el protocolo de propagación elaborado en el presente trabajo permitiría producir gran cantidad de plantas en poco tiempo para efectos de conservación y aprovechamiento del recurso.

La diversidad biológica es el recurso más valioso con el que contamos, por lo que el establecimiento de estrategias como las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son de vital importancia para su estudio, conservación y aprovechamiento.

6.7 Análisis histológico

6.7.1 Embriogénesis somática directa

El análisis histológico realizado, indica que las estructuras obtenidas (PLB's) a partir del cultivo *in vitro* de las secciones apicales y basales de protocormos de *E. mariae*, en medio de cultivo MS modificado, son embriones somáticos, por lo que la vía morfogénica obtenida en el presente trabajo fue embriogénesis somática directa.

La embriogénesis somática es el proceso por medio del cual una sola célula o un grupo de células no sexuales dan lugar a la formación de un embrión sin la necesidad de que ocurra la fusión de gametos (Tiserat *et al.*, 1979, citado por Gómez, 1998). En el cultivo *in vitro* de orquídeas se presentan cuerpos con morfología y desarrollo idénticos a los protocormos denominándose comúnmente PLB's (protocorm like bodies), los cuales pueden formarse de manera directa a partir del explante o indirectamente de callo o en cultivos en suspensión (Ramírez, 1990). Varios investigadores han sugerido que la formación de PLB's en cultivos de orquídeas es una manifestación de la embriogénesis somática (Steward and Mapes, 1971; Kerbauy, 1993; Begum *et al.*, 1994; citados por Chen *et al.*, 1999).

No obstante, la formación de embriones somáticos no ha sido bien documentada para las orquídeas. Existen muy pocos reportes en la literatura que proveen evidencia de esta vía de desarrollo para estas plantas: 1) Se ha reportado la formación de embriones globulares bien definidos, a partir de callo formado de secciones de rizoma de *Cymbidium ensifolium* var '*misericors*,' en un medio adicionado con TDZ y 2-4-D (Chang y Chang, 1998), 2) la formación de PLB's a partir del cultivo de callo de *Phalaenopsis* en un medio adicionado con agua de coco (Isshi *et al.*, 1998) y 3) la formación de PLB's a partir del cultivo de callo de '*Oncidium* Gower Ramsey' (Chen y Chang, 2000). Un dato reciente es el reportado por Barrera (2006), quien observó la formación de estructuras globulares a partir del cultivo de callo de *Laelia speciosa*. En todos estos casos, la formación de callo estuvo involucrada como una etapa intermedia para la formación de PLB's.

Sin embargo, son muy pocos los trabajos que reportan la formación de embriones somáticos de manera directa y su análisis histológico. Un ejemplo excepcional de la producción espontánea de estructuras análogas a los embriones, a partir de tejidos vegetativos, es el caso de la orquídea *Malaxis paludosa*, donde se observó en la extremidad apical de las hojas, la proliferación de embriones somáticos viables y capaces de evolucionar a plántulas normales (Taylor, 1967; citado por Margara, 1988). Así mismo,

Chen *et al.*, (1999), reportaron la formación de embriones somáticos de manera directa a partir de hojas jóvenes cultivadas *in vitro*.

En nuestros experimentos, los cortes histológicos obtenidos de los regenerantes, a los 35 días de cultivo, mostraron la presencia de estructuras globulares en distintas etapas de desarrollo, que surgieron de manera directa a partir de las células epidérmicas del tejido inductor (secciones apicales y basales de protocormos) (**Fig. 15**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Morel (1974), quien al cultivar *in vitro* secciones de protocormos de *Cymbidium* en un medio nutritivo, observó la formación de nuevos protocormos a partir de la región epidérmica. Con base en un estudio anatómico realizado por el mismo autor se demostró que las divisiones celulares en los protocormos, están limitadas a los estratos celulares más externos. Las células generalmente comienzan a dividirse en el estrato epidérmico. Estas divisiones periclinales dan lugar a la formación de un pequeño agregado de 2 a 6 células que aparecen al azar en la superficie del protocormo. Estos agregados formados por células meristemáticas pequeñas son muy activos y en pocos días forman pequeños protocormos. De igual forma Chen *et al.*, (1999) y Chen y Chang (2000), reportan la formación de embriones somáticos en *Oncidium* Gower Ramsay a partir de los estratos celulares epidérmicos y subepidérmicos de los explantes.

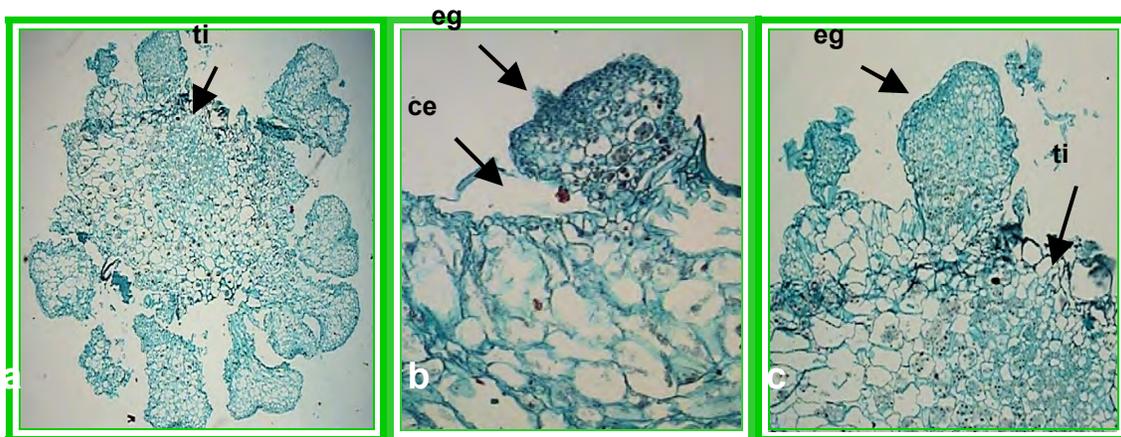


Figura 15. Cultivo *in vitro* de secciones apicales y basales de protocormos de *Euchile mariae* en medio MS modificado. a) Brotación múltiple, vista panorámica, 25X. b y c) Formación de estructura globular a partir de las células epidérmicas del tejido inicial, 50X. Abreviaturas: ti = tejido inicial, eg = estructura globular, ce = células epidérmicas.

En las estructuras globulares identificadas, se observaron células en un estrato bien definido, con una disposición hacia la periferia evidenciando la formación de la protodermis (**Fig. 16a**). La formación de este estrato celular es considerado como la primera evidencia de histodiferenciación dentro del embrión (Steeves y Sussex, 1989). Así mismo, se observó un adelgazamiento y reducción de tamaño hacia la base de las estructuras globulares obtenidas, lo cual nos indica la formación de un suspensor, constituido por células alargadas, con núcleos poco evidentes, de pared delgada y con gran cantidad de contenidos celulares (**Fig. 16b**). Según Steeves y Sussex (1989), la presencia de un suspensor es otra de las características observadas durante las primeras etapas del desarrollo de un embrión. En algunos casos se encontró la conexión del suspensor con la periferia del tejido inicial (**Fig. 16c**), lo cual proporciona evidencia de que dicha estructura sirve como un vínculo para el transporte de nutrientes durante el desarrollo temprano del embrión, además de actuar como sitio de síntesis de reguladores de crecimiento requeridos para el embrión (Yeung y Sussex, 1979; citados por Steeves y Sussex, 1989).

Otra característica observada, fue una polaridad de los contenidos celulares (**Fig. 16d**), es decir, hacia la región apical de las estructuras globulares identificadas se apreciaron células con pocos contenidos celulares, mientras que hacia la región basal y hacia el suspensor se observaron gran cantidad de éstos (**Figs. 16 e y f**).

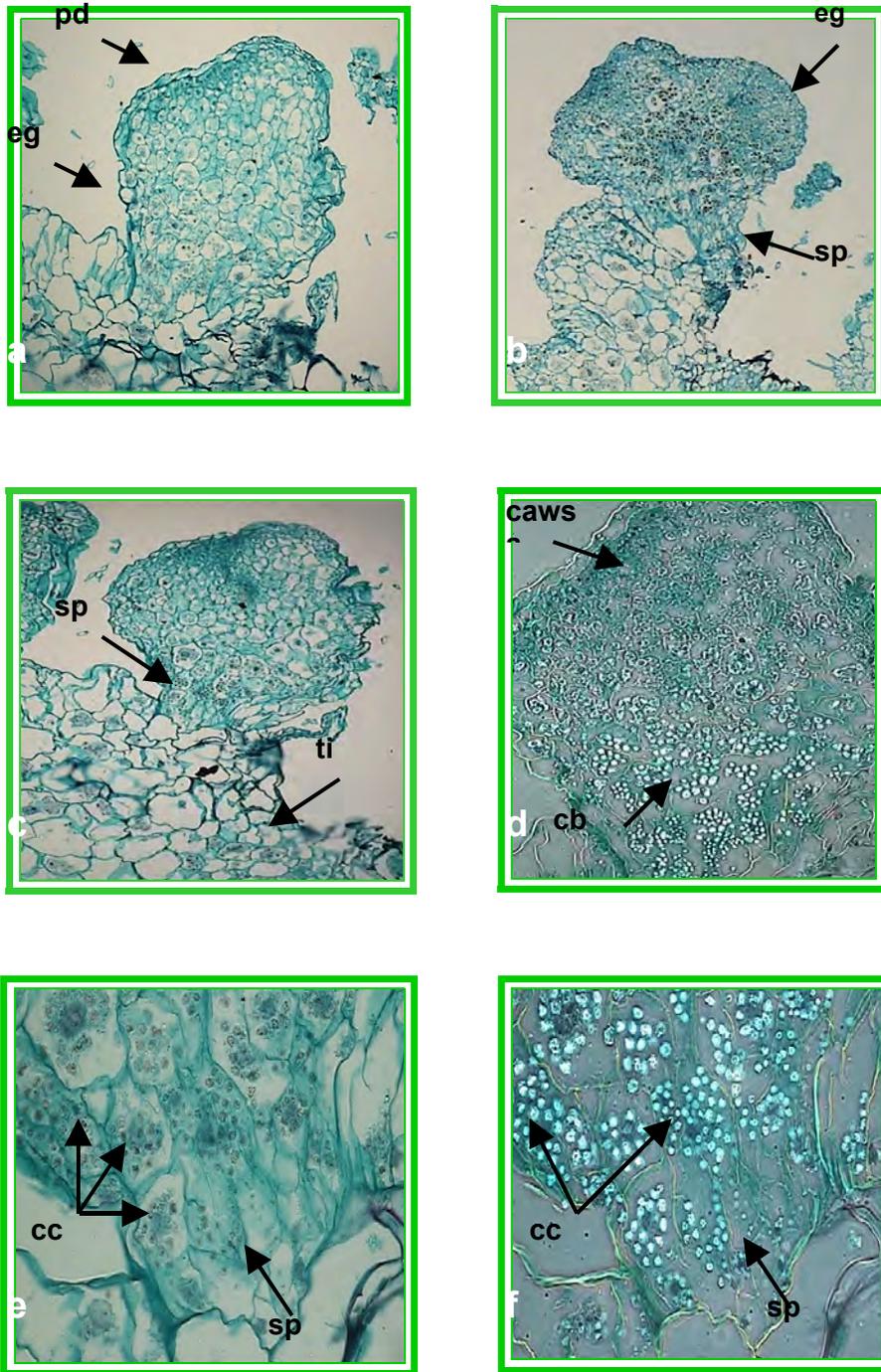


Figura 16. Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Euchile mariae*. a) Formación de protodermis hacia la periferia, 100X. b) Formación del suspensor hacia la zona basal, 50X. c) Estructura globular conectada por medio del suspensor a la periferia del tejido inductor, 100X. d) Polaridad de los contenidos celulares, 200X. e) Suspensor y contenidos celulares, 400X. f) Contenidos celulares refrigentes en el suspensor, 400X. Abreviaturas: eg = estructura globular, pd = protodermis, sp = suspensor, ti = tejido inicial, ca = células apicales, cb = células basales, cc= contenidos celulares.

Respecto al tamaño y forma de las células, se identificaron dos tipos: 1) Hacia la región apical se observaron células pequeñas y de formas rectangulares, mientras que 2) en la región basal se encontraron células de mayor tamaño y de forma isodiamétrica. Esto coincide con lo reportado para embriones de *Cattleya aurantiaca*, en donde se observó que las células de la región meristemática son pequeñas, generalmente miden de 8-10 μm de diámetro, mientras que las células de la región basal son mayores (Harrison, 1977). Esto es cierto para la mayoría de las orquídeas (Arditti, 1992). Hacia la región apical, se hizo evidente una zona meristemática, ésta correspondió al meristemo apical de brote (**Fig. 17a**), constituido por células pequeñas, densamente teñidas, en activa división celular y con una alta relación núcleo-citoplasma (**Fig. 17b**). Se sabe que el meristemo apical de brote, es el primer meristemo en formarse durante el desarrollo de la planta, produciendo un sistema de brote en expansión por la continua formación de tejidos e iniciación de una sucesión de primordios de hojas y yemas (Steeves y Sussex, 1989; Dickison, 2000). Por lo que, una vez que se forma este meristemo es posible la regeneración de una planta completa. Posteriormente, comenzó a hacerse evidente una diferenciación celular interna como una columna central constituida por células densamente teñidas, de forma alargada lo que se define como el procámbium (**Figs. 17c y d**), el cual dará lugar a la formación del tejido vascular. Por tanto, en estas primeras etapas del desarrollo del embrión, los tres principales sistemas de tejidos de la planta (dérmico, vascular y fundamental) se han iniciado. En distintos trabajos se reporta que la presencia del sistema vascular es una de las características más sobresalientes durante el desarrollo de un embrión (Hutchinson *et al.*, 1996; Quiroz-Figueroa *et al.* 2002; Kumar y Millam, 2004).

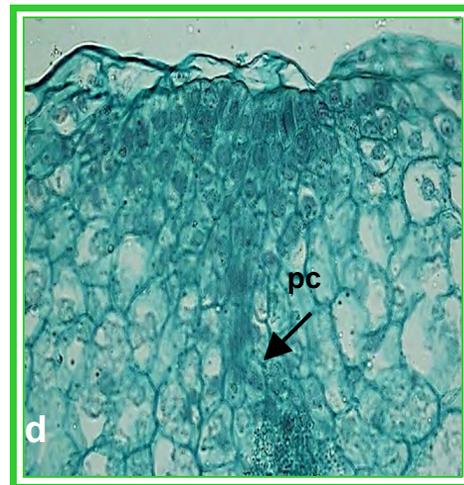
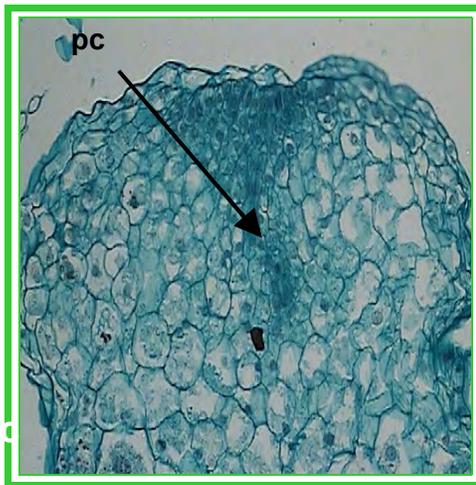
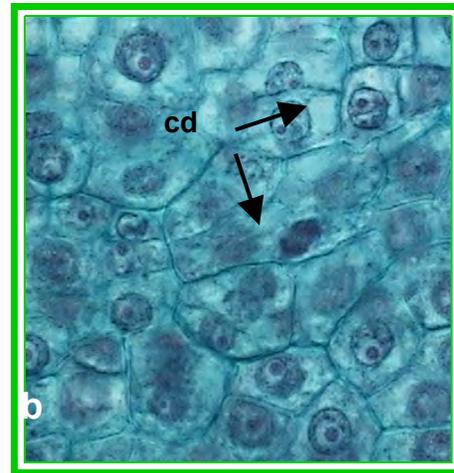
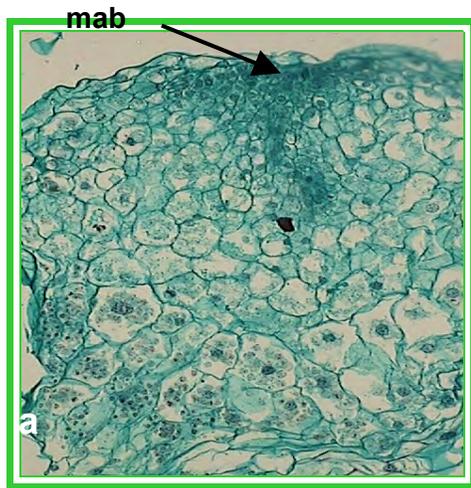


Figura 17. a) Formación del meristemo apical de brote, 400X. b) Células en división celular, en donde se aprecia una alta relación núcleo-citoplasma, 1000X. c y d) Diferenciación del procámbium hacia la zona central, 200X. Abreviaturas: mab = meristemo apical de brote, cd = células en división, pc = procámbium.

A los 65 días de cultivo, en la parte dorsal de las estructuras globulares formadas, se observó la formación de una protrusión (**Figs. 18a y b**), que continuó su desarrollo hasta formar el primer primordio foliar (**Fig. 18c**), y hacia la zona basal se observó la formación de rizoides (**Fig. 18d**). A los 120 días de cultivo, el segundo órgano foliar se desarrolló en posición opuesta al primero, y las hojas subsecuentes se diferenciaron en una secuencia alterna (**Fig. 18e**). Así mismo, en posición opuesta al meristemo apical de brote comenzó a evidenciarse otra zona meristemática que correspondió al meristemo apical de raíz (**Figs. 18f**), formado por células pequeñas, esféricas, con citoplasma denso y núcleos prominentes. Este meristemo continuó su desarrollo y dio lugar a la formación de la primera raíz. Fue posible observar la conexión del tejido vascular entre ambos meristemas formados (**Figs. 18g, h, i**), así como la presencia de traqueidas en el tejido vascular (**Figs. 18j, k, l**), pero no se encontró conexión del tejido vascular entre las estructuras identificadas y el tejido inicial. Muchas especies de orquídeas presentan un patrón de desarrollo similar al encontrado para *Euchile mariae*, el cual también es semejante al documentado por Nishimura (1981), para *Cattleya aurantiaca*, y por Leroux *et al.*, (1995) para *Cypripedium acaule*, durante el desarrollo del embrión hasta la formación de una planta completa.

Varios autores reportan en la literatura que un embrión somático se define como una estructura bipolar con un eje radical-apical, que presenta autonomía frente al tejido generador y está protegido generalmente por una epidermis, además no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de éste, conservando su capacidad para crecer y diferenciarse hasta formar una planta completa bajo condiciones adecuadas de cultivo (Sannasgala, 1989; Escalant y Teissant, 1989; citados por Gómez, 1998; Thorpe & Stasolla, 2001; Razdan, 2002). En el presente estudio, todas estas características fueron observadas por medio de los cortes histológicos en las estructuras globulares generadas, a partir de las secciones apicales y basales de protocormos de *E. mariae*, confirmándose así, que éstas son embriones somáticos.

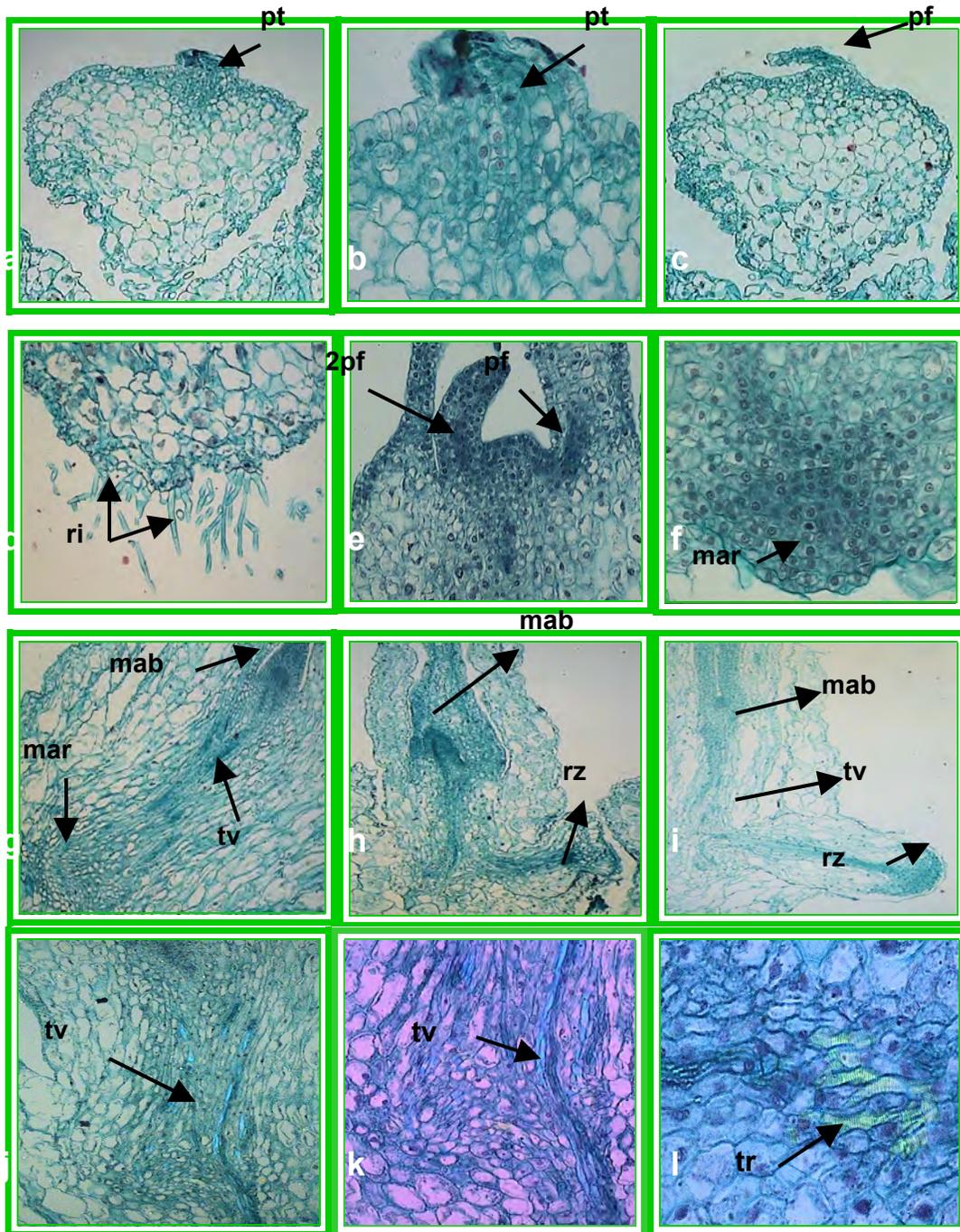


Figura 18. Desarrollo de plántula de *Euschile mariae*. a y b) Formación de una protrusión en el lado dorsal del embrión, 100X, 400X. c) Aparición del primer primordio foliar, 100X. d) Surgimiento de rizoides hacia la zona basal, 100X. e) Formación de los órganos foliares subsecuentes, 200X. f) Meristemo apical de raíz, 400X. g, h, i) Conexión del tejido vascular entre el meristemo apical de brote y el meristemo apical de raíz, 100X. j, k, l) Tejido vascular conformado por traqueidas, 100X, 200X, 400X. Abreviaturas: pt protrusión, pf = primordio foliar, 2pf = segundo primordio foliar, ri = rizoides, mab = meristemo apical de brote, mar = meristemo apical de raíz, rz = raíz, tv = tejido vascular, tr = traqueidas.

Entre los factores que influyen en la inducción de la embriogénesis somática, se encuentran la edad, el estado fisiológico, el genotipo, la orientación del explante al estar en contacto con el medio de cultivo y la cantidad de hormonas que se sintetizan de manera endógena en los tejidos (Razdan, 2002), aunque también se ha observado que el desencadenamiento o la estimulación de la brotación en el cultivo *in vitro*, resulta del empleo de citocininas eventualmente asociadas con las auxinas (Margara, 1988). Esta vía de desarrollo puede ocurrir de manera directa o indirecta. En el primer caso, un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático directamente a partir del tejido del explante, mientras que en la embriogénesis somática indirecta, las células del tejido sufren varias divisiones celulares hasta dar lugar a la formación de un callo, el cual por medio de estímulos, como la adición exógena de hormonas vegetales, dará lugar a la formación de embriones somáticos (Gómez, 1998). De acuerdo con Margara (1988), debido a la totipotencialidad de las células vegetales, la embriogénesis somática puede ser inducida a partir de diferentes tejidos, incluyendo, tallos, peciolo, raíces, hojas, inclusive protoplastos, entre otros. Sin embargo, los tejidos provenientes del embrión, son los que expresan frecuentemente la capacidad morfogenética para formar un embrión somático.

En nuestros experimentos, los embriones somáticos obtenidos surgieron de manera directa a partir de los explantes (secciones de protocormos). Como los protocormos son estructuras que provienen directamente de la germinación de las semillas, presentan células determinadas preembriogénicamente hacia esta vía de desarrollo, por lo que al colocar las secciones de protocormos de *E. mariae*, en un medio de cultivo, adicionado con compuestos orgánicos y con o sin reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) se expresó su totipotencialidad para seguir un patrón de divisiones celulares hasta dar lugar a la formación de embriones somáticos. Se ha mostrado que el proceso de embriogénesis somática es inducido por los reguladores de crecimiento, especialmente las auxinas y citocininas. Las auxinas son requeridas para el establecimiento de la simetría bilateral durante los estados de desarrollo temprano del embrión (Liu *et al.*, 1993), además se ha visto, que constituyen un factor fuertemente asociado con la continua proliferación de las células embriogénicas (Gómez, 1998). Se reporta que altos niveles de auxinas inducen la formación de embriones somáticos, sin embargo, para que éstos continúen su desarrollo es necesaria una reducción de la concentración de las auxinas en el medio de cultivo (George & Sherrington, 1984). Mientras que, las citocininas son necesarias para inducir la división celular en los tejidos vegetales, además de promover la formación de brotes adventicios (Davis, 1995). Por

tanto, el crecimiento y morfogénesis *in vitro* está regulado por la interacción y el balance adecuado entre ambos reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio de cultivo, así como por las hormonas vegetales producidas de manera endógena en los tejidos (George & Sherrington, 1984).

6.8 Pruebas Histoquímicas

La histoquímica se refiere a la tinción específica de una sustancia o compuesto particular presente en un tejido vegetal, por medio de la cual se logra un primer acercamiento de sus posibles contenidos celulares (Sandoval, 2005). De esta manera, mediante el empleo de pruebas histoquímicas, fue posible identificar una alta proporción de contenidos celulares presentes en los embriones somáticos, obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de secciones apicales y basales de protocormos de *Euchile mariae*, encontrándose la presencia de almidón, proteínas y lípidos.

Es sabido que todas las células que constituyen al embrión de las orquídeas contienen reservas de alimento. En embriones de *Cattleya aurantiaca*, se encontró que la mayor parte de las reservas que los constituyen son lípidos, que se encuentran presentes como cuerpos lipídicos en todas las células. También se encontró la presencia de cuerpos proteicos, pero éstos se encontraban restringidos a las células de las dos terceras partes superiores del embrión, incluyendo las que se encuentran en la región meristemática y aquellas que constituyen la mitad superior de la región basal. El almidón estaba generalmente ausente, excepto como pequeños gránulos dentro de proplastidios (Harrison, 1977). Así mismo, Arditti (1967), señala que las principales reservas de alimento en las semillas de las orquídeas parecen ser lípidos; debido a que al realizar un análisis histoquímico de semillas de *Cymbidium*, mostró que contenían un 32% de ácidos grasos y un 1% de azúcares, mientras que el almidón no fue detectado. Leroux *et al.* (1995), mencionan que en embriones de *Cypripedium acaule*, las células que los constituyen presentan en mayor proporción sustancias de reserva de naturaleza proteica y lipídica, aunque también observaron en menor cantidad la presencia de granos de almidón, distribuidos principalmente en las células basales del embrión. Por otro lado, Philip y Nainar (1988), también encontraron en embriones de *Vanilla planifolia* cultivados en un medio con sacarosa, la presencia de cuerpos proteicos acumulados en grandes cantidades en las células apicales, mientras que hacia la región basal estaban prácticamente ausentes, encontrando también grandes cantidades de granos de almidón distribuidos en todas las células del embrión; sin embargo, no encontraron la presencia de

lípidos. Nuestros resultados coinciden parcialmente con lo anteriormente señalado, debido a que a los 35 días de cultivo, mediante las pruebas histoquímicas realizadas, se observaron proteínas al interior de las células de los embriones somáticos, así como en las células del tejido inicial (teñidas en azul intenso). Sin embargo, éstas fueron más abundantes en las células de las dos terceras partes superiores del embrión (**Fig. 19**). También se identificó la presencia de lípidos tanto en las células de los embriones somáticos, como en las células del tejido inicial (teñidos en rojo) (**Figura 20**), así como la presencia de grandes cantidades de almidón en las células del embrión y en el tejido inicial (teñido en color café oscuro) (**Figura 21**). De los tres contenidos celulares identificados en los embriones somáticos de *E. mariae*, el más abundante fue el almidón, mientras que, las proteínas y lípidos se encontraron en menor cantidad. Lo anterior se puede explicar porque la acumulación de almidón parece ser una característica típica de las células de los embriones de las orquídeas que germinan en medios de cultivo que contienen sacarosa (Arditti, 1992); mientras que en medios de cultivo libres de sacarosa el embrión utiliza las reservas lipídicas lentamente. Esto se ha observado en protocormos de *Vanda*, en donde se encontraron grandes cantidades de almidón, como resultado de la adición de sacarosa al medio de cultivo (Philip y Nainar, 1988), mientras que en protocormos de *Cypripedium acaule*, al ser cultivados en medio sin sacarosa, durante su desarrollo las reservas de almidón desaparecieron rápidamente de las células (Leroux *et al.*, 1995). En condiciones naturales, también se ha observado que existe un consumo lento de los metabolitos de reserva presentes en el embrión de las semillas de las orquídeas, lo que les permite sobrevivir por un largo periodo de tiempo hasta que logran establecer una asociación simbiótica con un hongo micorrízico apropiado. Así mismo, se reporta que en plántulas de orquídeas que se desarrollan en un medio libre de sacarosa a los 87 días de cultivo todas las reservas lipídicas se han utilizado y si éstas no son subcultivadas a un medio con azúcares, pueden eventualmente morir. En cambio, en presencia de sacarosa, los embriones son capaces de continuar con un buen desarrollo y dar lugar a la formación de hojas y raíces hasta constituir una planta completa (Harrison, 1977; Arditti, 1992). Por otra parte, la presencia de proteínas y lípidos en menor proporción en los embriones somáticos obtenidos, nos indica también que estos compuestos han sido degradados y movilizados como una fuente de energía para continuar con el proceso de división y diferenciación celular del embrión.

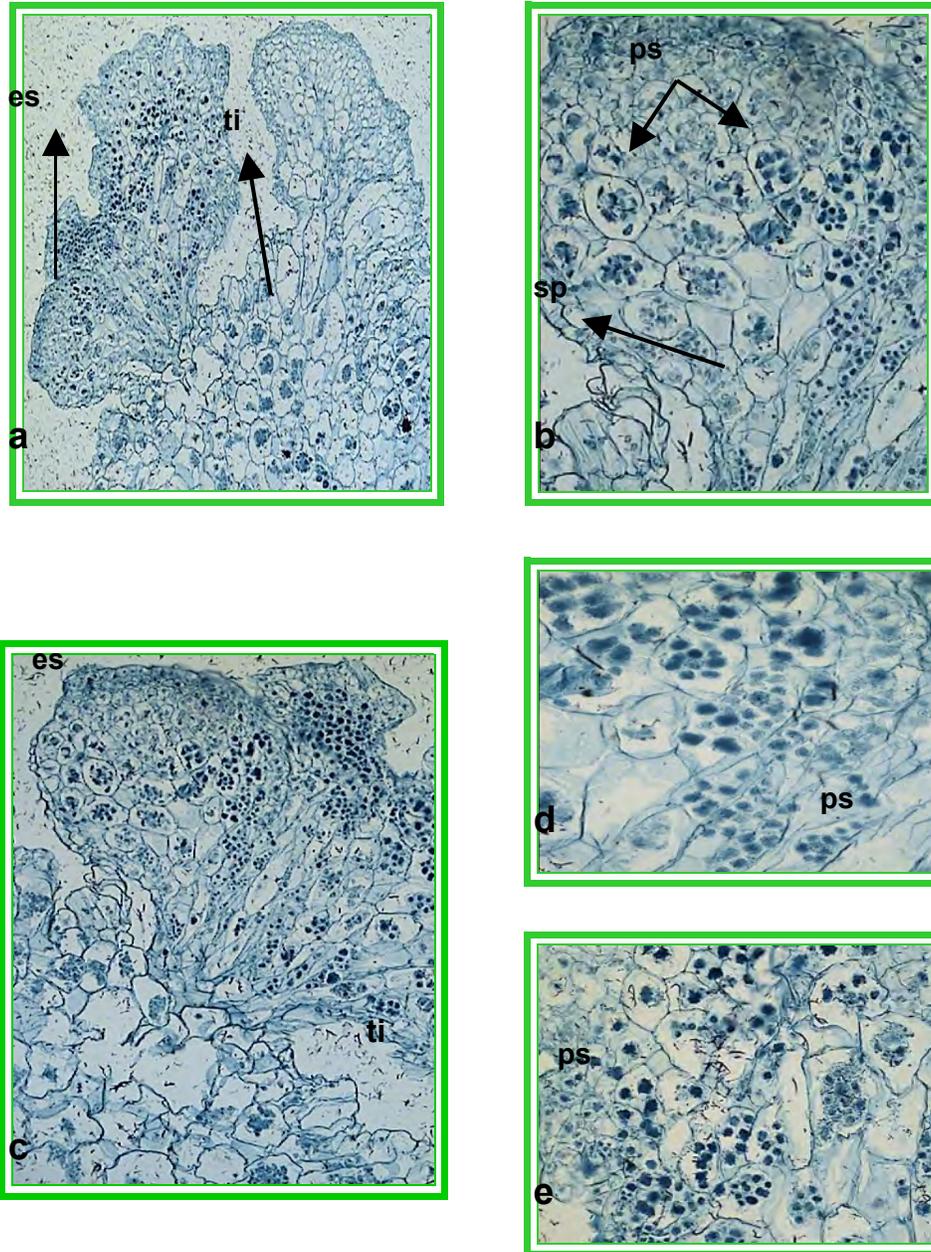


Figura 19. Presencia de proteínas teñidas con azul negro de naftol en embriones somáticos de *Euchile mariae*. a) Sección longitudinal de embriones somáticos y tejido inicial, 50X. b) Proteínas más abundantes en las dos terceras partes superiores del embrión, 200X. c) Embrión somático y tejido inicial, 100X. d) Proteínas en células parenquimáticas del embrión somático, 200X. e) Proteínas en el tejido inductor, 200X. Abreviaturas: es = embrión somático, ti = tejido inicial, ps = proteínas, sp = suspensor.

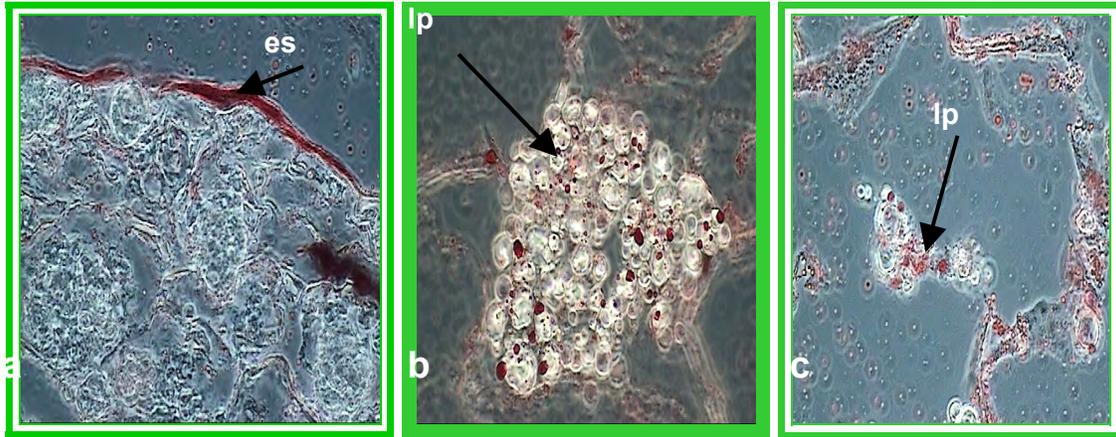


Figura 20. Presencia de lípidos teñidos con Sudán IV, en embriones somáticos de *Euchile mariae*, en medio MS modificado. a) Sección longitudinal del embrión somático, 100X. b) Presencia de lípidos en células del embrión, 1000X. c) Presencia de lípidos en el tejido inicial, 1000X. Abreviaturas: es = embrión somático, lp = lípidos.

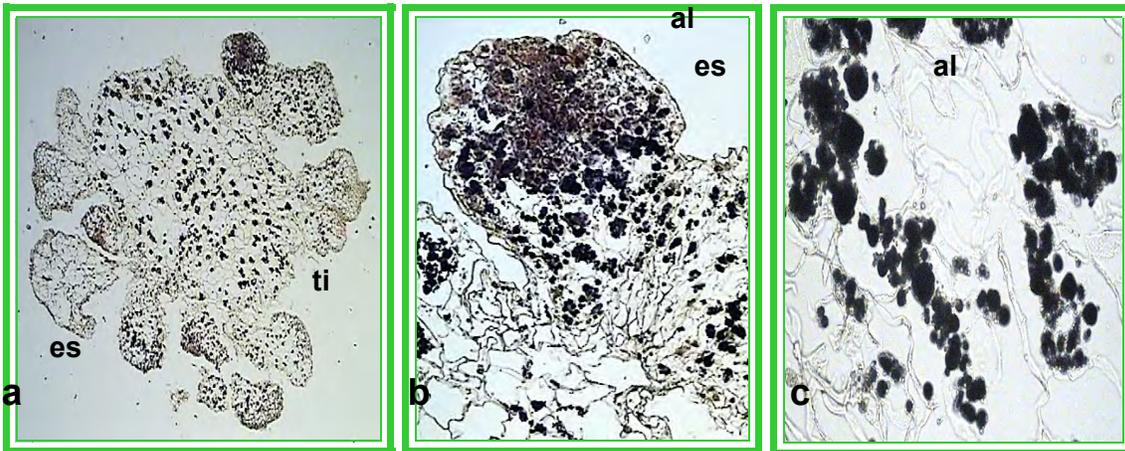


Figura 21. Presencia de almidón teñido con lugol, en embriones somáticos de *Euchile mariae*, en medio MS modificado. a) Sección longitudinal de embriones somáticos y tejido inductor, 25X. b) Presencia de almidón en las células del embrión, 100X. c) Presencia de almidón en el tejido inductor, 400X. Abreviaturas: es = embrión somático, ti = tejido inicial, al = almidón.

Las proteínas, lípidos y almidones son contenidos celulares primarios. El almidón, es el polímero de reserva más común, se sintetiza en los amiloplastos y puede estar como reserva con una duración más o menos larga (en los cloroplastos formando el almidón de asimilación o en los amiloplastos formando el almidón de almacenamiento de larga duración). Está presente en todas las plantas, pero es particularmente importante en los órganos de reserva, como en tubérculos y en diversas semillas. Las proteínas son los componentes principales de los corpúsculos protoplasmáticos vivos, pero se encuentran también como sustancias ergásticas transitorias e inactivas. La proteína ergástica es conocida como material de almacenamiento y se encuentra depositada en forma amorfa, cristalina o globular. Las sustancias proteicas son comunes en frutos y semillas, principalmente en el embrión y endospermo. Los lípidos se encuentran en todas las células como material de reserva principalmente en semillas y frutos (Sandoval, 2005). Además, varios estudios han sido realizados utilizando como marcadores de la calidad del desarrollo del embrión somático la presencia de distintas sustancias de reserva tales como la acumulación de proteínas, lípidos y almidón, aunque esto ha sido poco estudiado (Gómez, 1998).

Así mismo, Harrison (1977), señala que generalmente altas concentraciones de materiales de reserva se encuentran en los cotiledones y/o en el endospermo en la mayoría de las plantas. Como estas estructuras no están presentes en las semillas de la mayor parte de las orquídeas, el embrión funciona aparentemente como un reservorio de nutrientes. Los experimentos realizados en el presente estudio soportan este punto de vista, debido a que se confirmó la presencia de grandes cantidades de sustancias de reserva en los embriones somáticos de *Euchile mariae*, presentes en forma de cuerpos lipídicos, proteicos y almidones. A partir de estas observaciones se sugiere que, la presencia de estos compuestos refleja la alta actividad metabólica que ocurre al interior de las células del embrión, los cuales a su vez sirven como fuentes de energía para que el embrión continúe con su crecimiento y desarrollo hasta dar lugar a la formación de plantas completas.

7. CONCLUSIONES

- Mediante la utilización de los medios de cultivo KC y MS modificados, se obtuvo un alto porcentaje de germinación mayor al 90% en las semillas de *Euchile mariae*.
- Se logró la regeneración de plantas completas a partir de secciones apicales y basales de protocormos de *Euchile mariae* en medio MS modificado.
- El medio MS modificado para el cultivo *in vitro* de la especie estudiada, resultó ser eficiente para inducir la formación de PLB's en ambos tipos de explante, y para el crecimiento de las plántulas obtenidas.
- De los dos tipos de explantes empleados, las secciones basales de los protocormos, mostraron una mayor capacidad morfogénica y regenerativa con respecto a las secciones apicales, puesto que a partir de éstas se logró la mayor formación promedio de PLB's por explante (11.44 ± 9.64) después de 165 días de cultivo,
- En las secciones basales de protocormos de *E. mariae*, en el medio de cultivo MS modificado, adicionado con 1mg/l de BA sin auxinas, se obtuvo la mayor formación de PLB's por explante, con un total de 1323 PLB's, alcanzando un promedio por explante de 33.07 ± 20.75 PLB's.
- Para las secciones apicales de protocormos de *E. mariae*, la mayor formación de PLB's por explante, se presentó en el medio de cultivo MS modificado adicionado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BA, formándose un total de 440 PLB's y un promedio de 11.00 ± 9.55 PLB's por explante.
- El sistema empleado para la aclimatización de esta orquídea epífita (montaje sobre un tronco más una mezcla de *Sphagnum* y agrolita 3:1), favoreció el establecimiento *ex vitro* y desarrollo de las plántulas obtenidas.
- Las plántulas obtenidas al ser aclimatizadas mostraron un elevado porcentaje de sobrevivencia cercano al 100%.
- Por medio del análisis histológico se logró la identificación de estructuras bipolares (embriones somáticos), por lo que la vía de regeneración obtenida a partir de ambas secciones de protocormos de *E. mariae*, fue embriogénesis somática directa.
- Las pruebas histoquímicas empleadas permitieron la identificación de contenidos celulares tales como: proteínas, almidón y lípidos en los embriones somáticos (PLB's) identificados.

- Se logró establecer un protocolo eficiente para la germinación asimbiótica y propagación masiva de *Euchile mariae*, especie endémica de México, que puede ser aplicado a su estudio, conservación, propagación comercial y uso sustentable.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una alternativa viable y de gran utilidad para la micropropagación de otras especies de orquídeas que se encuentren amenazadas y/o en vías de extinción, contribuyendo a aminorar la presión en sus poblaciones silvestres, ya que en un tiempo relativamente corto es posible lograr la germinación de semillas y la formación de plantas completas.

8. APÉNDICES

APÉNDICE A. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) 1962.

| N° | COMPONENTES | g/l | g/10 l |
|----------|--|----------|---------|
| 1 | MACRONUTRIENTES | | |
| | (NH ₄)NO ₃ | 1.65 | 16.5 |
| | KNO ₃ | 1.9 | 19 |
| | MgSO ₄ * 7H ₂ O | 0.37 | 3.7 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0.17 | 1.7 |
| 2 | CALCIO | | |
| | CaCl ₂ | 0.44 | 4.4 |
| 3 | MICRONUTRIENTES | | |
| | MnSO ₄ * H ₂ O | 0.01689 | 0.1689 |
| | ZnSO ₄ * 7H ₂ O | 0.0086 | 0.086 |
| | H ₃ BO ₃ | 0.0062 | 0.062 |
| | KI | 0.00083 | 0.0083 |
| | Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O | 0.00025 | 0.0025 |
| | CuSO ₄ * 5H ₂ O | 0.000025 | 0.00025 |
| | CoCl ₂ * 6H ₂ O | 0.000025 | 0.00025 |
| 4 | FIERRO | | |
| | FeSO ₄ 7H ₂ O | 0.0278 | 0.278 |
| | Na ₂ EDTA | 0.0373 | 0.373 |
| 5 | VITAMINAS | | |
| | Tiamina * HCl | 0.0001 | 0.001 |
| | Ácido Nicotínico | 0.0005 | 0.005 |
| | Piridoxina * HCl | 0.0005 | 0.005 |
| 6 | INOSITOL | 0.10 | 1.0 |
| 7 | GLICINA | 0.002 | 0.02 |
| 8 | CARBOHIDRATOS | | |
| | Sacarosa | 30.0 | |

APÉNDICE B. Medio de cultivo Knudson C (KC) 1946.

| COMPONENTES | FÓRMULA | g/l |
|----------------------------|--|------------|
| Nitrato de calcio | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.00 |
| Fosfato monopotásico ácido | KH_2PO_4 | 0.25 |
| Sulfato de magnesio | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 |
| Sulfato de amonio | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.50 |
| Sulfato ferroso | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| Sulfato de manganeso | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0.0075 |
| | | |
| CARBOHIDRATOS | | |
| Sacarosa | | 20.0 |

9. LITERATURA CITADA

Ackerman, J. D. 1998. Evolutionary potencial in or orchids: patterns and strategies for conservation. *Selbyana* 19(1): 8-14.

Agramonte, D. P., Jiménez, F. T. and Dita, M. A. R. 1998. Aclimatización. pp. 193-205. In: Ponce, J. N. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol.1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.

Álvarez, J. S. 1993. Contribución de la Sociedad Mexicana de Botánica a la Investigación y Conservación de la Biodiversidad. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 44: 51-57.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33: 1-82.

Arditti, J. 1967b. Niacin biosynthesis in germinating *x Laeliocattleya* orchid embryos and young seedlings. *Amer. J. Bot.* 54(3):291-291.

Arditti, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture - a manual. pp. 204-293. In: Arditti, J. (ed.). *Orchid Biology: Reviews and perspectives I*. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA. 691 p.

Arditti, J. and Ernst, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. pp.177-222 In: Arditti, J. (ed.). *Orchid biology: Reviews and perspectives, III*. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Arditti, J. and Ernst, R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. Wiley Interscience. New York. 682 p.

Arditti, J. and Krikorian, A. D. 1996. Orchid micropropagation : the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Bot. J. Linn. Soc.* 122: 183-241.

Atta-Alla, H. and Staden, V. 1997. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 48: 209-212.

Atwood, J. T. 1997. Some thoughts on Orchid Consevation 97. *Selbyana* 18(2): 151.

Ávila, D. I. y Oyama, K. 2002. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE). *Biodiversitas* 7 (43): 9-12.

Ayensu, E. S. and Defilipps, R. A. 1981. The international regulation of trade in endangered species of wild orchids. *Am. Orchid Soc. Bull.* 50(8): 959-967.

Baltazar, G. R. 2004. Micropropagación de *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. 124 p.

Barba, A. A., Luna, R. S. y Romero, A. J. 2002. Orquideología básica. BIOTEMAS. Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 18 p.

Barrera, V. D. 2006. Regeneración *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., (Orchidaceae) a partir de hojas inmaduras y callo. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 106 p.

Bhadra, S.K. and Hossain, M.M. 2003. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (lam.) Schltr., and endangered orchid species. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 13(2):165-171.

Brummitt, L.W. 1962. Cypripediums. The Orchid. Rev. 70: 181-183, 249-251, 384-387.

Butcher, D. and Marlow, S.A. 1989. Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. pp. 8-31. In: *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management* (H.W. Pritchard, ed.). Cambridge Univ. Press.

Cabrera, C. T. 1999. Orquídeas de Chiapas. Primera edición. Instituto de Historia Natural. Gobierno del Estado de Chiapas. México. 194 p.

Castillo, M. M. 2002. Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 52 p.

Challenger, A. 1998. Ambiente físico y zonas ecológicas de México. pp. 269-293. In: *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro*. CONABIO. México.

Chang, R. 1999. Química. Sexta edición. McGraw-Hill. México. 993 p.

Chang, C. and Chang, W. C. 1998. Plant regeneration from callus of *Cymbidium ensifolium* var 'misericors'. Plant Cell Rep. 17: 251-255.

Chávez, A. V. M. 1980. Cultivo asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Angel. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 81 p.

Chávez, A. V. M. y Rubluo, I. A. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. pp. 123-131. In: Linares, E., Dávila, P., Chiang, F., Bye, R. y Elias, T. S. (Eds.) *Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques*. Instituto de Biología. UNAM.

Chávez, A. V. M., Litz, R. E. and Norstog, K. 1992. *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 30: 93-98.

Chávez, V. M., Litz, R. E., Moon, P. A. and Norstog, K. 1992. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia Mexicana* var. *Robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). In Vitro Cell Dev Biol 28: 59-63.

- Chávez, V. M., Litz, R. E. and Norstog, K. 1992. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila* Plant Cell Tiss. Organ Cult. 30: 99-105.
- Chávez, V. M., Litz, R. E. Monroy, M. A. Moon, P. A. and Vovides, A. 1998. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature phase trees. Plant Cell Rep. 17(8):612-616.
- Chen, J. T., Chang, C. and Chang, W. C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. Plant Cell Rep. 19: 143-149.
- Chen, J. T. and Chang, W. C. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Sci. 160: 87-93.
- Chen, J. T. and Chang, W. C. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* "Gower Ramsey". Plant Growth Regulation 34: 229-232.
- Clark, D. E. 1977. How to grow orchids. Second edition. Lane Publishing Co. Menlo, Park California. 64 p.
- Colli, S. and Kerbauy, G.B. 1993. Direct root tip conversion of *Catasetum* into protocorm-like bodies. Effects of auxin and cytokinin. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 33(1): 39-44.
- Conabio, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 341 p.
- Constabel, F., Shyluk, J. P. 1994. Initiation, nutrition and maintenance of plant cell and tissue cultures. pp. 3-15. In: Vasil, I., K. and Thorpe, T. A. (eds.). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Cornejo, G. M. 2002. Germinación *in vitro* y preservación de semillas de *Laelia speciosa* (Orchidaceae), en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. Mich., México. 41 p.
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K., W. and Barrett, R. L. 2003. Orchid Conservation: a global perspective. pp. 1-24. In: Dixon, K.W., Kell, S. P., Barret, R. L, and Cribb, P. J. (eds.). Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.
- Davis, A. 1946. Orchid Seed and Seed Germination. Am. Orchid Soc. Bull. 15: 218-223.
- Davies, P. J. 1995. Plant hormones. Physiology, biochemistry, and molecular biology. Second edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 833 p.
- Debergh, P. C. 1991. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. Acta Horticulturae 289: 291-300.
- Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. 1991. Micropropagation. Technology and application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-13.
- Dickison, W. C. 2000. Integrative Plant Anatomy. Harcourt Academic Press. USA. 517 p.

- Dirzo, R. 1999. La biodiversidad como crisis ecológica actual. ¿Qué sabemos?. pp. 339-412. In: Núñez F. J. y Eguiarte, L. E. La evolución biológica. Facultad de Ciencias e Instituto de Ecología, UNAM y Conabio. México.
- Dodds, J. H. and Roberts, L. W. 1995. Experiments in plant tissue culture. Third edition. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 256 p.
- Dressler, R. L. and Pollard, G. E. 1974. El género *Encyclia* en México. Asociación Mexicana de Orquideología, A. C. México. 158 p.
- Dressler, R.L. 1981. The Orchids. Natural history and classification. Harvard University Press. London. 332 p.
- Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland, Oregon. 313 p.
- Ernst, R. 1967. Effect of select organic nutrient additives on growth *in vitro* of *Phalaenopsis* seedlings. Am. Orchid Soc. Bull. 36: 694-704.
- Ernst, R. 1975. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. Am. Orchid Soc. Bull. 43: 35-38.
- Espejo, S. A. y López Ferrari, F. A. R. 1998. Las Monocotiledóneas Mexicanas una Sinopsis Florística 1. Lista de Referencia Parte VII. Orchidaceae I. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 90 p.
- Espejo, S. A., García, C. J., López, F. A. R., Jiménez, M. R. y Sánchez, S. L. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Orq. (Méx.) Vol. 16. Número único. 332 p.
- Fay, M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. Biodiversity and Conservation 3: 176-183.
- Forero, E. 1994. El futuro de la botánica en América Latina. Acuerdos y realidades. Ciencias 34: 35-41.
- García-Mendoza A. J., Ordóñez, M. J. y Briones-Salas, M. 2004. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. México. 605 p.
- Gaspar, T., Kevers, C., Rampant, F., Chèvecoeur, M., Penel, C., Greppin, H. and Dommes, J. 2003. Changing concepts in plant hormone action. In Vitro Cell. Dev. Biol. 39(2): 85-106.
- George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstone, England. 709 p.
- Goh, C. J. 1990. Orchids monopodials. pp. 598-637. In: Ammirato, P.V., Evans, D. R., Sharp, W. R. and Bajaj, Y.P.S. (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 5. Ornamental species. McGraw-Hill Publishing Company. New York.

Gómez, R. K. 1998. Embriogénesis somática. pp. 57-77. In: Ponce, J. N. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.

González, C. O. 2001. Aislamiento y respuesta *in vitro* de diferentes estadios embrionarios inmaduros de *Chenopodium quinoa* Willd. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Hágsater, E. 1974. Medios de cultivo para orquídeas. Orq. (Méx.) 4 (3):1-6.

Hágsater, E. y Soto, A. M. A. 1998. Orchid conservation in Mexico. Selbyana 19(1): 15-19.

Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M. A. and Dressler, R. L. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín. México. 304 p.

Halffter, G. y Ezcurra, E. 1992. ¿Qué es la biodiversidad?. pp. 3-23. In: Halffter, G. (Comp). La diversidad biológica de Iberoamérica I. Acta Zoológica Mexicana. Volumen especial. Instituto de Ecología. México.

Harrison, C. R. 1977. Ultraestructural and histochemical changes during germination of *Cattleya aurantiaca* (ORCHIDACEAE). Bot. Gaz. 138(1): 41-45.

Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Sci. 85(12): 1704-1712.

Hazra, S. K., Sudripta, D. y Das, A. K. 2002. Sisal regeneration via organogenesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 70: 235-240.

Hey, G. L. 1963. The mixed orchid house. The Orchid Rev. 71:196-198.

Hernández, A. M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr, (Orchidaceae). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Hernández, A. M. 1996. Micropropagación de *Piqueria trinervia* y su sobrevivencia en suelo derivado de cenizas volcánicas del Ajusco. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 97 p.

Hernández, H. J., Hernández, S. O. y Mata R. M. 2001. Regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* Lindl. y *Catasetum intergerrimum* Hook. Amaranto 14(1): 3-12.

Humphreys, J.L. 1960. Help wanted. The Orchid Rev. 68:141-142.

Hutchinson, M. J., Krishnaraj, S. y Saxena, P. K. 1996. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in *Geranium* (Pelargonium x Hortorum Bailey) hypocotyls cultures. Plant Sci. 157:440-446.

Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. Plant Cell Rep. 17: 446-450.

- Ichihashi, S. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. *Lindleyana* 7(4): 208-215.
- JayaSree, T. Pavan, U., Ramesh, A. V., Rao, K., Mohan-Reddy, J. and Sadanandam, A. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 64:13-17.
- Jiménez, E. G. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. pp. 13-24. In: Ponce, J. N. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.
- Jiménez, E. G. 1998. Cultivo de ápices y meristemos. pp. 45-56. In: Ponce, J. N. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.
- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Čapková, V. and Schäfer, C. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Sci.* 161: 695-701.
- Kerbauy, G. B. 1991. *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip cells into protocorm-like bodies. *J. Plant Physiol.* 138: 248-251.
- Kerbauy, G. B. 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.
- Kerbauy, G. B. and Colli, S. 1997. Increased conversion of root tip meristems of *Catasetum fimbriatum* into protocorm-like bodies mediated by ethylene. *Lindleyana* 12(2):59-63.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Am. Orchid Soc. Bull.* 15: 214-217.
- Kumar, S. S. and Millam, S. 2004. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: A histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep.* 23: 115-119.
- Lam, T.W., Ernst, R., Arditti, J. and Ichihashi, S. 1991. The effects of complex additives and 6-(γ,γ -dimethylallylamino)-purine on the proliferation of *Phalaenopsis* protocorms. *Lindleyana* 6(1): 24-26.
- Lawrence, D. and Arditti, J. 1964. A new medium for the germination of orchid seeds. *Am. Orchid Soc. Bull.* 33: 766-768
- Lee, Y. I. and Lee, N. 2003. Plant regeneration from protocorm derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 475-479.
- Leroux, G., Barabé, D., y Vieth, J. 1995. Morphogenese comparee de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultivés *in vitro* avec ou sans sucre. *Can. J. Bot.* 73 : 1391-1406.
- Lin, C. C. 1986. *In vitro* culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Lindleyana* 1: 158-163.

Lin, Y., Chang, C. and Chang, W. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum hybrid*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 62: 21-25.

Litz, R. E. and Jarret, R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. pp.143-172. In: Roca, W. M. y Mroginski, L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia.

Liu, C. M., Xu, Z. H. and Chua, N. H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. The Plant Cell. 5: 621-630.

López-Escamilla, A. L., Olgún-Santos, L. P., Márquez, J. M., Chávez, V. M. and Bye, R. 2000. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endangered spruce tree. Annals of Botany 86:921-927.

Luna, R. S., Barba, A. A. y Romero, A. J. 2004. Orquídeas: Germinación de semillas. Unidad de investigación en Biología Vegetal (UIBV). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 17 p.

Magaña, P. y Villaseñor J.L. 2002. La flora de México. ¿Se podrá conocer totalmente? Ciencias 66: 24-26.

Martínez, P. A. 1985. Inducción *in vitro* de brotación múltiple en *Bletia urbana* Dressler (ORCHIDACEAE) a partir de protocormos seccionados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 66 p.

Martínez, P. A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 107 p.

Martínez, P. A., Ortega, L. M., Chávez, A. V. and Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and Organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: considerations for its conservation. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 74: 135-142.

Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la Organogénesis. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 230 p.

Mata, R. M., Chávez, A. V. M. and Bye, B. R. 2001. *In vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37: 73-78.

Mata-Rosas, M., Monroy, M. A., Moebius, K. and Chávez, V. M. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37:400-404

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

Mayer, J. R. 1945. The use of tomato juice in the preparation of a medium for the germination of orchid seeds. Am. Orchid Soc. Bull. 14: 99-101.

Mc Kendrick, S. 2000. Manual para la germinación de orquídeas *in vitro*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. 17 p.

Mittermeier, R. A. 1988. Primate diversity and the tropical forest. Case studies from Brazil and Madagascar and the importance of the megadiversity countries. pp. 145-154. In: Wilson, E.O. (ed.). Biodiversity. National Academy Press. Washington, D. C.

Moebius-Goldammer, K. G., Mata-rosas, M. and Chávez-Ávila, V. M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (lem.) K.Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 39: 388-393.

Morel, G. M. 1960. Producing virus-free cymbidiums. Am. Orchid Soc. Bull. 29: 495-497.

Morel, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. In: Withner, C. L. (ed.). The orchids. Scientific studies. Wiley-Interscience. USA. 604 p.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nishimura, G. 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (ORCHIDACEAE) seedlings. Bot. Gaz. 142(3):360-365.

Nomura, K. and Komamine, A. 1999. Physiological and morphological aspects of somatic embryogenesis. pp. 115-131. In: Soh, W.Y. y Bhojwani, S. S. (eds.). Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Obaidul, M. I., Matsui, S. and Ichihashi, S. 2000. Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. Lindleyana 15(2): 81-88.

Peres, L.E.P, and Kerbauy, G.B. 1999. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). Plant Cell Rep. 18(12): 1002-1006.

Pérez, Molphe-Balch, E. M., Ramírez, M. R., Núñez, P. H.G y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179 p.

Philip, V. J. and Nainar, A. Z. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using Tissue Culture. J. Plant Physiol. 122: 211-215.

Philip, V. J. and Nainar, A. Z. 1988. Structural changes during the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Ann. Bot. 61: 139-145.

Pierik, R. L. M., and Steegmans, H. M. 1972. The effect of 6-benzylamino purine on growth and development of *Cattleya* seedlings grown from unripe seeds. Z. Pflanzenphysiol. 68:228-234.

Poole, H. A. and Sheehan, T. J. 1977. Effects of media and supplementary microelement fertilization on growth and chemical composition of *Cattleya*. Am. Orchid Soc. Bull. 46(8):155-160.

Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. and Plzánková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 42(4): 481-497.

Quiroz-Figueroa, F.R., Fuentes-Cerda, C.F., Rojas-Herrera, R. and Loyola-Vargas, V. M. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 20: 1141-1149.

Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot, and J. Fa. 1993. Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press. New York. 812 p.

Ramírez, F. M. C. 1990. Establecimiento del cultivo *in vitro* de orquídeas mexicanas en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Rangel, G. L. M. 1995. Regeneración *in vitro* a partir del cultivo de ápices de tallo de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl. (ORCHIDACEAE), especie mexicana en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 66 p.

Ranjan, N. N., Prasad, R. S. and Patnaik, S. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Sci. Hort.* 71:243-250.

Rao, A. N. 1977. Tissue culture in the orchid industry. pp. 44-69. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (eds.). Applied and fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Verlag, Berlin.

Rasmussen, H. N. 1998. The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126 (1-2): 49-64.

Raven, P. 1987. The scope of the plant conservation problem world-wide. pp. 19-29. In: Bramwell, D., Hamman, O., Heywood, V., y Synge, H. (eds.). Botanic Gardens and the World Conservation Strategy Academic Press. London.

Razdan, M. K. 2002. Introduction to Plant Tissue Culture. Second edition. Science Publishers, Inc. USA. 375 p.

Rittershausen, W. and Rittershausen, B. 2001. Gardener's guide to growing Orchids. A complete guide to cultivation and care. Timber Press. 119 p.

Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 953 p.

Rodan, B. D. and Campbell, F. T. 1996. CITES and sustainable management of *Swietenia macrophylla* King. *Bot. J. Linn. Soc.* 122: 83-87.

Rodríguez, F. L. M. 2000. Germinación y desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilum exstaminodium* (Castaño, Hágsater, & Aguirre) V. A. Albert & Börge Pett. y *Paphiopedilum caudatum* (Rolfe) V. A. Albert & Börge Pett. (Orchidaceae), especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 65 p.

Rojas, B. F. 2006. Regeneración *in vitro* de *Vanilla Planifolia*, Salisbury (Orchidaceae), especie endémica mexicana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Romero, A. J., Luna, R. S. y Barba, A. A. 2002. Reproducción sexual de las angiospermas. Unidad de investigación en Biología Vegetal (UIBV). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 25 p.

Rozzi, R., Primarck, R., Feinsinger, P., Dirzo, R. y Massardo, F. 2001. ¿Qué es la biología de la conservación?. pp. 35-58. In: Rozzi, R., R. Primarck, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo (eds.). Fundamentos de la conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas. Fondo de Cultura Económica, México.

Rubluo, A., Chávez, V. y Martínez, A. 1989. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (ORCHIDACEAE) in its natural habitat. Lindleyana 4(2): 68-73.

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

Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. pp. 129-145. In: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. and Fa, J. (eds.). Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press. New York.

Saiprasad, G.V.S. and Polisetty, R. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. In Vitro Cell. Dev. Biol. 39 (1): 42-48.

Salazar, R. V. M. 2003. Micropropagación de *Mormodes tuxtlensis* Salazar, *Cuitlautzina pendula* La Llave & Lex. y *Lycaste skinneri* (Batem. Ex. Lind.) lind. (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de licenciatura. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 106 p.

Sandoval, E. Z. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología, UNAM. 278 p.

Santos, H. L., Martínez, G. M., Campos, J.E. y Aguirre, L. E. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. Hort. Sci. 40(2): 439-442.

Sarmiento, M. P. y Romero, C. G. 2000. Orquídeas mexicanas. Grupo Editorial Miguel Angel Porrúa. México. 147 p.

Sagawa, Y. 1991. Clonal Propagation of orchids. pp. 1-7. In: Plant Cell Tissue Culture Manual C1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Sagawa, Y. and Kunisaki, J.T. 1984. Clonal propagation: Orchids. pp. 61-67. In: Vasil, I.K. (ed.). Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 1. Academic Press Inc. Orlando.

Sagawa, Y. and Shoji, T. 1967. Clonal propagation of Dendrobium through shoot meristem culture. Am. Orchid Soc. Bull. 36: 856-859.

SEMARNAT, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial (6 de marzo 2002). México, D.F.

- Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Ashok Kumar, H.G. and Ravishankar, B.V. 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 60: 151–154.
- Soberón, J. M. y Llorente, J. B. 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 44: 3-17.
- Soto, A. M. A. 1994. Population studies in Mexican orchids. pp. 153-160. In: Pridgeon, A. M. (ed.) *Proceedings, 14th World Orchid Ciongress*. HMSO, Edinburgh.
- Soto, A. M. A. 1996. México. pp. 53-58. In: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. *Orchids-Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.
- Soto, A. M. A. 2002. *Euchile mariae* (Ames) Withner. En: Hágsater, E. y Soto, M. (ed.), *Icones Orchidacearum. Orchis of Mexico Part 2,3*. Asociación Mexicana de Orquideología. A.C. Mexico. Lámina 584.
- Soto, A. M. A. y Salazar, G. A. 2004. Orquídeas. pp. 271-295. In: García-Mendoza A. J., Ordóñez, M. J. y Briones-Salas, M. (eds.) *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. México.
- Steeves, T. A. and Sussex, I. M. 1989. *Patterns in plant development*. Cambridge University Press. New York. 388 p.
- Sweet, H. C. and Bolton, W.E. 1979. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. *Amer. J. Bot.* 66(6): 692-698.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Second edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland Massachusetts. 690 p.
- Téllez, V. M. A. A. 2003. La etnobotánica de la familia Orchidaceae en México. pp. 163-169. In: Montufar, L. A. (Comp). *Estudios etnobiológicos. Pasado y presente de México*. INA-Conaculta. México.
- Terzi, M. and Loschiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. pp. 54-66. In: Bhojwani, S. S. *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier Science Publishers. The Netherlands.
- Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XIV, Núm. 81: 17-30.
- Toledo, V. M. 1989. *La producción rural en México: alternativas ecológicas*. Fundación Universo Veintiuno, México.
- Toledo, V. M. 1994. La diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas. *Ciencias*. 34: 43-59.

Toledo, V. M. y Ordóñez, J. M. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. pp. 739-757. In: Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (Comps). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. UNAM. México.

Thorpe, T. A. 1990. The Current Status of Plant Tissue Culture. pp. 1-33. In: Bhojwani, S. S. (ed.) Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier Science Publishers. USA.

Thorpe, T. A. and Stasolla, C. 2001. Somatic Embryogenesis. pp. 279-336. In: Bhojwani, S. S. and Soh, W. Y. (eds.). Current Trends in the Embriology of Angiosperms. Kluwer Academic Publishers. London.

Torres, J. y Mogollón, N. 2000. Micropropagación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook mediante brotación axilar inducida por tidiazurón. BIOAGRO 12(1): 10-14.

UICN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. *Orchids*-Status Survey and Action Plan. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK. 153 p.

Vacin, E. F. and Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110: 605-613.

Vacin, E. F. and Went, F. W. 1949. Use of tomato juice in the asimbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 11: 174-183.

Velásquez, A., Romero, F. 1999. Biodiversidad de la región de montaña del sur de la Cuenca de México: bases para el ordenamiento ecológico. Universidad Autónoma Metropolitana. Secretaria del Medio Ambiente. Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural. México. 351 p.

Villalobos, V. M. y Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. pp. 127-142. In: Roca, W. M. y Mroginski, L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia.

Wang, P. J. and Huang, L. C. 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ culture. *In Vitro* 12, 260-262.

Withner, C. L. 1998. pp. 137-140. In: The *Cattleyas* and their relatives. Vol V. Timber Press. Portland, Oregon.

Zettler, L. W. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. Selbyana 18(2):188-194.

www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/cites/doctos/acerca_cites.html

www.oregon.conevyt.org.mx/actividades/diversidad/lectura_biodiversidad.htm.