



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Germinación *in vitro* de tres especies de orquídeas mexicanas para su  
conservación *ex situ***

Tesis

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología

Presenta:

**Bióloga Yareli Odemaris Buendía López**

Comité tutorial:

Directora: Dra. María Dolores García Suárez.

Asesores: Dr. Héctor Fernando Serrano

M. en B. E. José Ángel Lechuga Corchado

Ciudad de México

Diciembre 2017



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

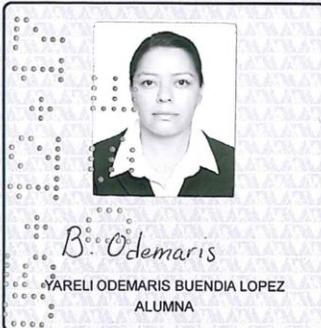
## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00162  
Matrícula: 2153803968

GERMINACIÓN *In vitro* DE TRES  
ESPECIES DE ORQUÍDEAS  
MEXICANAS PARA SU  
CONSERVACIÓN *ex situ*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 1 del mes de diciembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES  
DRA. MARIA DEL ROCIO ZARATE HERNANDEZ  
M. EN B.E. JOSE ANGEL LECHUGA CORCHADO



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA  
DE: YARELI ODEMARIS BUENDIA LOPEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ  
  
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS  
  
DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS MARTINEZ

PRESIDENTE  
  
DR. HÉCTOR FERNANDO SERRANO

VOCAL  
  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL  
  
DRA. MARIA DEL ROCIO ZARATE HERNANDEZ

SECRETARIO  
  
M. EN B.E. JOSE ANGEL LECHUGA CORCHADO

La Maestría en Biología de la  
Universidad Autónoma Metropolitana  
pertenece al Padrón Nacional de  
Posgrados de Calidad del CONACyT.

## Miembros del Jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología de la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma  
Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis titulada:

### **Germinación *in vitro* de tres especies de orquídeas mexicanas para su conservación *ex situ*.**

Que presentó:

**Yareli Odemaris Buendía López**

El día 01 de diciembre del 2017.

### **Sinodales**

Presidente

**Dr. Héctor Fernando Serrano**  
Profesor Titular "C"  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Email: [hser@xanum.uam.mx](mailto:hser@xanum.uam.mx)

---

Secretario

**M. en B. E. José Ángel Lechuga Corchado**  
Profesor Titular "C"  
Departamento de Biotecnología  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Email: [jalc@xanum.uam.mx](mailto:jalc@xanum.uam.mx)

---

Sinodal

**Dra. María del Rocío Zárate Hernández**  
Profesor Titular "C"  
Departamento de Biología  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Email: [mrzh@xanum.uam.mx](mailto:mrzh@xanum.uam.mx)

---

Sinodal

**Dr. José Luis Gómez Olivares**  
Profesor Titular "C"  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Email: [gool@xanum.uam.mx](mailto:gool@xanum.uam.mx)

---

## Comité Tutorial

### **DIRECTORA**

Dra. María Dolores García Suárez

Profesor Titular "C"

Departamento de Biología

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: [loli@xanum.uam.mx](mailto:loli@xanum.uam.mx)

### **ASESORES**

Dr. Héctor Fernando Serrano

Profesor Titular "C"

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: [hser@xanum.uam.mx](mailto:hser@xanum.uam.mx)

M. en B. E. José Ángel Lechuga Corchado

Profesor Titular "C"

Departamento de Biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: [jalc@xanum.uam.mx](mailto:jalc@xanum.uam.mx)

## **DEDICATORIA**

A mi esposo Francisco por todo el cariño, comprensión, confianza, apoyo y por siempre alentarme a seguir adelante.

A mis padres Jesús y Rita por su apoyo brindado y ser mi fuente de inspiración para salir adelante.

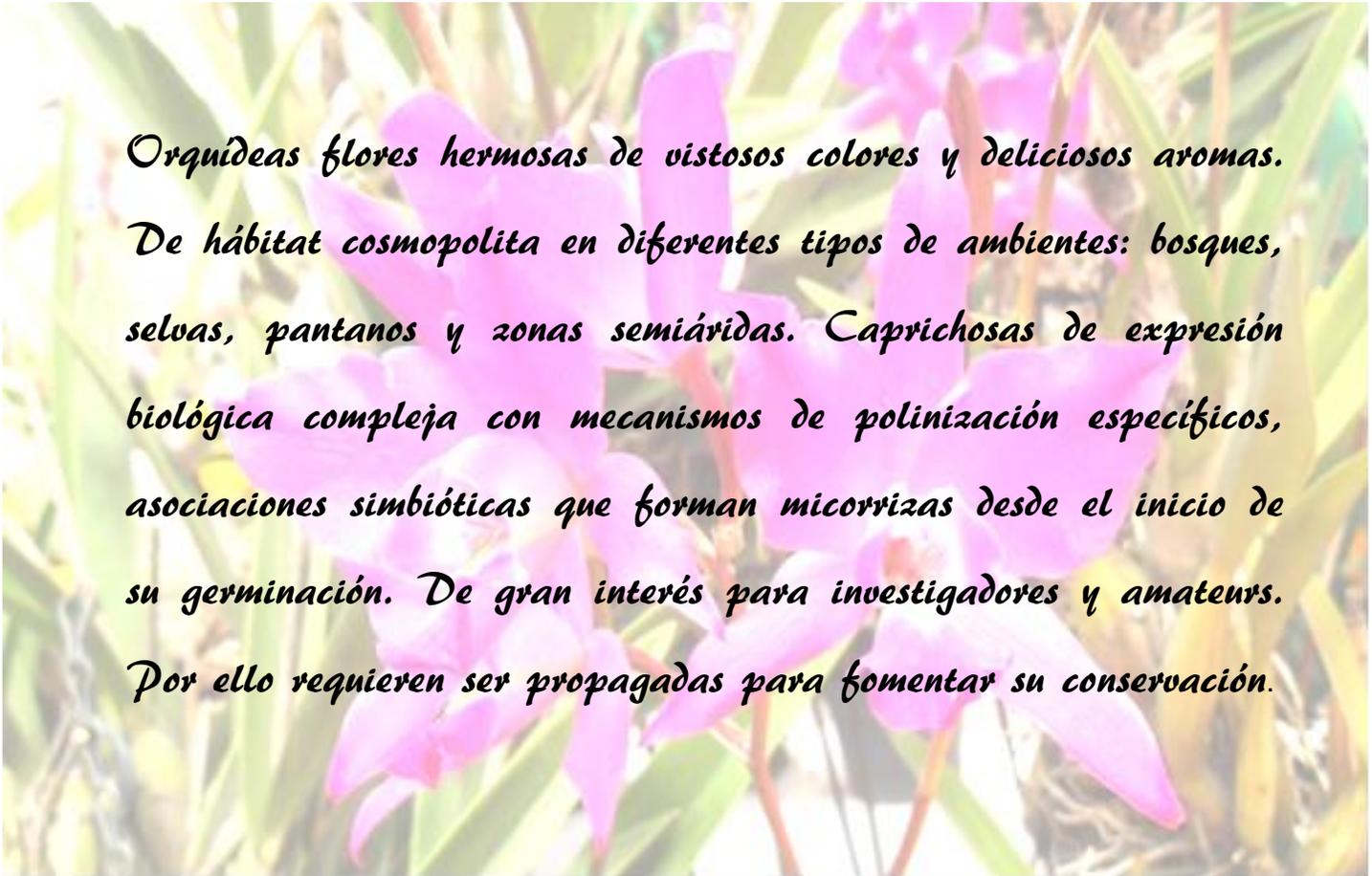
A mis hermanas Nelly y María, por sus buenos deseos.

A mi sobrina Giselle, porque es para mí un motivo más de superación.

A todos mis maestros de posgrado por compartir sus conocimientos.

A mi amiga Sandra, por sus consejos, apoyo y cariño incondicional, por todos los momentos tan gratos que hemos vivido y por sus buenos deseos.

A mis compañeros de la maestría que hicieron que fueran más amenas las clases y las tareas durante el primer año, en especial a Margarita por su linda amistad.



*Orquídeas flores hermosas de vistosos colores y deliciosos aromas. De hábitat cosmopolita en diferentes tipos de ambientes: bosques, selvas, pantanos y zonas semiáridas. Caprichosas de expresión biológica compleja con mecanismos de polinización específicos, asociaciones simbióticas que forman micorrizas desde el inicio de su germinación. De gran interés para investigadores y amateurs. Por ello requieren ser propagadas para fomentar su conservación.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por bendecirme y acompañarme siempre, porque durante esta etapa me permitió salir adelante a pesar de los obstáculos que se presentaron.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por abrirme sus puertas para realizar mi formación profesional.

A CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A la Dra. María Dolores García Suárez por su confianza, cariño, comprensión, amistad, apoyo, tiempo y su valiosa ayuda en la elaboración y revisión de esta tesis.

Al Dr. Héctor Fernando Serrano por sus valiosas sugerencias y aportaciones durante la elaboración y revisión de la tesis.

Al M. en B. E. José Ángel Lechuga Corchado por sus aportaciones durante la elaboración y revisión de la tesis.

A la Dra. María del Rocío Zárate Hernández por su ayuda en la parte estadística durante la elaboración y revisión de la tesis.

Al Dr. José Luis Gómez Olivares por sus sugerencias durante la revisión de la tesis.

Al Ing. José Francisco Rojas Huízar por su ayuda en la toma de datos y fotografías de las especies de estudio, durante la elaboración de tesis.

A la Dra. Claudia Barbosa Martínez por su ayuda en el tratamiento de muestras para su observación en Microscopio Electrónico de Barrido.

Al Dr. José Sepúlveda Sánchez por su ayuda en el manejo del Microscopio Electrónico de Barrido.

Al Biólogo experimental Saúl por su ayuda en la revisión final de tesis.

Al Sr. Jorge García Sánchez por haber proporcionado las semillas de estudio.

Al M. en C. José María Barba Chávez por facilitar el préstamo de Microscopio estereoscópico para la observación de semillas de las especies en estudio.

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
I Introducción.....	1
1.1 Métodos reproductivos en las orquídeas.....	4
1.2 Características de las semillas de orquídeas.....	7
1.3 Dispersión de las semillas de orquídeas.....	9
1.4 Viabilidad de las semillas de orquídeas.....	10
1.5 Longevidad de las semillas de orquídeas.....	12
1.6 Latencia de las semillas de orquídeas.....	13
1.7 Histoquímica de las semillas de orquídeas.....	15
1.8 Depredación de estructuras reproductivas de orquídeas.....	15
1.9 Conservación de las semillas de orquídeas.....	16
1.9.1 Conservación <i>in situ</i> .....	17
1.9.2 Conservación <i>ex situ</i> .....	18
II Germinación de las orquídeas .....	19
2.1 Germinación en condiciones de campo.....	20
2.2 Antecedentes de la reproducción bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	22
2.2.1 Germinación <i>in vitro</i> simbiótica.....	23
2.2.2 Germinación <i>in vitro</i> asimbiótica.....	24
III Descripción de las especies en estudio.....	25

3.1 Descripción del género <i>Cuitlauzina</i> .....	25
Descripción de <i>Cuitlauzina pendula</i> .....	27
3.2 Descripción del género <i>Epidendrum</i> .....	28
Descripción de <i>Epidendrum radicans</i> .....	29
3.3 Descripción del género <i>Laelia</i> .....	30
Descripción de <i>Laelia anceps</i> .....	31
IV Justificación.....	32
V Pregunta de investigación.....	33
VI Hipótesis.....	33
VII Objetivos.....	33
7.1 Objetivo general.....	33
7.2 Objetivos particulares.....	34
VIII Materiales y métodos.....	34
8.1 Obtención de cápsulas maduras.....	34
8.2 Prueba de viabilidad de lotes de semilla.....	35
8.3 Tamaño de las semillas.....	35
8.4 Histoquímica de las semillas.....	37
8.5 Medios de cultivo.....	38
8.6 Germinación de las semillas de orquídea <i>in vitro</i> .....	39
8.6.1 Desinfestación de las semillas.....	39
8.6.2 Siembra <i>in vitro</i> .....	39

8.6.2.1 Fechas de siembra <i>in vitro</i> de <i>Cuitlauzina pendula</i> , <i>Epidendrum radicans</i> y <i>Laelia anceps</i> .....	40
8.6.3 Conteo de las semillas.....	40
8.6.4 Germinación <i>in vitro</i> .....	40
8.7 Microscopia electrónica.....	41
8.8 Análisis estadísticos.....	42
IX Resultados.....	45
9.1 Prueba de viabilidad.....	45
9.1.1 <i>Cuitlauzina pendula</i> .....	45
9.1.2 <i>Epidendrum radicans</i> .....	46
9.1.3 <i>Laelia anceps</i> .....	48
9.2 Tamaño de las semillas.....	49
9.2.1 <i>Cuitlauzina pendula</i> .....	49
9.2.2 <i>Epidendrum radicans</i> .....	50
9.2.3 <i>Laelia anceps</i> .....	51
9.3 Características histoquímicas de las tres especies de semilla.....	52
9.4 Germinación asimbiótica.....	56
9.4.1 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Cuitlauzina pendula</i> .....	56
9.4.2 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum radicans</i> .....	59
9.4.2.1 Análisis estadísticos de <i>Epidendrum radicans</i> .....	65
9.4.3 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Laelia anceps</i> .....	68
9.4.3.1 Análisis estadísticos de <i>Laelia anceps</i> .....	73

9.5 Microscopia electrónica.....	74
9.5.1 Microscopia electrónica de <i>Cuitlauzina pendula</i> .....	75
9.5.2 Microscopia electrónica de <i>Epidendrum radicans</i> .....	77
9.5.3 Microscopia electrónica de <i>Laelia anceps</i> .....	78
X Discusión.....	82
10.1 Prueba de viabilidad.....	83
10.2 Tamaño de las semillas.....	86
10.3 Características histoquímicas de las semillas.....	88
10.4 Germinación asimbiótica.....	91
10.4.1 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Cuitlauzina pendula</i> .....	91
10.4.2 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum radicans</i> .....	92
10.4.3 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Laelia anceps</i> .....	94
10.5 Microscopia electrónica.....	96
XI Conclusiones.....	98
XII Referencias.....	100

## RESUMEN

En el presente estudio se realizó la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de tres especies de orquídeas mexicanas: *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps* a fin de poder describir la ontogenia comparativa de sus embriones durante el proceso de la germinación bajo condiciones de laboratorio. Se determinó el mejor medio de cultivo y concentración de ácido naftalen-acético (ANA) para la germinación de semillas y desarrollo *in vitro* de *C. pendula*, *E. radicans* y *L. anceps*, comparando tres medios de cultivo: Mínimo, MS y Knudson C adicionados con 0.0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L de ANA., doce tratamientos en total, con el fin de contribuir a su conservación *ex situ*. Se evaluaron el índice, porcentaje y velocidad de germinación; las diferencias estadísticas se determinaron con un análisis de varianza. Las semillas germinaron a partir del día 16 después de la siembra en los medios: Mínimo con 0.1 mg/L de ANA, MS con 3.0 mg/L de ANA, y en el medio Knudson C con 1.0 mg/L de ANA, en la especie *E. radicans*. En el medio Murashige Skoog (MS) con 0.1 mg/L de ANA, en *L. anceps*. En *C. pendula* las semillas no germinaron, pero se observó actividad metabólica con cambios de coloración y/o tamaño de los embriones en 10 de los doce tratamientos. La experimentación duró un período de 90 días durante los cuales continuó el crecimiento y desarrollo de *E. radicans* y de *L. anceps* obteniendo un máximo porcentaje de germinación en *E. radicans* de 48 % en el medio Knudson C, con 0.1 mg/L de ANA y para *L. anceps* un máximo de porcentaje de 43 % en el medio Mínimo con 0.0 mg/L de ANA. Durante el proceso de germinación se describieron cinco estadios ontogénicos: 1. Hidratación, 2. Protocormo, 3.

Germinación, 4. Primordio foliar y, 5. Hojas desarrolladas. Para *C. pendula* el máximo estadio ontogénico alcanzado fue el de protocormo excepto en los medios MS con 0.0 y 3.0 mg/L de ANA y para *E. radicans* se alcanzó la etapa 5 en los medios MS con 0.0 y 1.0 mg/L de ANA y el medio Knudson C con 0.0 mg/L de ANA. *L. anceps* también llegó a la etapa 5 utilizando el medio MS con 0.1 mg/L de ANA. Se estableció así, un protocolo de germinación asimbiótico *in vitro* para las semillas de *E. radicans* y *L. anceps* que permite determinar las mejores condiciones para la germinación y desarrollo a partir de la modificación del medio de cultivo el cual servirá de base para la propagación, conservación y uso sustentable de estas y otras especies de orquídeas.

## ABSTRACT

Asymbiotic seed *in vitro* of three mexican orchids: *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* and *Laelia anceps* were multiplied under tissue culture techniques in order to be able to describe a comparative ontogenetic growth of embryo during their germination. The most suitable culture medium for asimbyotic seed germination and *in vitro* propagation out of three: Minimum, Murashige and Skoog (MS) and Knudson C was determined as well as idoneous concentration of a plant growth regulator: naftalen acetic acid (NAA) proving these concentrations: 0.0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L, a total of 12 treatments were proven in order to contribute to the conservation *ex situ* of these species. Seed germination, percentage and velocity were evaluated, stadistic differences were determined with ANOVA. For *Epidendrum radicans*, seed germinated afer day 16 just after seed sowing under Minimum media added with 0.1 mg/L of NAA, MS with 3.0 mg/L of NAA, under Knudson C with 1.0 mg/L of NAA, *Laelia anceps* MS 0.1 mg/L of NAA, and no germination was obtained for *Cuitlauzina pendula* just initial metabolic activity where changes were observed in embryo: colour and size under 10 of the 12 treatments. Observations were made during 90 days, while growth and development continued for *E. radicans* and *L. anceps* a maximum seed germination percentage for *E. radicans* was 48 % under Knudson C, medium added with 0.1 mg/L of NAA and for *L. anceps* maximum percentage 43 % in Minimum medium with 0.0 mg/L of NAA. During the seed germination process five ontogenic stages were established 1. Hidratation, 2. Protocorm, 3. Germination, 4.

Foliar Primordium, 5. Leaves. *C. pendula* achieved the second stage of protocorm; *E. radicans* reached stage 5 under MS 0.0 and 1.0 mg/L of NAA and under Knudson C medium with no NAA. *L. anceps* reached as well stage 5 with MS added with 0.1 mg/L of NAA. A seed asymbiotic germination *in vitro* protocol was established, for two of the three species: *Epipedrum radicans* and *Laelia anceps* that may allow better conditions to germinate and develop and to be able to use it as a method for propagation, conservation and sustainable use of these species and might be useful for other orchid species.

## I. Introducción.

La *Orchidaceae* es la familia más grande de plantas con flores con 27,801 especies aceptadas y distribuidas en 899 géneros (The Plant List, 2013; Zotz, 2013). Para México, se reconocen aproximadamente 1,260 especies de orquídeas que se distribuyen en 164 géneros (Espejo, 2012). Su diversidad es amplia además de ser un grupo muy joven en la evolución de las plantas, presenta gran facilidad para dar híbridos exitosos entre especies del mismo género, e intergenéricos y actualmente se estima que hay aproximadamente 30,000 híbridos registrados (Freuler, 2008).

Las orquídeas son plantas con capacidad de adaptación climática, ya que se han desarrollado en toda la superficie del planeta, a excepción de los polos, por eso se las puede considerar verdaderas plantas cosmopolitas. Su hábitat varía de acuerdo con su ubicación geográfica y se encuentran principalmente en zonas templadas y tropicales (Wright, 1958; Martija, 2007). En México el 60 % de las orquídeas crecen en el tipo de vegetación clasificado como 'Bosque mesófilo de montaña o Bosque de Niebla' (CONABIO, 2010a; Díaz, 2013). Sus formas de vida son variadas ya que se les puede encontrar sobre troncos o ramas de árboles, rocas, suelo y sobre materia orgánica en descomposición es decir son epífitas, litófitas, terrestres y saprófitas (Benzing, 1990; Martija, 2007).

A pesar de su amplia distribución y formas de vida, las orquídeas son uno de los taxa más vulnerables, debido principalmente a:

I.- Actividades humanas. – Tanto las plantas como las flores de corte son muy llamativas por su belleza y solicitadas comercialmente, debido a esto, son generalmente extraídas de su ambiente natural que promueve su comercio ilegal (Soto y Hagsater, 1990; Ávila y Salgado, 2000; Menchaca y Moreno, 2006). Otros factores que las hacen vulnerables son la destrucción, transformación y fragmentación de su hábitat natural (Benzing, 1990; Soto y Salazar, 2004).

II.- Características fisiológicas y ecológicas propias de esta familia:

- La polinización natural es realizada por insectos y a veces, por aves (Darwin, 1890; Dressler, 1993).
- Las semillas carecen de endospermo y dependen en la naturaleza de hongos micorrízicos para germinar, que en ocasiones llegan a ser específicos (Otero, *et al.*, 2002; Otero, *et al.*, 2004; Arditti, 2008; Dearnaley, *et al.*, 2012; Otero, *et al.*, 2013).
- Es característico de las orquídeas, como especies suculentas, que su crecimiento y desarrollo sea lento particularmente para las especies epífitas (Chase, *et al.*, 2005; Rodríguez, *et al.*, 2005; Miceli, *et al.*, 2014).

Las flores tienen simetría bilateral. Por lo regular son hermafroditas, pero en ocasiones pueden producirse solamente flores masculinas o femeninas (ej. *Catasetum sp.*), muchas veces dependiendo de la cantidad de luz que la planta reciba (Dressler, 1993; Hagsater, *et al.*, 2015).

La flor se constituye por tres sépalos y tres pétalos, uno modificado, y se denomina labio o labelo (Foto1); características que las hacen únicas, respecto a otras flores. Sin embargo, la particularidad más reconocida de las orquídeas y que las diferencian del resto de las plantas con flores, es la fusión de la parte masculina de la planta el androceo y la parte femenina su gineceo, estructura denominada columna (Foto 2) que se encuentra opuesta al labelo (Dressler, 1981; Arditti, 1992; Hagsater, *et al.*, 2015).

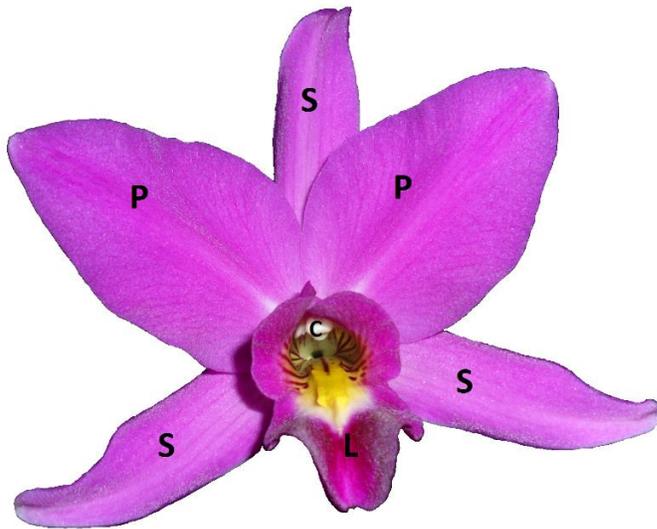


Foto 1. Flor de *Laelia anceps* mostrando: **S** sépalos; **P** pétalos; **L** labelo; **C** columna.



Foto 2. Acercamiento de la columna, fusión de androceo y gineceo de *Laelia anceps*.

Las orquídeas, en general, florecen una sola vez al año, siempre hacia la misma época y está determinado por factores ambientales como la disminución o elevación

de la temperatura, el incremento de las horas de luz y las variaciones en la humedad ambiental. Las flores pueden permanecer abiertas desde un día (ej. *Sobralia sp.*) hasta más de tres meses (ej. *Paphiopedilum sp.*). Los híbridos artificiales pueden florecer dos o más veces al año por ejemplo *Laeliocattleya sp.* y *Phalaenopsis sp.* (Freuler, 2008).

## 1.1 Métodos reproductivos en las orquídeas

La reproducción se lleva a cabo de forma asexual o sexual. La reproducción asexual les otorga la ventaja de conservar características exitosas invariables para su subsistencia y desarrollo. Según Marden (2006), ésta puede llevarse a cabo de las siguientes maneras:

### **Método Asexual**

- Separación de pseudobulbos. Debido a la forma de crecimiento de las orquídeas, que comúnmente generan un pseudobulbo nuevo por año, es posible multiplicarlas cuando la planta tiene un número grande de pseudobulbos, los que se pueden separar para obtener una nueva planta (ej. *Laelia sp.*).
- Algunas plantas emiten yemas o clones que generan un pequeño individuo denominado “keiki” que proviene del vocablo Hawaiano para describir un hijuelo. Estos pueden originarse en los pseudobulbos o en varas florales (ej. *Phalaenopsis sp.* y *Dendrobium sp.*).

- Apomixis. Donde se producen embriones que se desarrollan a partir del óvulo, formando semillas sin la recombinación genética, produciendo plantas con la misma información genética de la planta madre, las semillas se desarrollan sin la presencia de polen de manera asexual (ej. *Epidendrum nocturnum*) (Silva y Dos Santos, 1985).

### **Método sexual**

La reproducción sexual les brinda a las plantas la ventaja de incrementar la variabilidad genética, como en todos los organismos con reproducción sexual se inicia con la producción de gametos y su recombinación siendo para las orquídeas un proceso delicado, donde la transferencia del polen debido a su columna, con ambos gametos masculinos y femeninos, fusionados, obliga a una fertilización más compleja por sus polinizadores, que en ocasiones son muy específicos, la cual es llevada a cabo por insectos, lepidópteros, escarábidos, y ocasionalmente aves y mamíferos dependiendo de la especie (Van der Pijl y Dodson, 1966; Benzing, 1990; Dressler, 1993; Beutelspacher, 2013).

En las orquídeas también se realiza el método de polinización artificial por el hombre, desde épocas Mesoamericanas, principalmente con *Vanilla sp.*, única especie explotada con fines comerciales para la obtención de la vainillina, sustancia aromática empleada en la industria alimentaria y cosmetología. Actualmente, con la finalidad de reproducir las especies, obtener semillas, formar nuevos híbridos o con el fin de mantener alguna característica distintiva hortícola (ej. flores albas), este tipo de polinización artesanal o tradicional es realizada frecuentemente en colecciones

privadas, viveros y huertos (Arditti, 2008; Ossenbach, *et al.*, 2007; Soto y Dressler, 2010).

Existen 3 tipos de polinización según Quiroga y colaboradores (2010)

1. polinización por autogamia: con el polen de la misma flor.
2. polinización por geitogamia: una flor es polinizada con el polen de otra flor, pero de la misma planta.
3. polinización por xenogamia: una flor es polinizada con el polen de otra flor, pero de diferente planta, puede ser de la misma especie o de otra e incluso puede ser de una planta de distinto género.

Una vez realizada la polinización (natural o artificial), los granos de polen fecundan al óvulo. La fecundación del gameto femenino de la orquídea puede llevarse a cabo en días, semanas o meses según la especie (Withner, 1974). Si por alguna razón la fecundación no ocurrió, el desarrollo de la cápsula o fruto se detiene y muere. Si, por el contrario, la fecundación se lleva a cabo, se desarrollan los embriones (Tiza, 2010; García-Suárez, com. pers.).

Los frutos son capsulares, secos, y se abren por 3-6 líneas de dehiscencia longitudinales, los hay largos y ovalados o casi redondos, algunos pueden tener verrugas y dentro de cada fruto se encuentran las semillas (Foto 3) (Menchaca y Moreno, 2011; Hagsater, *et al.*, 2015).



Foto 3 Cápsula dehiscente de *Epidendrum radicans* con semillas.

## 1.2 Características de las semillas de orquídeas

Las semillas, son el comienzo y el final del ciclo de la vida de las plantas; es la estructura que contiene al embrión el cual porta la información genética que asegura la continuidad de la especie (Kessler y Stuppy, 2012). Son la unidad de reproducción de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen, son la unidad móvil de la planta y es indispensable que tenga una buena respuesta en las condiciones de siembra y que produzca plántulas vigorosas, para alcanzar el máximo rendimiento (Doria, 2010). Su diversidad de forma y tamaño es diversa como las plantas de las cuales provienen (Kessler y Stuppy, 2012).

Las semillas de orquídeas son consideradas dentro del Reino Vegetal como unas de las más pequeñas midiendo de 0.07 a 0.5 mm de ancho por 0.05 a 6.0 mm de largo

incluyendo la testa y el tamaño puede variar entre poblaciones, especies o individuos, debido a diferencias genéticas o diferencias en la historia de vida de cada planta (Withner, 1974; Arditti, 1992; Arditti y Ghani, 2000).

Arditti y colaboradores (1979) sugirieron que el volumen de las semillas debe ser considerado como una mejor medida del tamaño de las semillas, el cual presenta diferentes características que le dan tanto ventajas como desventajas las que afectan su germinación y sobrevivencia de las semillas y posteriormente de sus plántulas, tabla (1).

Los frutos de las orquídeas son cápsulas, como podemos observar en la foto (3), contienen una gran producción de semillas, las cuales pueden contener entre unos pocos miles hasta millones de éstas, que consisten en un embrión formado por un rango de entre ocho a 200 células, suspendidas dentro de una estructura formada por células muertas, transparentes, denominadas testa (Arditti y Ghani, 2000).

El embrión de las orquídeas, no se encuentra diferenciado (Dressler, 1981), siendo su morfología por lo general elipsoide o fusiforme con contenidos de reservas de lípidos, carbohidratos y proteínas (Aybeke, 2014). Por lo general, este embrión es único, pero en numerosas especies, se produce poliembrionía. Los embriones múltiples en muchos casos están relacionados con la apomixis, en lugar de con la verdadera poliembrionía (Veyret, 1974; Silva y Dos Santos, 1985; Arditti, 1992). Las paredes de las células de la testa pueden ser reticuladas, lisas o diversamente ornamentadas y raramente muy gruesas, cuando son reticuladas sus patrones

pueden ser considerados como distintivos para la taxonomía (Veyret, 1974; Arditti, *et al.*, 1980).

Tabla 1 Características de las semillas de orquídea.

DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Mayor potencial de dispersión a larga distancia	Arditti, <i>et al.</i> , 1979; Arditti y Ghani, 2000; Aybeke, 2014; Dangat y Gurav, 2016.
Grandes cantidades de semillas en una cápsula	Arditti y Ghani, 2000.
Germinación compleja debido a la ausencia de endospermo	Withner, 1974; Ruíz, <i>et al.</i> , 2008; Menchaca y Moreno, 2011.
Requieren grupos de hongos simbiotes para la germinación (micorriza)	Withner, 1974; Dearnaley, <i>et al.</i> , 2012.
Lento crecimiento	Chase, <i>et al.</i> , 2005; Rodríguez, <i>et al.</i> , 2005; Miceli, <i>et al.</i> , 2014.
Dificultad de la visualización directa y manipulación individualizada.	Arditti, 1992; Arditti y Ghani, 2000; Aybeke, 2014.

### 1.3 Dispersión de las semillas de orquídeas

Las semillas de orquídeas son liberadas de sus cápsulas dehiscentes cuando se encuentran maduras y debido a sus características fusiformes aerodinámicas y poco peso (Aybeke, 2014), pueden viajar grandes distancias, señalando lógicamente la flotabilidad como un factor importante en la dispersión por viento (Arditti, *et al.*, 1979; Arditti y Ghani, 2000; Augustine, *et al.*, 2001; Dangat y Gurav, 2016) y por animales al adherirse al pelaje y plumaje de estos (Martínez, *et al.*, 2009), llegando a germinar eventualmente cuando encuentran un sitio óptimo para su germinación.

Las posibilidades de sobrevivencia en la naturaleza son difíciles pues requiere no sólo de las condiciones abióticas favorables sino también de la presencia de micorrizas que puedan abastecer tanto al embrión como a las futuras plántulas jóvenes con nutrimentos hasta que sean totalmente autótrofas (CONAFORT, 2011; Menchaca y Moreno, 2011; García-Suárez, com. pers.).

#### 1.4 Viabilidad de las semillas de orquídeas

La viabilidad de las semillas hace referencia a su capacidad de germinar y originar plántulas normales en condiciones favorables, particularmente las semillas de orquídeas con su morfología embrionaria y ausencia de endospermos, las hace diferentes de la mayoría de las semillas. La ausencia de sustancias de reserva dentro de las semillas hace incluso que su germinación sea compleja, en ocasiones las semillas son vanas y falta el embrión, siendo infértil, aunque de apariencia externa normal, por lo que evaluar la viabilidad de las semillas previo a su germinación, es de importancia para su posterior germinación y cultivo (Harrison y Arditti, 1972; Arditti y Ernst, 1993; Arditti y Ghani, 2000; Ruíz, *et al.*, 2008).

Diferentes metodologías han sido realizadas para comprobar la viabilidad de semillas de orquídea, a continuación, haremos una relatoría de las diferentes técnicas empleadas. La primera fue la de Lakon (1949) con el uso del tetrazolio y ha sido modificada a lo largo de los años por diferentes investigadores: Singh, 1981;

Vujanovic, *et al.*, 2000; Hosomi, *et al.*, 2012; Lallana y García 2013; Salazar y Gélvez, 2015. Otras técnicas emplean diferentes compuestos como: diacetato de fluoresceína (Pritchard, 1985; Wood, *et al.*, 2003; Chen, *et al.*, 2015) y el uso de índigo carmín (Salazar y Gélvez, 2015).

La Prueba de Lakon (1949) particularmente, se fundamenta en la reducción del cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT) incoloro a formazán de color rojo no difusible en las células vivas, indicación definitiva de la viabilidad de las semillas, y cuando permanecen incoloras indica que las células están necróticas. Esta metodología, refleja la actividad de las enzimas deshidrogenasas que intervienen en la respiración celular como lo comprobaron Wolinska y Stepniewska (2012).

Una vez que los diferentes tejidos de la semilla se han hidratado con el CTT, en el embrión se activan rutas metabólicas en las que muchas de las reacciones químicas empleadas son reacciones de oxidación. En estas reacciones se liberan electrones capaces de reducir a ciertas sustancias químicas, por lo que este hecho es utilizado para estimar la viabilidad (Pérez y Pita, 2001). Otros autores han hecho modificaciones a esta técnica particularmente para orquídeas, empleando agua destilada en la que se embeben las semillas por 24 horas y posteriormente se sumergen en la solución de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio) al 1% por 24 horas a 30°C (Singh, 1981). Van Waes y Debergh (1986) utilizan el tetrazolio con un pretratamiento de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2 + \text{Tween-80}$ ; Hosomi y colaboradores (2012) tetrazolio y diferentes concentraciones de sacarosa para iniciar el metabolismo del embrión.

## 1.5 Longevidad de las semillas de orquídeas

Las semillas de las orquídeas son ortodoxas, toleran la desecación. Las semillas pueden ser almacenadas y propagadas, pueden también formar bancos de germoplasma. Sin embargo, un factor que debe contemplarse son los estados de latencia o dormición que puedan presentar las semillas, y esto depende de cada especie. La longevidad de una semilla entra en el tema de la conservación y almacenamiento. Sin embargo, el conocimiento que se tiene para poder realizar estas actividades aun es precario y por ello también muchas de las especies quedan o entran en la sección de especies en peligro de extinción. Ya que no existen medidas adecuadas para preservarlas por largos períodos ni se conocen las condiciones adecuadas. Tanto las técnicas de conservación como las de propagación no se encuentran distantes entre sí (Whithers, 1985).

Durante la maduración, las semillas de orquídeas adquieren tolerancia al estrés hídrico y aumentan su longevidad, ésta puede o no perderse total o parcialmente durante la germinación (Groot, *et al.*, 2007). El almacenamiento de las semillas ortodoxas, como lo son la mayoría de las orquídeas, es factible y se puede garantizar para algunas especies por periodos mayores de 20 años (Arditti, 1993; Arditti y Ernst, 1993; Seaton y Pritchard, 2003; Pritchard, *et al.*, 2004; Buendía, *et al.*, 2012), la factibilidad de este almacenamiento prolongado, puede estar favorecido por diferentes factores, como son: la adecuación del período de recolección de los frutos, la reducción del contenido de humedad, temperatura y el oxígeno en la atmosfera de almacenamiento (Young y Young, 1986; Pardo y Ferreira, 2006). Sin embargo, para

muchas especies de orquídeas, el almacenamiento por periodos mayores a dos años o más prolongados, no es una alternativa de resguardo, porque existen varias especies de semillas que pierden su viabilidad unos cuantos días después de la dehiscencia de su cápsula (Seaton y Pritchard, 2003).

## 1.6 Latencia de las semillas de orquídeas

La latencia o dormancia de las semillas puede definirse como el bloqueo que tiene lugar en una semilla viable que le impide completar la germinación en condiciones favorables (Matilla, 2008).

Es una propiedad innata que define las condiciones ambientales en las que la semilla es capaz de germinar, determinada por la genética con una influencia ambiental sustancial mediada, al menos en parte, por la síntesis interna de los reguladores del crecimiento vegetal como son el ácido abscísico y las giberelinas, la primera como inhibidor y la segunda como promotor de la germinación (Taiz y Zeiger, 2010). Como la latencia está presente en todas las plantas superiores en todas las regiones climáticas importantes, la adaptación ha dado lugar a respuestas divergentes al medio ambiente. A través de esta adaptación, la germinación de las semillas se cronometra para evitar un clima desfavorable para el establecimiento vegetal y el crecimiento reproductivo (Finch y Leubner, 2006).

Baskin y Baskin (2001) propusieron una descripción más sofisticada y experimentalmente probada: Una semilla durmiente o en latencia, carece de la

capacidad para germinar en un periodo de tiempo concreto, aunque se someta a una combinación de factores físicos medioambientales que en otras circunstancias favorecen su germinación. Se distinguen tres tipos de latencia endógena y tres tipos de latencia exógena. La endógena puede resultar de

- (1) un mecanismo de inhibición fisiológico en el embrión (“latencia fisiológica” o “PD”),
- (2) un embrión no desarrollado (denominado de manera confusa “letargo morfológico” o “MD”), o
- (3) a partir de una combinación de 1 y 2 llamada latencia morfo-fisiológica (MPD).

Los tres tipos primarios de latencia exógena son:

- 1) "físico", causado por la impermeabilidad de las semillas o de las capas del fruto al agua",
- 2) "químico", debido a los inhibidores de la germinación, y
- 3) "mecánico", causado por estructuras leñosas que restringen el crecimiento.

Finch y Leubner (2006) consideran que la latencia de las semillas es una propiedad que es definida por las condiciones medioambientales en las que las semillas puedan germinar. Para las semillas de orquídeas Baskin y Baskin (2001) encontraron evidencia de latencia morfofisiológica.

## 1.7 Histoquímica de las semillas de orquídeas

La histoquímica se refiere a la tinción específica de una sustancia o compuesto particular presente en un tejido vegetal. A través de la cual se tiene un primer acercamiento de sus posibles contenidos celulares (Sandoval, 2005). Algunos análisis histoquímicos en vegetales son realizados para detectar mucilagos (Demarco, 2017), carbohidratos (Aybeke, 2014; Mercadante, *et al.*, 2014; Demarco, 2017), proteínas (Fisher, 1968; Soutworth, 1973; Aybeke, 2014; Mercadante, *et al.*, 2014), lípidos (Soutworth, 1973; Aybeke, 2014; Mercadante, *et al.*, 2014; Gallo, *et al.*, 2016), terpenos (Mercadante, *et al.*, 2014; Demarco, 2017), compuestos fenólicos y alcaloides (Mercadante, *et al.*, 2014; Munien, 2015; Demarco, 2017), pero muy pocos esfuerzos se han dirigido a investigar la histoquímica de las semillas de orquídea, debido a que trabajar con ellas es muy difícil debido a su pequeña morfología.

## 1.8 Depredación de estructuras reproductivas de orquídeas

Como el tamaño de las semillas de orquídea es diminuto (Whitner, 1974), los trabajos sobre depredación de semillas, no son conocidos, sin embargo si existen datos sobre la depredación de óvulos en los ovarios de orquídeas por pequeñas avispas (Catling y Greenwood, 1988; Salazar, 2009), se han encontrado larvas de mosca en botones florales y capsulas de orquídeas, lo que impide la floración y la formación de frutos (Catling y Greenwood, 1988; Yamazaki y Miyoshi, 2006); la

depredación de los órganos de las orquídeas (raíces, pseudobulbos, hojas, flores y frutos) por insectos fitófagos (González, *et al.*, 2012) y la colecta de ejemplares en floración (ya sea la planta completa o únicamente las flores) impide la reproducción (Emeterio, *et al.*, 2016)

## 1.9 Conservación de las semillas de orquídeas

Las orquídeas con su baja tasa de crecimiento, ciclo de vida largo, bajo reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales, con varias especies endémicas, o con especies amenazadas y/o en peligro de extinción, y otras especies que crecen aún en ambientes naturales que en la actualidad han sido alterados por actividades antropogénicas como: destrucción, modificación o fragmentación. Son la causa de que, en la actualidad del siglo XXI, las orquídeas se encuentren en riesgo.

Las poblaciones de especies de orquídeas, en sus sitios nativos han disminuido notablemente sobre todo en los últimos años debido en gran parte a sus atributos ornamentales, lo que las ha colocado como plantas que requieren ser más cuidadas y protegidas, así como también el implementar técnicas para su conservación y manejo como especies hortícolas (Hagsater, *et al.*, 2015; García-Suárez com. pers.).

La conservación de la flora se desarrolla en dos formas básicas: dentro del hábitat natural o conservación *in situ* y fuera del mismo, es decir, conservación *ex situ* (Soto y Salazar, 2004; Lascuráin, *et al.*, 2009).

### 1.9.1 Conservación *in situ*

La conservación *in situ* es la conservación en su propio sitio, y es un proceso de proteger en su medio ambiente natural, ya sea, su hábitat, población, comunidad y/o ecosistema, a una especie sea ésta vegetal o animal, que se consideren tanto silvestres como domesticadas.

La vida silvestre se mantiene preferentemente en condiciones *in situ*. Es así, que se han instituido Áreas Naturales Protegidas con el fin de formar zonas donde los recursos naturales se conserven y presenten diferentes condiciones medioambientales que se observan en las diferentes regiones biogeográficas y ecológicas del país, a fin de lograr mantener ambientes representativos y mantener la conservación de la biodiversidad sobre todo en zonas donde existan especies endémicas, amenazadas y en peligro de extinción y donde las poblaciones tengan los espacios necesarios para su mantenimiento y reproducción. Así como que se conserven una o varias especies en la medida que se permita su interacción entre las diferentes especies que constituyan las comunidades y ecosistemas para que continúen evolucionando (CONABIO, 1998; Tremblay y Hutchings, 2003; Soto y Salazar, 2004).

Un ejemplo de la conservación *in situ* de orquídeas en México es la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel que ha sido fuente de inspiración para la elaboración de varios trabajos de investigación y de tesis a nivel licenciatura y posgrado, los cuales han documentado diferentes aspectos sobre la biología de las orquídeas que ahí se encuentran (Ortega, *et al.*, 2009).

### 1.9.2 Conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* es aquella que se desarrolla fuera del hábitat natural de las especies y se considera como complemento y apoyo a los esfuerzos de conservación *in situ*.

Dentro de este tipo de conservación se incluyen los jardines botánicos, bancos de germoplasma, bancos de semillas, de polen, de clones y de propagación y conservación *in vitro* (Frankel y Soulé, 1981).

Es así, que se puede preservar parte de la diversidad genética y especies particulares que estén en riesgo y es a partir de la conservación *ex situ* que se generan grandes posibilidades de investigación sobre los componentes de la diversidad biológica (CONABIO, 1998).

Para realizar la conservación *ex situ*, se aplican una amplia variedad de recursos, técnicas e infraestructuras especializadas que contribuyen a la recuperación y sobrevivencia de individuos o poblaciones fuera de su hábitat. El objetivo central de la conservación *ex situ* es reducir el riesgo de extinción de especies o poblaciones, en algunos casos incluso puede llegar al propósito de restablecer poblaciones nuevas en el hábitat natural (Lascuráin, *et al.*, 2009).

Algunos métodos para la conservación de las orquídeas *ex situ* son:

1.-Criopreservación: semillas congeladas en nitrógeno líquido, método tradicional para el almacenamiento a largo plazo. Esta metodología incluso se ha extendido con éxito para las orquídeas en el almacenamiento no sólo de semillas sino de ápices,

meristemas, embriones cigóticos y somáticos, polen y células aisladas (Engelmann, 2000; Abdelnour, 1999; Abdelnour y Alvarado, 2013).

2.-Banco de semillas: semillas almacenadas en condiciones de baja humedad y temperatura; usado rutinariamente para semillas ortodoxas como las de las orquídeas (Whigham, *et al.*, 2006; Probert, *et al.*, 2009; Hay, *et al.*, 2010).

3.-Cultivo de tejidos: semillas que se propagan *in vitro* en medios de cultivo nutritivos en condiciones de luz y temperatura controlados (Ávila y Salgado, 2006; Flores, *et al.*, 2008; Chávez, *et al.*, 2015; Pérez y Castañeda, 2016).

4.- Cultivo de tejidos: de meristemas apicales, yemas basales, protocormos, callos, hojas, tallos o pseudobulbos, raíces y keikis en medios nutritivos bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento (Arditti, 2008; Ávila y Salgado, 2006; Benzing, 1990; Raya-Montaño, *et al.*, 2011; Bello-Bello, *et al.*, 2015; Chávez, *et al.*, 2015; Pérez y Castañeda, 2016; Cazarez, *et al.*, 2016).

## II Germinación de las orquídeas

La germinación es un proceso donde se reinicia el crecimiento del embrión, en estado de latencia, durante las fases finales de la maduración. Se reinicia su actividad con la imbibición, es decir con la toma de agua por la semilla y termina cuando parte del tejido embrionario atraviesa las estructuras envolventes que la rodean (Matilla, 2008). La germinación de las semillas de orquídeas tanto en condiciones naturales como en condiciones *in vitro*, se acompaña de un patrón

general de desarrollo común a todas las especies: se inicia con la imbibición de la semilla, emergencia del embrión de la testa, formación de un tubérculo, llamado protocormo, cubierto de rizoides en aproximadamente dos tercios de su parte basal, no hay formación de la radícula, con un desarrollo generalmente tardío de la primera raíz, mientras que se forman varias hojas desde al ápice del protocormo. La morfología del protocormo joven puede llegar a ser característico de ciertos grupos taxonómicos, aunque hay varias excepciones (Veyret, 1974).

## 2.1 Germinación en condiciones de campo

La probabilidad de éxito en la germinación en condiciones de campo, depende de la abundancia y potencial reproductivo de cada especie, donde la edad de los individuos y de las poblaciones que constituyen influyen en la fecundidad, en la producción del número de semillas por individuo es por ello que dentro de las poblaciones debe contemplarse la edad reproductiva de los individuos que la conforman, creándose para cada especie estrategias reproductivas que logren mantener las poblaciones de una generación a otra, manteniendo una dinámica y viabilidad poblacional. Particularmente para las orquídeas la producción de semillas llega a ser por arriba de los 4 millones (Arditti, 2008, Arditti y Ghani, 2000), sin embargo, lograr su germinación *in situ* no es tarea sencilla (Arditti, 2008; Benzing, 1990).

Las semillas de orquídeas germinan en la naturaleza una vez que se sitúan en el lugar adecuado de humedad, luz, soporte epifito, litófito, terrestre o en ocasiones saprófito y asociarse con grupos de hongos micorrízicos de *Rhizoctonia* sp. que en muchas ocasiones son específicos para cada especie, el cual ayuda desde la germinación hasta que la plántula se establece y logra desarrollarse como una planta capaz de efectuar la fotosíntesis (Withner, 1974; Menchaca y Moreno, 2011; Dearnaley, *et al.*, 2012). Según el “Manual para la Propagación de Orquídeas” de la Comisión Nacional Forestal, de un total de 1 millón de semillas 10 o 15 llegan a germinar, y de éstas sólo una o dos llegan a ser plantas adultas en su ambiente natural (CONAFORT, 2011).

Es importante conocer las condiciones de la producción de semillas, su germinación y establecimiento de plántulas bajo condiciones de campo para poder plantear estrategias de conservación y restauración ecológicas principalmente causada por la intervención de las actividades antropogénicas. Y con ello, también contribuir con el entendimiento y valoración de los procesos biológicos reproductivos que mejoren la investigación de cómo poder realizar la propagación de las especies con mayor éxito en condiciones de laboratorio y contribuir así aún más a la conservación de las especies.

## 2.2 Antecedentes de la reproducción bajo condiciones *in vitro*

Cultivar *in vitro* dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial, contempla los factores fundamentales que una planta requiere para poderse desarrollar. Es desde hace aproximadamente 120 años, que se iniciaron las investigaciones de fisiología vegetal y de donde han surgido las diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, diseñadas para el crecimiento y multiplicación de las plantas, en condiciones controladas de medios de cultivo, reguladores del crecimiento, aplicación de carbohidratos, agentes gelificantes que mantengan la nutrición y humedad, así como de otros aspectos abióticos de relevancia como luz, temperatura y todo ello libres de cualquier patógeno. Reproducir las condiciones que requiere una planta en el laboratorio es complejo, por ello se selecciona aquellos que pueden ser controlados.

En el caso de la micropropagación de orquídeas no ha sido la excepción, ya que, debido al desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos es como actualmente se obtienen, en tiempos más cortos que de forma natural, la germinación y crecimiento de diferentes especies de orquídeas e incluso en mayor número (Hurtado y Merino, 1987; Thorpe, 2006).

La germinación de las semillas de orquídeas, así como también la multiplicación de sus tejidos vegetales y el crecimiento de plántulas asépticamente en frascos de vidrio o plástico sobre un medio nutritivo gelificado que contiene los azúcares y sales

minerales necesarias para que las semillas germinen y las plántulas se desarrollen, han sido muy eficaces y necesarias para su propagación en forma masiva y en condiciones controladas *in vitro*. Particularmente las semillas de orquídea requieren todo esto, al carecer de endospermo, tamaño pequeño y necesidad de micorrizas de manera natural, que tiene que ser sustituida bajo condiciones de laboratorio de tal modo que se ha llegado a considerar que existen dos tipos básicos de germinación *in vitro* para las orquídeas, la germinación simbiótica y asimbiótica (Knudson, 1922, Otero, *et al.*, 2002; Téllez, 2011).

### 2.2.1 Germinación *in vitro* simbiótica

Bernard durante los años de 1874-1911 formuló un método para la germinación simbiótica de semillas de orquídeas *in vitro*, y quizás fue el primer método para la propagación *in vitro* de cualquier planta, utilizando lo que en su momento eran procedimientos microbiológicos modernos y avanzados (Selosse, *et al.*, 2011).

Establecer una relación simbiótica con hongos micorrízicos de tipo endófito, para las semillas de orquídeas que no poseen endospermo, ha sido una solución que se observa en la naturaleza, donde las micorrizas aportan al embrión nutrientes para su germinación, este simbiote le proporciona los azúcares que se requieren para que la semilla pueda germinar, forme la estructura de protocormo y finalmente una plántula capaz de ser independiente (Harrison y Arditti, 1972; Arditti y Ernst, 1993; Ruíz, *et al.*, 2008; Dearnaley, *et al.*, 2012). Relación simbiótica que actualmente ha sido revisada principalmente por Otero, *et al.*, 2002; 2004; 2005; 2007; 2009; 2013).

Actualmente esta relación simbiótica, se obtiene experimentalmente bajo condiciones de laboratorio con germinación de las orquídeas *in vitro* y con la presencia de la o las micorrizas apropiadas, estableciendo un cultivo controlado de la relación simbiótica bajo estas condiciones (Clements, 1988; Cruz, *et al.*, 2015). Son pocos los investigadores que han realizado este tipo de estudios simbióticos además del grupo de Otero y colaboradores mencionado anteriormente, también se encuentran trabajando en ello: Yoder, *et al.*, 2000; Dearnaley, *et al.*, 2012; y Borges, *et al.*, 2015.

### 2.2.2 Germinación *in vitro* asimbiótica

La germinación de semillas de orquídeas de forma asimbiótica, sin los simbiontes precursores de la germinación en semillas de orquídea, se desarrolló con un procedimiento para la propagación *in vitro* de plantas puras, de forma axénica (Knudson, 1922; 1946). La técnica de cultivo *in vitro* es utilizada para la propagación de orquídeas mediante el uso de medios de crecimiento nutritivos y mejorando los métodos de micropropagación con la inclusión de reguladores del crecimiento (citocininas, auxinas, giberelinas, brasinoesteroides, jasmonatos, thidiazuron ácido acetilsalicílico) y aditivos vegetales (como el carbón activado, agua de coco, plátano, entre otros), que mejoran la germinación y su crecimiento y desarrollo (Arditti, 2008), con el fin de contribuir a la propagación.

Con la germinación *in vitro* asimbiótica, se puede llegar a germinar miles de semillas que en la naturaleza no se podría, y puede llegar a ser un método adecuado para recuperar individuos de una misma especie con variabilidad genética (Abraham, *et*

*al.*, 2012; Teixeira, *et al.*, 2015). Así mismo estas técnicas asimbióticas permiten conocer las características ontogénicas y morfofisiológicas de los protocormos y estadios de germinación y desarrollo de plántulas bajo condiciones *in vitro* (Knudson, 1922; 1946; Arditti y Ernst, 1993; Shimura y Koda, 2004; Arditti, 2008; Chen *et al.*, 2015).

### III Descripción de las especies en estudio

#### 3.1 Descripción del género *Cuitlauzina*

*Cuitlauzina* es un género de orquídeas que se distribuyen desde México hasta Panamá. El nombre del género se otorgó en honor de Cuitlahuazin, un caudillo mexicano hermano de Moctezuma, Gobernador de Iztapalapa. Este género comprende 28 especies descritas y de estas, solo 7 aceptadas por The Plant List (2013):

1. *Cuitlauzina candida* (Lindl.) Dressler & N. H. Williams
2. *Cuitlauzina convallarioides* (Schltr.) Dressler & N. H. Williams
3. *Cuitlauzina egertonii* (Lindl.) Dressler & N. H. Williams
4. *Cuitlauzina pandurata* (Garay) M. W. Chase & N. H. Williams
5. *Cuitlauzina pygmaea* (Lindl.) M. W. Chase & N. H. Williams
6. *Cuitlauzina pulchella* (Bateman ex Lindl.) Dressler & N. H. Williams
7. *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex.

**Especie de estudio:** *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex.

**Sinónimos:** *Odontoglossum citrosmum*, *Odontoglossum pendulum*, *Oncidium citrosmum* y *Oncidium galeottianum*.

**Nombres comunes:** chorritos, pozolillo.

### **Clasificación Taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Superorden: Liliiflorae

Orden: Liliales

Familia: *Orchidaceae*

Género: *Cuitlauzina*

Especie: *Cuitlauzina pendula*

### Descripción de *Cuitlauzina pendula*

Hierba epífita cespitosa, hasta de 40 cm de alto, sin incluir la inflorescencia. Pseudobulbos algo agregados, ovoides, lateralmente comprimidos, verdes o amarillentos, lisos, arrugados con la edad, brillantes, hasta de 5-10 x 2.5-4 cm. Hojas apicales, 2-3, coriáceas, oblongo-elípticas o lanceoladas, de 10-25 x 2-4.5 cm. Inflorescencia axilar, péndula o arqueada; un racimo o una panícula con 2-3 ramas, de 25-120 cm de largo, el pedúnculo delgado, hasta de 70 cm de largo, muy rígido; el raquis denso, algo sinuoso, hasta con 20 flores. Ovario pedicelado, de 15-30 cm de largo. Brácteas florales triangulares, agudas, escariosas, de 1.5-3 mm de largo. Flores (**Foto 4**) muy vistosas, subcarnosas, de 40-70 mm de diámetro; tépalos y pétalos blanco puro, o frecuentemente esfumados, punteados o manchados de rosado, muy raramente con grandes manchas púrpura-magenta, la superficie dorsal frecuentemente rosada; labelo blanco o más frecuentemente rosado, el callo amarillo con puntos púrpura oscuro; fuertemente fragantes, el aroma algo cítrico. Sépalos subunguiculados, rígidos, obovados a elípticos, ampliamente redondeados, el dorsal de 15-25 x 10-18 mm; los laterales algo oblicuos, de 22 x 15 mm. Pétalos subunguiculados, elípticos, el borde irregular, el ápice retuso, de 15-22 x 12-15 mm. Labelo de 28-30 mm de largo, con una uña muy larga, de 5-10 mm de largo, donde se asienta en callo; la lámina extendida, transversalmente reniforme, bilobada, profundamente emarginada en el ápice, la base truncado-cordiforme, de 10-20 x 20-30 mm. Columna de 4.5-6 mm de largo, 2.5-3 mm de grosor, subtrígona, con 3 grandes alas petaloides, 2 a los lados del estigma y una más angosta en el clinandrio, alas oblongo-flabeladas, erosas, hasta de 3 mm de largo. Estigma excavado, oblongo; rostelo una lámina transversal, gruesa. Antera de 4.5 mm de largo. Polinario de 2.5 mm de largo, con 2 polinios, estípites y viscidio. Cápsula elipsoide, de ca. 3 x 1.6 cm. *Cuitlauzina pendula* es una especie endémica, variable a lo largo de su amplia distribución (Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Guerrero y Oaxaca. Crece en sitios templados o semicálidos, subhúmedos, con abundantes lluvias en verano y poca lluvia invernal. Es más abundante en sitios con abundante neblina. Las flores son autocompatibles y es fácil obtener semillas, florece de junio - agosto. La producción de cápsulas en el campo es muy baja, del orden de una cápsula en varios cientos de flores. Las cápsulas tardan en madurar cerca de un año, y las semillas se dispersan durante la temporada de secas, en marzo y abril. Su estado de conservación es amenazado según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (CONABIO, 2010b).



Foto 4. Flores de *Cuitlauzina pendula*.

### 3.2 Descripción del género *Epidendrum*

*Epidendrum*, es uno de los géneros más diversos y numerosos de la familia *Orchidaceae*. La mayoría de especies del género *Epidendrum* son epífitas y litófitas, y se han adaptado a casi todos los biotopos de bosques Neotropicales, estableciéndose principalmente en las selvas bajas, medianas y altas (García y Sánchez, 1999). Es un género de orquídeas que comprende 2.131 nombres científicos de plantas del rango de especies de los cuales solo 1.435 son especies aceptadas por The Plant List (2013). Se distribuye desde Carolina del Norte en los Estados Unidos de Norteamérica hasta Argentina y la mayor concentración de taxa se localiza en Sudamérica especialmente en los Andes, desde el nivel del mar hasta por lo menos los 2,100m de altitud (García y Sánchez, 1999).

**Especie de estudio:** *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl.

**Sinónimos:** *Epidendrum rhizophorum*, *Epidendrum pratense*, *Epidendrum radicans fuscatum* y *Epidendrum radicans chiriquense*.

## Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Superorden: Liliiflorae

Orden: Liliales

Familia: *Orchidaceae*

Género: *Epidendrum*

Especie: *Epidendrum radicans*

### Descripción de *Epidendrum radicans*:

Hierba que crece sobre el suelo generalmente sobre troncos o rocas, muy variable. Mide hasta 1.5 m de largo. Tallo cilíndrico, recto, de 19 a 125 cm de largo y 3.5 a 8 mm de diámetro, algo ramificados, las ramas más o menos erectas, trepadoras o también tendidas. Hojas alternas, con consistencia de cuero, con la base abrazando el tallo, a veces algo purpúreas. Inflorescencia con racimos de hasta 60 cm de largo. En la base de cada flor se presenta una bráctea pequeña, triangular, que con el tiempo se seca. Flores grandes y vistosas (**Foto 5**), de color rojo-anaranjado y con la punta de algunos de los pétalos algo amarillenta. Los 3 sépalos y 2 de los 3 pétalos son muy parecidos, el labelo muy modificado, con su parte basal angosta y unida a la columna, en el ápice el pétalo se ensancha abruptamente y forma 3 lóbulos con el margen desgarrado; la columna algo encorvada y dilatada hacia el ápice. En el este de México florece de septiembre a febrero y la fructificación se prolonga hasta junio. Frutos o cápsulas elipsoides, acostilladas, de 4.2 a 4.4 cm de largo y 15 a 21 mm de diámetro. Raíces largas, carnosas, aéreas que salen de los tallos. Habita el Bosque mesófilo de montaña, bosque de encino, selva subperennifolia, vegetación riparia y matorral perennifolio. Se distribuye de México (Chiapas, Oaxaca, Puebla y Veracruz) a Venezuela y Colombia. Su estatus migratorio en México es Nativa (CONABIO 2010b).



Foto 5. Flores de *Epidendrum radicans*.

### 3.3 Descripción del género *Laelia*

El género *Laelia* incluye algunas de las orquídeas más bellas y mejor conocidas de México. El nombre genérico probablemente fue dedicado a una de las Vírgenes Vestales de la antigua Roma, o quizá al nombre femenino “Laelia”, de aquella época. Son plantas epifitas, aunque ocasionalmente pueden encontrarse de forma litófito, la mayoría prefieren como árboles hospederos a las numerosas especies de encinos (*Quercus*). Es un género que comprende 164 nombres científicos de plantas del rango de especies de los cuales solo 24 son especies aceptadas por The Plant List (2013). Se distribuyen desde México hasta Brasil, desde los 100 a los 2700 m sobre el nivel del mar. Casi todas las especies mexicanas se distribuyen en las sierras del occidente del país (la Sierra Madre Occidental, el Eje Volcánico y la Sierra Madre del Sur), mientras que, en las sierras de la vertiente del Golfo de México, en la Sierra Madre Oriental, hay una sola especie, *Laelia anceps* (Halbinger y Soto, 1997).

**Especie de estudio:** *Laelia anceps* Lindley

**Nombres comunes:** Calaverita, flor de San Miguel, Huichila.

#### **Clasificación Taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Superorden: Liliiflorae

Orden: Liliales

Familia: *Orchidaceae*

Género: *Laelia*

Especie: *Laelia anceps*

### Descripción de *Laelia anceps*

Hierba epífita, ocasionalmente litófita, con rizoma alargado de unos 4 cm, los pseudobulbos elipsoide-ovoides, alargados, comprimidos con doble filo, de hasta 11 cm de largo y 3.5 a 5 cm de ancho; generalmente con una hoja apical, elíptica, rígida, de 20 cm de largo y 5 de ancho. La inflorescencia de 40 a 60 cm de largo, cubierta con brácteas de doble filo, con 1 a 3 flores en la parte terminal (**Foto 6**). Las flores grandes, vistosas, de 6-12cm de diámetro, generalmente rosado-lila, el lóbulo medio del labelo púrpura oscuro. En el centro del labelo se distingue el callo amarillo con 3 bordes y en la garganta rayas bifurcadas en diferentes tonos de rojo. Su época de floración es desde octubre hasta diciembre y enero, la duración de las flores es de 10 a 15 días, o más. Se distribuye en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y en Guatemala y Honduras (CONABIO 2010b).



Foto 6. Flores de *Laelia anceps*.

## IV Justificación

La familia *Orchidaceae* es uno de los grupos de plantas con mayor abundancia en número de especies, pero es uno de los más vulnerables debido a la baja germinación de las semillas en la naturaleza, al no tener endospermo que le brinde los nutrientes necesarios, para la germinación (Benzing, 1990). En este sentido, la Biotecnología Vegetal puede aportar herramientas valiosas que permitan el mejor aprovechamiento de estas plantas y aseguren, al mismo tiempo, su conservación. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ofrece la posibilidad de multiplicar plantas en forma masiva y libres de virus a partir de semillas y en menor tiempo que de forma natural (Rao, 1998; Shimura y Koda, 2004).

En la actualidad, es de vital importancia tomar acciones que conlleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas, entre las que se tienen que establecer sistemas de micropropagación, para mantener una producción continua de ejemplares de calidad, y reducir el efecto que tiene el saqueo de especies de sus poblaciones naturales (Lee y Lee, 1991). Es importante desarrollar métodos de conservación *ex situ*, como el cultivo *in vitro*, que proporciona un complemento importante para la conservación de taxones raros, amenazados o en riesgo (Bustam, *et al.*, 2014).

## V Pregunta de investigación

¿Cuál es el medio de cultivo de tejidos vegetales y la concentración de ácido naftalen-acético (ANA) que propicia un mayor porcentaje de germinación *in vitro* en semillas de *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*, tres especies de orquídeas mexicanas?

## VI Hipótesis

Los requerimientos nutritivos y de reguladores de crecimiento *in vitro* para la germinación de las semillas de orquídeas son característicos de cada especie, utilizando los medios Knudson C, Murashige y Skoog (MS) y un medio Mínimo con diferentes concentraciones de ANA, se obtendrán diferencias en la germinación de *C. pendula*, *E. radicans* y *L. anceps*.

## VII Objetivos

### 7.1 Objetivo general

Encontrar cuál de los medios de cultivo y concentración del regulador del crecimiento es el mejor para la germinación *in vitro* de semillas de las especies de orquídeas mexicanas en estudio, en tiempos de incubación cortos con el fin de contribuir a su conservación *ex situ*.

## 7.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto sobre la germinación de las semillas de *C. pendula*, *E. radicans* y *L. anceps* en los medios de cultivo Mínimo, Knudson C y MS.
- Determinar la concentración óptima de ANA para la germinación *in vitro* de semillas de *C. pendula*, *E. radicans* y *L. anceps*.

## VIII Materiales y métodos

### 8.1 Obtención de cápsulas maduras

La colecta de cápsulas maduras se realizó mediante la cosecha de dos cápsulas maduras de cada especie de: *C. pendula* en marzo de 2015, *E. radicans* en agosto de 2016 y *L. anceps* en junio de 2016; generadas por autopolinización, de plantas de una colección privada al sur de la Ciudad de México.

Las semillas extraídas de las cápsulas dehiscentes, de manera natural, fueron colocadas en bolsas de papel estraza y se almacenaron bajo las condiciones de laboratorio a 25 °C.

## 8.2 Prueba de viabilidad de lotes de semilla

Se utilizó la prueba de Lakon (1949) modificada por Hosomi y col. (2011), donde se aplica un pretratamiento a las semillas con sacarosa al 10 %, durante 24 h. en completa oscuridad antes de la imbibición en cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT) al 1 % durante 24 horas, en tubos de ensaye en completa oscuridad y a temperatura ambiente.

Se realizaron tres experimentos por triplicado, con una distancia de un mes entre el primer y segundo experimento y de dos meses entre el segundo y tercer experimento, para evaluar el efecto del tiempo sobre la viabilidad de las semillas.

Las observaciones se realizaron en microscopio óptico Nova, con lente intermedio de 10 y objetivos de 4X y 10X (40 y 100 diámetros respectivamente), considerando viables aquellas semillas cuyos embriones presentaron coloración roja y las no viables permanecieron incoloras, y se obtuvieron porcentajes de viabilidad.

El conteo de las semillas viables y no viables fue realizado a través de la observación en microscopio óptico con el objeto de obtener los porcentajes de viabilidad.

## 8.3 Tamaño de las semillas

Se midieron 100 semillas de cada una de las especies de orquídeas: *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*, y así se obtuvieron las dimensiones

de largo (eje longitudinal) y ancho (eje transversal) de la testa como del embrión, sin considerar las células del suspensor.

Con una cámara Omax para microscopio óptico, se tomaron fotografías de las semillas y se utilizó el programa ToupView con el objeto de conocer las dimensiones promedio de las testas y embriones de las semillas de orquídeas.

Se calcularon los volúmenes de las semillas (testas) fusiformes y de los embriones elípticos de las especies en estudio utilizando las fórmulas reportadas por Arditti y cols. (1980):

$$V_s = 2 \left[ \left( \frac{A}{2} \right)^2 \left( \frac{1}{2} L \right) \left( \frac{\pi}{3} \right) \right]$$

Donde:

$V_s$  = volumen de la semilla ( $mm^3$ )

$V_e$  = volumen del embrión ( $mm^3$ )

$$V_e = \left( \frac{1}{2} A \right)^2 \left( \frac{1}{2} L \right) \left( \frac{4\pi}{3} \right)$$

$L$  = largo de la semilla o del embrión ( $mm$ )

$A$  = ancho de la semilla o del embrión ( $mm$ )

## 8.4 Histoquímica de las semillas

Se realizaron técnicas histoquímicas, mediante la aplicación de colorantes específicos para identificar sustancias de reserva, carbohidratos, lípidos y proteínas, en semillas de las especies en estudio.

### **Para la tinción de proteínas se utilizó:**

Azul de Coomassie- tiñe las proteínas azules (Fisher, 1968; Demarco, 2017) y

Eosina- tiñe las proteínas naranja-rojizo (Johansen, 1940).

### **Para la tinción de lípidos:**

Sudan III- tiñe los lípidos rojo o naranja-rojo (Southworth, 1973).

### **Para la tinción de carbohidratos:**

Lugol- Esta reacción destaca los granos de almidón de azul oscuro a negro (Johansen, 1940) y

Cristal violeta- tiñe los carbohidratos de color violeta (Johansen, 1940).

Se seleccionó una pequeña cantidad de semillas, se colocaron en tubos de ensaye. Se tiñeron con las diversas soluciones como se describe en el Anexo (1) a fin de observar: proteínas, lípidos y carbohidratos.

Se observó la tinción, utilizando un microscopio óptico Nova, tanto en el embrión como en la testa de las semillas.

## 8.5 Medios de cultivo

Las semillas se establecieron en tres medios solidos con agar al 10 %: el medio Mínimo, el medio Murashige y Skoog (1962) y el medio Knudson C (1946), a cada medio se le añadió solución stock de ácido naftalen-acético (ANA), para obtener las diferentes concentraciones: 0.0, 0.1, 1.0 y 3 mg/L, de ANA, haciendo un total de 12 medios nutritivos, como se muestra en la (Tabla 2).

Los componentes de los medios, así como la preparación de estos se muestran en el Anexo (2).

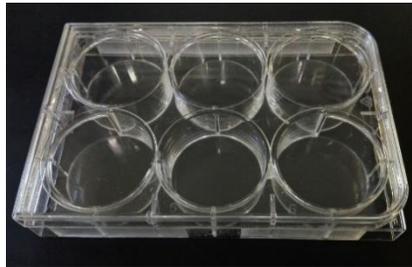
Tabla 2. Tratamientos de cultivo.

Medio de germinación	Concentraciones de ANA (mg/L)			
	0.0	0.1	1.0	3.0
Mínimo	M1	M2	M3	M4
Murashige y Skoog (MS)	M5	M6	M7	M8
Knudson C	M9	M10	M11	M12

Los medios de cultivo fueron colocados en:

1. placas multipozo estériles (Foto 7) y cada pozo correspondió a un medio distinto con tres repeticiones.

2. 9 frascos tipo Gerber de 100 mL. con cada uno de los 12 tratamientos.
3. Se esterilizaron en autoclave a 120 lb. durante 20 min.
4. Se mantuvieron en refrigeración tanto las placas como los frascos hasta su uso.



**Foto 7.** Placa multipozo.

## 8.6 Germinación de las semillas de orquídea *in vitro*

### 8.6.1 Desinfestación de las semillas

Dentro de la campana de flujo laminar, las semillas fueron desinfestadas con hipoclorito de sodio comercial (6 % cloro activo) diluido al 10 % durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada estéril dos veces. Se repitió el procedimiento tres veces.

### 8.6.2 Siembra *in vitro*

Una vez desinfestadas las semillas fueron extendidas homogéneamente dentro de cada pocillo de las placas con cada uno de los medios de cultivo a probar, quedando

así sembradas las semillas. La misma operación procedió para la siembra en frascos tipo Gerber.

Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad a 28 °C.

#### 8.6.2.1 Fechas de siembra *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*

La primera siembra de las semillas se realizó en el mes de septiembre, la segunda en el mes de octubre y la tercera y última siembra se realizó en el mes de diciembre.

#### 8.6.3 Conteo de las semillas

El conteo de las semillas se realizó en cada uno de los pozos de las placas multipozo utilizando un microscopio estereoscópico. Las semillas totales de cada pozo contenían: semillas viables (semillas con embrión) y semillas no viables (semillas sin embrión). Para el conteo se utilizaron únicamente las semillas que contenían embrión

#### 8.6.4 Germinación *in vitro*

La germinación se evaluó por revisión visual diaria en cada uno de los medios de cultivo y para cada una de las especies en estudio.

Se definieron 5 etapas de desarrollo:

- 1.-Hidratación- inicia con la absorción de agua por las semillas (imbibición).
- 2.-Protocormo- pequeño cuerpo esférico, parecido a un tubérculo, dentro de la testa.
- 3.-Germinación- protocormo fuera de la testa.
- 4.- Primordio foliar.
- 5.-Hojas desarrolladas.

Estas etapas se modificaron de los estadios de desarrollo propuestos por Mitchell, (1989).

El primer día de incubación se tomó como el día posterior al de la siembra.

Se consideró como semilla germinada cuando se alcanzó la etapa 3 de desarrollo.

## 8.7 Microscopia Electrónica

Las preparaciones de microscopia electrónica de Barrido (MEB), se realizaron de acuerdo con Munien y col. (2015) para cada una de las especies, provenientes de aquellos medios donde se obtuvo respuesta.

Se fijó el material fresco de los diferentes estadios alcanzados para cada especie germinada de las semillas de orquídeas, provenientes de los cultivos, en glutaraldehído al 3 % durante 4 días.

Se lavó durante 5 minutos con buffer de fosfatos.

Se deshidrató con alcohol etílico desnaturalizado gradual de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta 100 %, cada uno 20 min. Se dejó por 8 horas en el último cambio.

Se secaron en secadora de punto crítico Tousimis, los diferentes estadios de desarrollo.

Se montaron en porta-muestras de aluminio utilizando cinta de carbón de doble cara y se recubrieron con una capa de oro (a un vacío de 0.5 Torr durante 4.0 minutos) utilizando un Dentron Vacuum, Desk III.

Las muestras se visualizaron y se formaron imágenes usando un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL, modelo JSM-5900LV.

## 8.8 Análisis estadísticos

Una vez realizada la germinación de las tres especies de orquídeas bajo las condiciones experimentales se evaluó el índice, velocidad y porcentaje de germinación de acuerdo con González y Orozco (1996):

- ❖ Velocidad de germinación (**M**): la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación.

Donde:

$$M = \sum \left( \frac{n_i}{t} \right)$$

**M** = velocidad de germinación

**n<sub>i</sub>** = número de semillas germinadas en el día *i*

**t** = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla

- ❖ Índice de germinación (**IG**): la medida del tiempo de germinación en relación con la capacidad germinativa.

$$IG = \frac{\sum(n_i t_i)}{N}$$

Donde:

**IG** = índice de germinación

**n<sub>i</sub>** = número de semillas germinadas en el día *i*

**t<sub>i</sub>** = número de días después de la siembra

**N** = total de semillas sembradas

❖ Porcentaje de germinación:

$$PG = \left(\frac{n}{N}\right) * 100 \%$$

Donde

**PG** = porcentaje de germinación

**n** = número de semillas germinadas

**N** = total de semillas sembradas

Se realizó Análisis de Varianza de dos vías, así como la prueba de comparaciones múltiples de Tukey considerando una  $p < 0.05$  como nivel de significancia, utilizando el paquete estadístico NCSS 2007. Para determinar la variación del índice, velocidad y porcentaje de germinación en cada una de las especies de estudio entre medios de cultivo y concentraciones de ANA.

## IX Resultados

### 9.1 Prueba de viabilidad

#### 9.1.1 *Cuitlauzina pendula*

La viabilidad observada en las tres replicas para *Cuitlauzina pendula* con CTT se observó con la tinción roja de los embriones Figura (1), con el tiempo de almacenamiento, ésta disminuyo de 44.4 % a 13.9 % Figura (2), entre cada experimento realizado, asegurando el porcentaje de viabilidad para cada cultivo.



Figura 1. Semillas viables y no viables de *Cuitlauzina pendula*, tratadas con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT), tomadas con microscopio óptico Nova, con lente intermedio de 10 y objetivo de 10X (100 diámetros). Semilla viable (izquierda) y no viable (derecha).

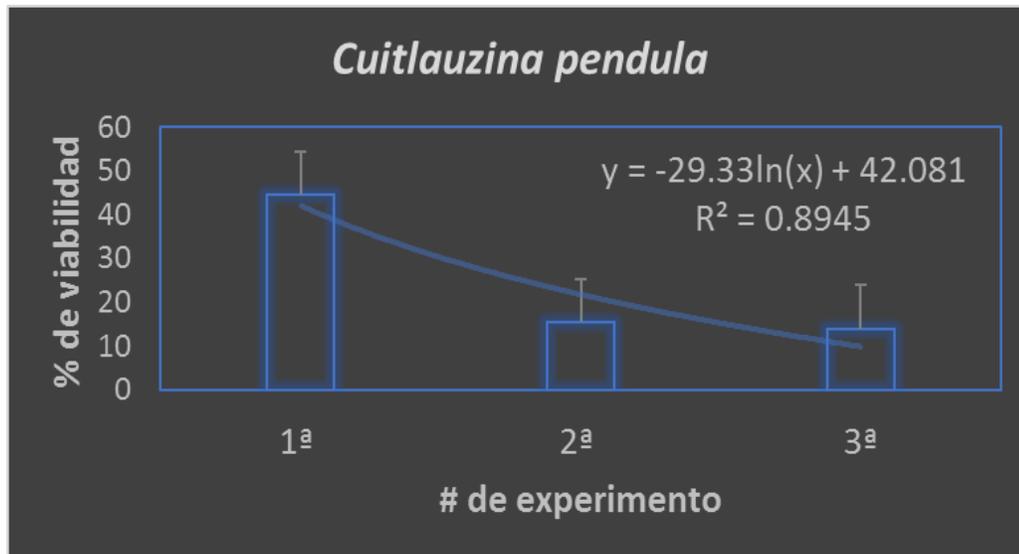


Figura 2. Pruebas de viabilidad en semillas de *Cuitlauzina pendula*. Los resultados muestran el promedio de los porcentajes de germinación y el error de tres pruebas realizadas por triplicado. El modelo de regresión y el valor de  $R^2$ , solo son válidos para este intervalo y se realizaron con el programa Excel.

### 9.1.2 *Epidendrum radicans*

La viabilidad de las semillas de *Epidendrum radicans*, por triplicado con CTT se observó con la tinción roja de los embriones Figura (3), disminuyó del 24.4 % al 4.4 % Figura (4), denotando la pérdida de ésta con el paso del tiempo, entre cada experimento realizado.



Figura 3. Semillas viables y no viables de *Epidendrum radicans*, tratadas con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT), tomadas con microscopio óptico a 40 diámetros. Semilla viable (izquierda) y no viable (derecha).

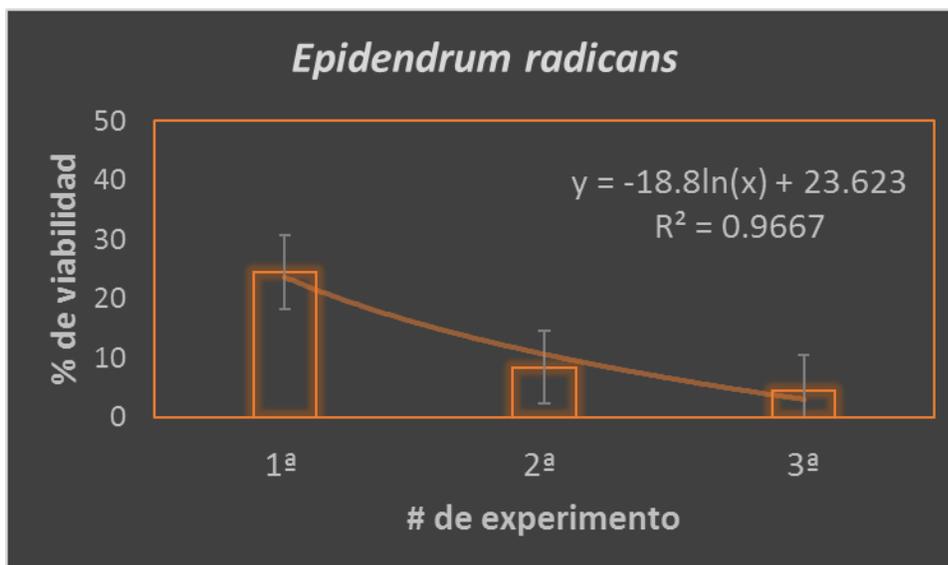


Figura 4. Pruebas de viabilidad en semillas de *Epidendrum radicans*. Los resultados muestran el promedio de los porcentajes de germinación de tres pruebas realizadas por triplicado. El modelo de regresión y el valor de  $R^2$ , solo son válidos para este intervalo y se realizaron en el programa Excel.

### 9.1.3 *Laelia anceps*

La viabilidad para *Laelia anceps* por triplicado con CTT se observó con la tinción rojiza de los embriones Figura (5), la viabilidad disminuyó de 88.9 % a 32.5 % Figura (6), remarcando la pérdida de ésta con el paso del tiempo, entre cada experimento realizado.



Figura 5. Semillas viables y no viables de *Laelia anceps*, tratadas con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT), tomadas con microscopio óptico a 100 diámetros. Semilla viable (izquierda) y no viable (derecha).

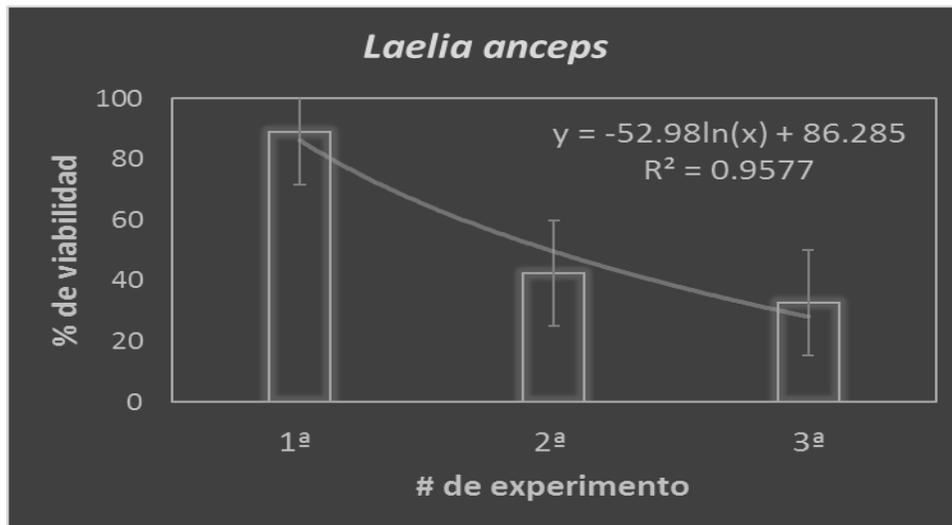


Figura 6. Pruebas de viabilidad en semillas de *Laelia anceps*. Los resultados muestran el promedio de los porcentajes de germinación de tres pruebas realizadas por triplicado. El modelo de regresión y el valor de  $R^2$ , solo son válidos para este intervalo y se realizaron en el programa Excel.

## 9.2 Tamaño de las semillas

### 9.2.1 *Cuitlauzina pendula*

Las dimensiones promedio de las testas en semillas de esta especie presentaron un largo promedio de 0.48 mm, un ancho de 0.18 mm y un volumen de 0.0041 mm<sup>3</sup>. El embrión presentó un largo promedio de 0.26, de ancho 0.16 mm y un volumen de 0.0035 mm<sup>3</sup>. La relación volumen del embrión con respecto al volumen de la testa muestra que el embrión ocupa un 85 % del volumen de la testa Tabla (3).

Tabla 3. Dimensiones de la testa y embrión en las semillas de *Cuitlauzina pendula*, del largo, ancho (mm) y volumen (mm<sup>3</sup>).

<i>Cuitlauzina pendula</i>		Dimensiones	Imagen
Testa	Largo (mm)	0.48 ± 0.06	
	Ancho (mm)	0.18 ± 0.02	
	Volumen de la testa ( $V_t$ ) (mm <sup>3</sup> )	0.0041	
Embrión	Largo (mm)	0.26 ± 0.03	
	Ancho (mm)	0.16 ± 0.02	
	Volumen del embrión ( $V_e$ ) (mm <sup>3</sup> )	0.0035	
Relación $V_e / V_t$		0.856	

### 9.2.2 *Epidendrum radicans*

Las dimensiones promedio de las testas en semillas de esta especie presentaron un largo promedio de  $3.24 \pm 0.55$  mm, un ancho de  $0.48 \pm 0.07$  mm y un volumen de  $0.1954$  mm<sup>3</sup>. El embrión presentó un largo promedio de  $0.39 \pm 0.08$  mm, de ancho  $0.24 \pm 0.04$  mm y un volumen de  $0.0118$  mm<sup>3</sup>. La relación del volumen del embrión con respecto al volumen de la testa fue de 0.060 Tabla (4).

Tabla 4. Dimensiones de la testa y embrión en las semillas de *Epidendrum radicans*, del largo, ancho (mm) y volumen (mm<sup>3</sup>).

<i>Epidendrum radicans</i>		Dimensiones	Imagen
Testa	Largo (mm)	$3.24 \pm 0.55$	
	Ancho (mm)	$0.48 \pm 0.07$	
	Volumen de la testa ( $V_t$ ) (mm <sup>3</sup> )	0.1954	
Embrión	Largo (mm)	$0.39 \pm 0.08$	
	Ancho (mm)	$0.24 \pm 0.04$	
	Volumen del embrión ( $V_e$ ) (mm <sup>3</sup> )	0.0118	
Relación $V_e/V_t$		0.060	

### 9.2.3 *Laelia anceps*

Las dimensiones promedio de las testas en semillas de esta especie presentaron un largo promedio de  $0.45 \pm 0.02$  mm, un ancho de  $0.11 \pm 0.01$  mm y un volumen de  $0.0014$  mm<sup>3</sup>. El embrión presento un largo promedio de  $0.23 \pm 0.02$  mm, de ancho  $0.09 \pm 0.01$  mm y un volumen de  $0.0010$  mm<sup>3</sup>. La relación del volumen del embrión con respecto al volumen de la testa fue de 0.684 Tabla (5).

Tabla 5. Dimensiones de la testa y embrión en las semillas de *Laelia anceps*, del largo, ancho (mm) y volumen (mm<sup>3</sup>).

<i>Laelia anceps</i>		Dimensiones	Imagen
Testa	Largo (mm)	$0.45 \pm 0.02$	
	Ancho (mm)	$0.11 \pm 0.01$	
	Volumen de la testa ( $V_t$ ) (mm <sup>3</sup> )	0.0014	
Embrión	Largo (mm)	$0.23 \pm 0.02$	
	Ancho (mm)	$0.09 \pm 0.01$	
	Volumen del embrión ( $V_e$ ) (mm <sup>3</sup> )	0.0010	
Relación $V_e / V_t$		0.684	

### 9.3 Características histoquímicas de las tres especies de semilla

Las pruebas histoquímicas realizadas en *Cuitlauzina pendula* Figura (7), *Epidendrum radicans* Figura (8) y *Laelia anceps* Figura (9) con los diferentes colorantes que se utilizaron para observar las sustancias de reserva dentro de las semillas, como fueron proteínas, lípidos y carbohidratos.

El azul de Coomassie permitió observar proteínas, las tonalidades verdes indican la presencia de lipoproteínas, las tonalidades cafés o pardas indican la presencia de glucoproteínas y las tonalidades azules indican la presencia de proteínas no modificadas y la eosina permitió observar la presencia de proteínas básicas con una coloración rojiza.

El sudan III nos permite observar la presencia de lípidos teñidos de color naranja - rojizo.

La tinción de Lugol permite observar la presencia de carbohidratos reducibles teñidos de color oscuro - negro y el cristal violeta permite observar los carbohidratos estructurales teñidos de color violeta.

Tinción	Coloración	<i>C. pendula</i>
Azul de coomassie		
Lipoproteínas Glucoproteínas Proteínas no modificadas	Verde Café o pardo Azul	
Eosina		
Proteínas básicas	Naranja - Rojizo	
Lugol		
Carbohidratos reducibles	Obscuro - Negro	
Sudan III		
Lípidos	Naranja - Rojizo	
Cristal violeta		
(Sudan III como contraste) Carbohidratos estructurales	Violeta	

Figura 7. Tinciones en semillas de *Cuitlauzina pendula*, tomadas con microscopio óptico Nova, observadas a 100 diámetros.

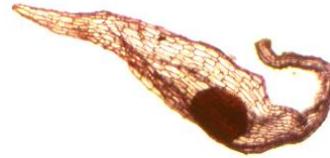
Tinción	Coloración	<i>E. radicans</i>
Azul de coomassie		
Lipoproteínas Glucoproteínas Proteínas no modificadas	Verde Café o pardo Azul	
Eosina		
Proteínas básicas	Naranja - Rojizo	
Lugol		
Carbohidratos reducibles	Obscuro - Negro	
Sudan III		
Lípidos	Naranja - Rojizo	
Cristal violeta (Sudan III como contraste) Carbohidratos estructurales	Violeta	

Figura 8. Tinciones en semillas de *Epidendrum radicans*, tomadas con microscopio óptico Nova, observadas a 40 diámetros.

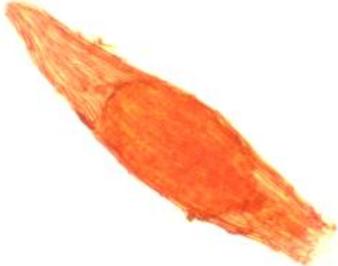
Tinción	Coloración	<i>L. anceps</i>
Azul de coomassie		
Lipoproteínas Glucoproteínas Proteínas no modificadas	Verde Café o pardo Azul	
Eosina		
Proteínas básicas	Naranja - Rojizo	
Lugol		
Carbohidratos reducibles	Obscuro - Negro	
Sudan III		
Lípidos	Naranja - Rojizo	
Cristal violeta (Sudan III como contraste) Carbohidratos estructurales	Violeta	

Figura 9. Tinciones en semillas de *Laelia anceps*, tomadas con microscopio óptico Nova, observadas a 100 diámetros.

## 9.4 Germinación asimbiótica

### 9.4.1 Germinación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*

La actividad metabólica de las semillas de ***Cuitlauzina pendula*** es diferente en cada uno de los medios de cultivo y concentraciones del regulador del crecimiento, donde se muestran cambios de coloración y/o tamaño, esto no significa que las semillas hayan germinado debido a que los embriones aún se encontraron dentro de la testa.

Los medios de cultivo con MS adicionados con 0.0 y 3.0 mg/L de ANA no mostraron actividad metabólica como se puede observar en la Figura (10).

La tabla 6. muestra los estadios de desarrollo alcanzados para ***Cuitlauzina pendula***, en los 12 tratamientos se alcanzó la etapa uno, de estos solo 10 alcanzaron la etapa dos, sin llegar a la etapa 3 de germinación. Resultados de tres repeticiones.

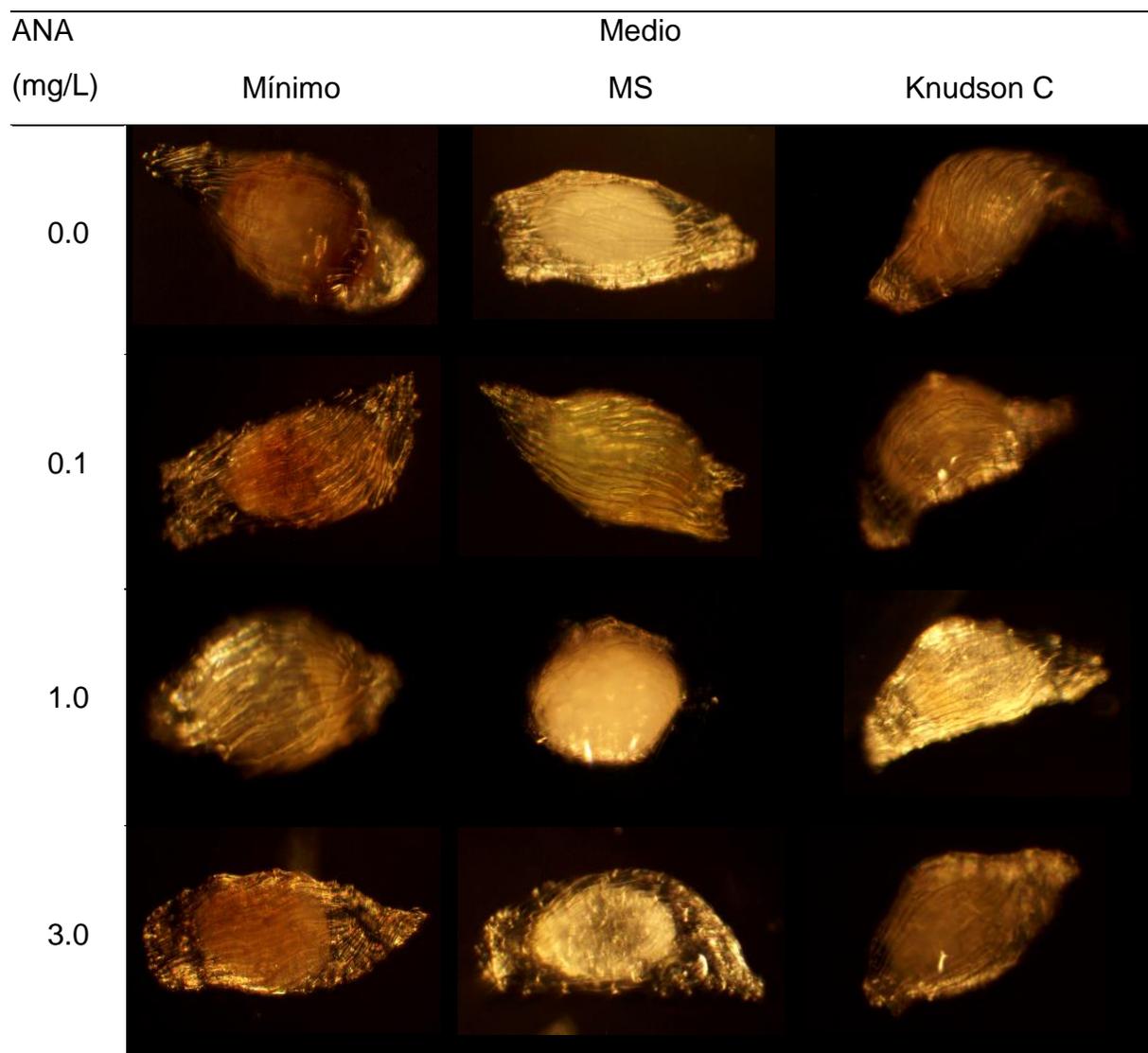


Figura 10. Actividad metabólica en semillas de *Cuitlauzina pendula*. Las fotografías fueron tomadas con cámara Omax A35100U en microscopio óptico a 100 diámetros, a 90 días de su siembra.

Tabla 6. Etapas de desarrollo alcanzada en *Cuitlauzina pendula*, hasta febrero del 2017, en tres experimentos realizados por triplicado.

Medio	Experimento	Etapa de desarrollo		
		1 Hidratación	2 Protocormo	3 Germinación
Mínimo 0.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
Mínimo 0.1	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
Mínimo 1.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
Mínimo 3.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
MS 0.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
MS 0.1	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
MS 1.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
MS 3.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
Knudson C 0.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
Knudson C 0.1	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
Knudson C 1.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	
Knudson C 3.0	3	■		
	2	■		
	1	■	■	

#### 9.4.2 Germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans*

Las semillas de *Epidendrum radicans* germinaron en el **medio Mínimo** en tres de las cuatro diferentes concentraciones de ANA, siendo las semillas del pozo en la concentración de 3.0 mg/L de ANA, la excepción donde los embriones se tornaron blanquecinos y detuvieron su crecimiento Figura (11). El resto de las semillas germinaron a partir del día 16 en el medio Mínimo con 0.1 mg/L de ANA, el día 27 en el medio con 0.0 mg/L de ANA y en el día 31 en el medio con 1.0 mg/L de ANA Figura (12). En este mismo medio a los 80 días los porcentajes de germinación en *E. radicans* en concentraciones de ANA 0.0 ,0.1, 1.0 y 3.0 mg/L fueron respectivamente de 32, 44, 6 y 0 % Figura (13).

En la Figura (11) también se observa el **medio MS** con las cuatro diferentes concentraciones de ANA y estos muestran germinación en todos ellos.

Como se observa en la Figura (12), las semillas iniciaron su germinación a partir del día 16 en el medio MS con 3.0 mg/L de ANA, el día 18 en el medio con 1.0 mg/L de ANA y el día 19 en las concentraciones de 0.0 y 0.1 mg/L de ANA Los porcentajes de germinación obtenidos hasta el día 80 en el medio MS en concentraciones de ANA 0.0, 0.1, 1.0 y 3.0 fueron del 35, 47, 22 y 10 % respectivamente Figura (13).

En el **medio Knudson C** con cuatro diferentes concentraciones de ANA se obtuvieron resultados de germinación Figura (11). Como se observa en la Figura (12), las semillas iniciaron su germinación a partir del día 16 en el medio MS con 1.0 mg/L de ANA, el día 19 en el medio con 0.1 mg/L de ANA, el día 21 en la

concentración de 0.0 mg/L de ANA y el día 31 en la concentración de 3.0 mg/L de ANA.

Los porcentajes de germinación obtenidos al día 80 en este medio en concentraciones de ANA 0, 0.1 1.0 y 3.0 mg/L, fueron del 28, 48, 20 y 7 % respectivamente Figura (13).

En la Tabla (7) se muestran los resultados de las etapas de desarrollo alcanzadas en semillas de *Epidendrum radicans*. En el **medio Mínimo** no germinaron en la concentración de 3.0 de ANA y se alcanzaron las etapas 1 y 2 para este medio y la etapa 3 se alcanzó en las concentraciones 0.0, 0.1 y 1.0 mg/L de ANA y la etapa 4 fue alcanzada en las concentraciones de 0.0 y 0.1 mg/L de ANA.

En el **medio MS** en las cuatro concentraciones de ANA se logró la germinación (etapa 3) y continuaron con la etapa 4. La etapa 5 se logró exclusivamente en las concentraciones de 0.0 y 1.0 mg/L de ANA.

En el **medio Knudson C** en las concentraciones de 0.0, 0.1 y 1.0 mg/L de ANA alcanzaron la etapa 4. La etapa 5 sólo se logró en la concentración de 0.0 mg/L de ANA, es decir germinaron en todas concentraciones.

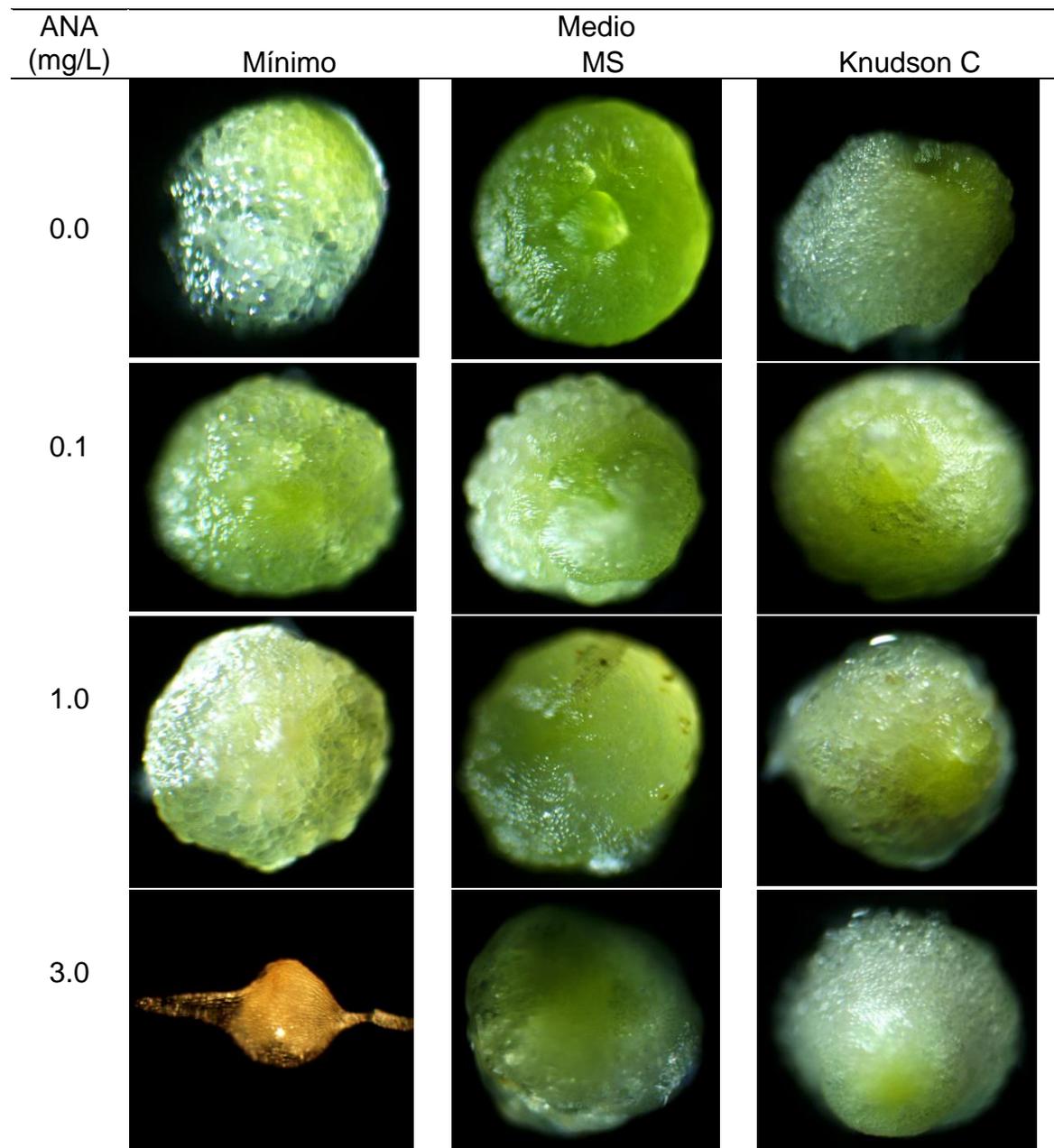


Figura 11. Semillas germinadas de *Epidendrum radicans*. Las fotografías fueron tomadas con cámara Omax A35100U en microscopio óptico a 40 diámetros.

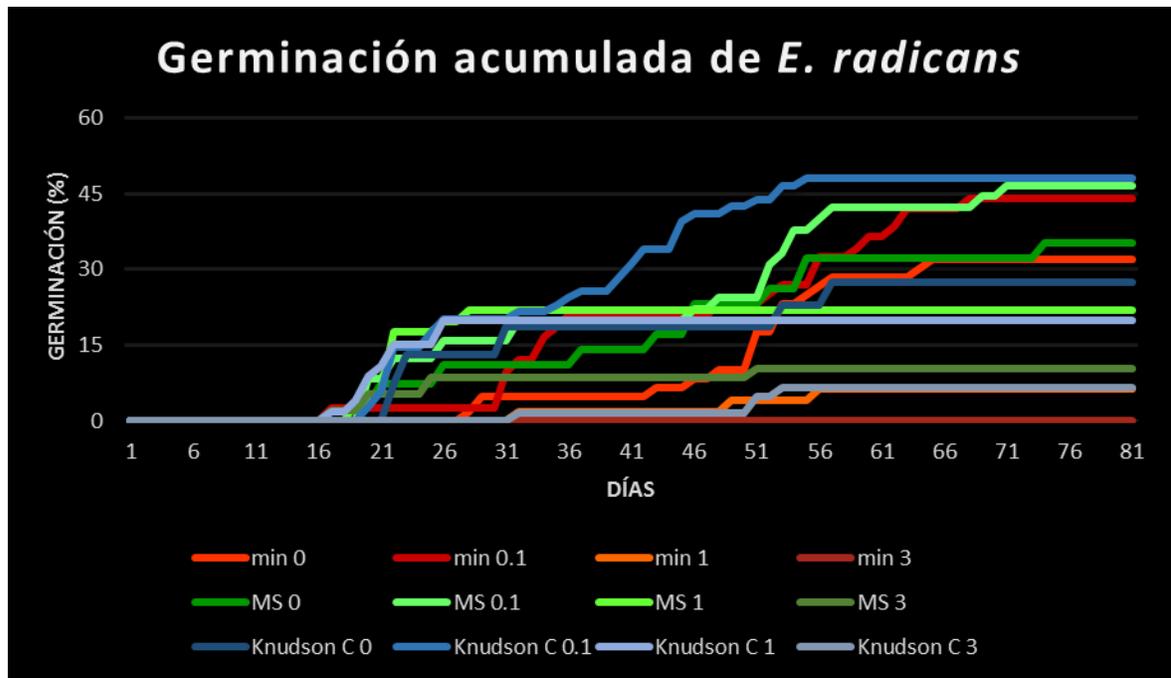


Figura 12. Germinación acumulada de *Epidendrum radicans* a través del tiempo en los medios Mínimo, MS y Knudson C, con las diferentes concentraciones de ANA.

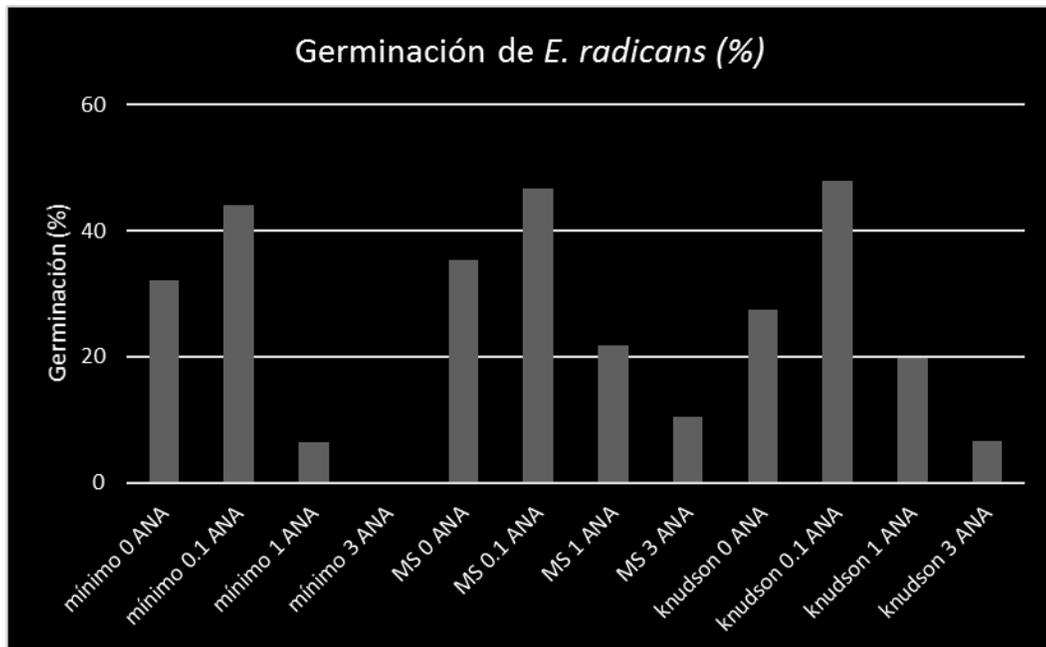


Figura 13. Porcentaje de germinación promedio de *Epidendrum radicans*. Las barras oscuras indican el porcentaje de semillas germinadas.

Tabla 7. Etapas de desarrollo alcanzadas en *Epidendrum radicans* hasta febrero del 2017, en tres experimentos realizados por triplicado.

Medio	Experimento	Etapa de desarrollo				
		1 Hidratación	2 Protocormo	3 Germinación	4 Primordio foliar	5 Hojas
Mínimo 0.0	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	
	1	█	█	█	█	
Mínimo 0.1	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	
	1	█	█	█	█	
Mínimo 1.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Mínimo 3.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
MS 0.0	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	█
	1	█	█	█	█	█
MS 0.1	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	
	1	█	█	█	█	
MS 1.0	3	█	█	█	█	█
	2	█	█	█	█	█
	1	█	█	█	█	
MS 3.0	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	
	1	█	█	█	█	
Knudson C 0.0	3	█	█	█	█	█
	2	█	█	█	█	█
	1	█	█	█	█	
Knudson C 0.1	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	
	1	█	█	█	█	
Knudson C 1.0	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	
	1	█	█	█	█	
Knudson C 3.0	3	█		█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		

La Tabla (8) muestra los resultados de la velocidad e índice de germinación, ambos referentes al tiempo y número de semillas germinadas y su capacidad germinativa. En donde la velocidad de germinación más alta alcanzada se logró en el **medio Knudson C** en la concentración de 0.1 mg/L de ANA y la menor velocidad de germinación en el **medio Mínimo** con una concentración de 1.0 mg/L de ANA. Con respecto al índice de germinación el mayor resultado se logró el **medio MS** con 0.0 mg/L de ANA y el menor índice de germinación se dió en el mismo medio, pero en la concentración de 3.0 mg/L de ANA.

Tabla 8. Velocidad e índice de germinación de *Epidendrum radicans*. La tabla muestra el promedio y desviación estándar de la media, de la velocidad e índice de germinación.

<i>E. radicans</i>		
Medio, ANA mg/L	Promedio ± dem	
	Velocidad de germinación	Índice de germinación
Mínimo 0.0	0.78 ± 0.67	131.60 ± 117.79
Mínimo 0.1	1.69 ± 1.21	311.84 ± 260.00
Mínimo 1.0	<b>0.06 ± 0.09</b>	10.99 ± 17.47
Mínimo 3.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
MS 0.0	1.24 ± 1.17	<b>365.74 ± 578.59</b>
MS 0.1	1.35 ± 1.40	310.55 ± 435.08
MS 1.0	0.75 ± 0.71	27.60 ± 24.35
MS 3.0	0.11 ± 0.15	<b>5.43 ± 8.56</b>
Knudson C 0.0	0.30 ± 0.31	43.73 ± 42.63
Knudson C 0.1	<b>1.75 ± 2.38</b>	172.56 ± 267.80
Knudson C 1.0	0.51 ± 0.56	18.56 ± 24.30
Knudson C 3.0	0.18 ± 0.32	21.18 ± 36.69

#### 9.4.2.1 Análisis estadísticos de *Epidendrum radicans*

El porcentaje de germinación de *Epidendrum radicans* mostró diferencias significativas tanto entre las diferentes concentraciones de ANA como entre los medios ( $P's < 0.0001$ ), y dichas diferencias dependen de la concentración ( $P = 0.000003$  de la interacción).

Para esta especie el mayor promedio de porcentaje de germinación se observó en la concentración de 0.1 mg/L de ANA, Tabla (9) y en el medio MS Tabla (10); en la interacción de la concentración del regulador de crecimiento y el medio de cultivo el mayor porcentaje de germinación se visualizó en la concentración 0.1 mg/L ANA del medio Knudson C Tabla (11).

Tabla 9. Promedios de porcentaje de germinación con respecto a las cuatro concentraciones de ANA en *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*.

Concentración de ANA (mg/L)	Promedio del % de germinación	
	<i>E. radicans</i>	<i>L. anceps</i>
0.0	17.29 <sup>a*</sup>	10.75 <sup>acd</sup>
0.1	<b>26.24<sup>b</sup></b>	<b>16.97<sup>b</sup></b>
1.0	11.79 <sup>c</sup>	8.91 <sup>acd</sup>
3.0	3.64 <sup>d</sup>	10.71 <sup>acd</sup>

\*valores en una misma columna con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), según la prueba de tukey.

Tabla 10. Promedios de porcentaje de germinación con respecto a los tres medios de cultivo en *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*.

Medio de cultivo	Promedio del % de germinación	
	<i>E. radicans</i>	<i>L. anceps</i>
Mínimo	10.22 <sup>a*</sup>	<b>18.01</b> <sup>a</sup>
MS	<b>17.31</b> <sup>bc</sup>	8.53 <sup>bc</sup>
Knudson C	16.70 <sup>bc</sup>	8.97 <sup>bc</sup>

\*valores en una misma columna con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05), según la prueba de tukey

Tabla 11. Promedios de porcentaje de germinación con respecto a la interacción de las concentraciones de ANA y el medio de cultivo en *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps* de los 12 tratamientos.

Concentración, medio	Promedio del % de germinación	
	<i>E. radicans</i>	<i>L. anceps</i>
0.0, Mínimo	15.05	17.78
0.0, MS	19.21	5.87
0.0, Knudson C	17.60	8.59
0.1, Mínimo	22.78	15.01
0.1, MS	25.74	20.26
0.1, Knudson C	<b>30.20</b>	15.64
1.0, Mínimo	3.05	17.63
1.0, MS	16.85	2.76
1.0, Knudson C	15.47	6.35
3.0, Mínimo	0	<b>21.62</b>
3.0, MS	7.41	5.20
3.0, Knudson C	3.52	5.30

Con respecto a la velocidad de germinación se observó que varió significativamente sólo entre las concentraciones de ANA ( $P=0.024967$ ). Encontrando diferencias significativas únicamente entre las concentraciones de 0.1 y 3.0 mg/L de ANA Tabla (12).

Tabla 12. ANOVA con respecto a la velocidad de germinación de *Epidendrum radicans*.

Termino	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
A: Medio	2	0.3470055	0.1735028	0.17	0.841124
B: Concentración	3	11.11823	3.706078*	3.72	<b>0.024967*</b>
AB	6	2.022083	0.3370139	0.34	0.909615

\* Resultados significativos en alfa = 0.05

En el índice de germinación no se encontraron diferencias significativas, pero se observa una tendencia marcada en las concentraciones Tabla (13).

Tabla 13. ANOVA con respecto al índice de germinación de *Epidendrum radicans*.

Termino	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
A: Medio	2	77447.66	38723.83	0.68	0.515436
B: Concentración	3	424730.8	141577	2.49	0.084434
AB	6	128359.4	21393.24	0.38	0.886725

### 9.4.3 Germinación *in vitro* de *Laelia anceps*

La germinación de *Laelia anceps*, se logró en el **medio Mínimo** con las diferentes concentraciones de ANA Figura (14). Las semillas iniciaron su germinación a partir del día 26 en el medio Mínimo con 1.0 mg/L de ANA, el día 27 en las concentraciones de 0.0 y 0.1 mg/L de ANA y en el día 28 en la concentración de 3.0 mg/L de ANA Figura (15). El porcentaje de semillas germinadas de *L. anceps* en el medio mínimo a los 90 día fueron de 43, 39, 37, y 40 % para las concentraciones de 0.0,0.1, 1.0 y 3.0 mg/L de ANA respectivamente Figura (16).

En el **medio MS** bajo las diferentes concentraciones de ANA Figura (14) las semillas germinaron, a partir del día 16 en el medio MS con 0.1 mg/L de ANA, con 0.0 mg/L de ANA la germinación inició el día 17, el día 20 con 1.0 mg/L de ANA y el día 21 en la concentración de 3.0 mg/L de ANA Figura (15). El porcentaje de germinación logrado al día 90, fue del 8, 29, 4, y 8 % respectivamente a las concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L de ANA Figura (16).

En el **medio Knudson C** los resultados de germinación en las cuatro concentraciones de ANA se muestran en la Figura (14). Germinaron al día 31 en las concentraciones de 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L de ANA, iniciando la germinación más tarde a los 34 días en la concentración de 0.0 mg/L de ANA Figura (15). El porcentaje de germinación en las concentraciones de 0.0, 0.1,1.0 y 3.0 mg/L de ANA al día 90, fueron del 19, 29, 13, y 9 % respectivamente Figura (16).

La germinación de *Laelia anceps* se logró en los doce tratamientos con la etapa 3 de desarrollo, de los cuales el **medio MS** en concentraciones de 0.0 y 0.1 mg/L de ANA alcanzaron la etapa 4, de estos únicamente en la concentración de 0.1 mg/L de ANA se alcanzó la etapa 5 de desarrollo Tabla (14).

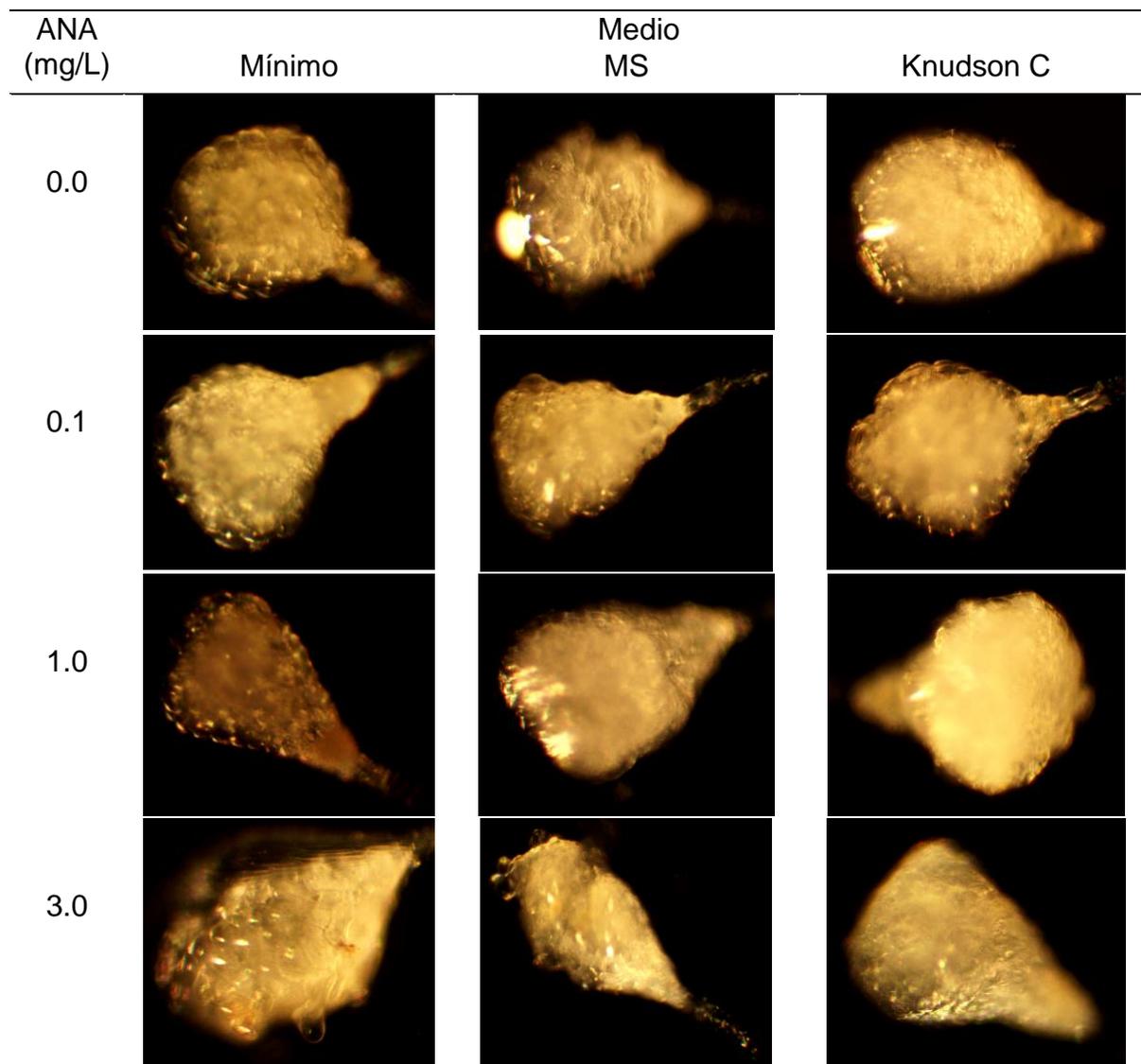


Figura 14. Semillas germinadas de *Laelia anceps*. Las fotografías fueron tomadas con cámara Omax A35100U en microscopio óptico a 100 diámetros.

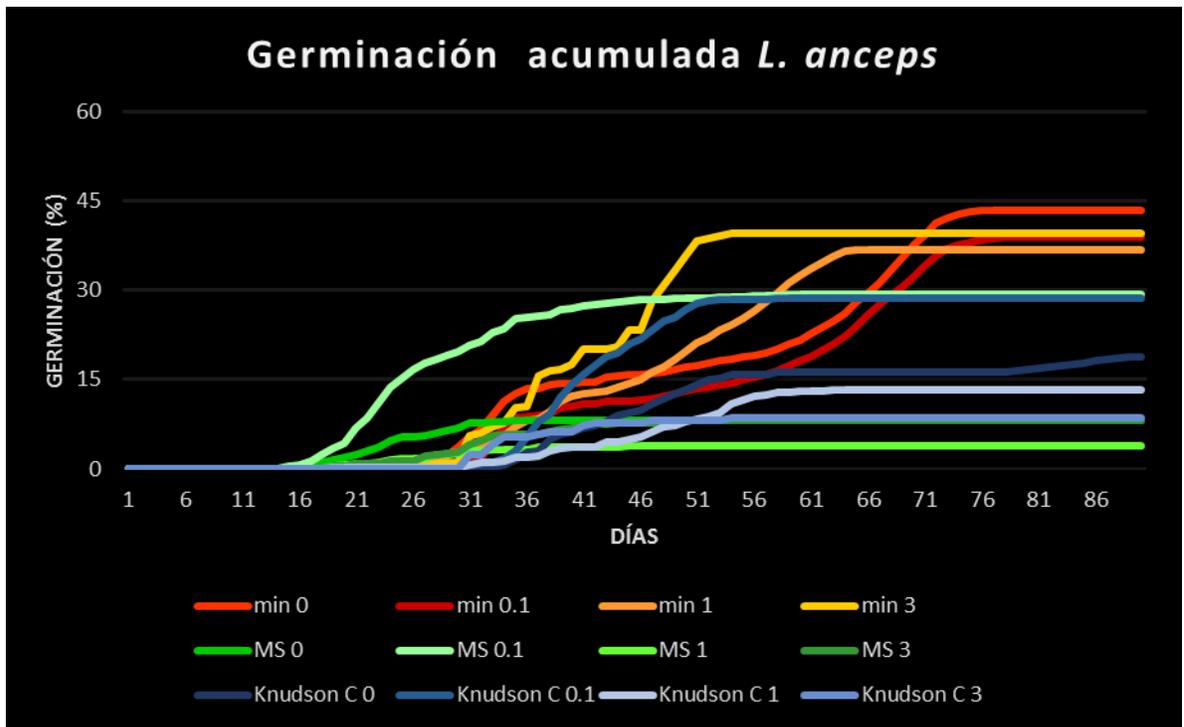


Figura 15. Germinación acumulada de *Laelia anceps* a través del tiempo en los medios Mínimo, MS y Knudson C, con las diferentes concentraciones de ANA.

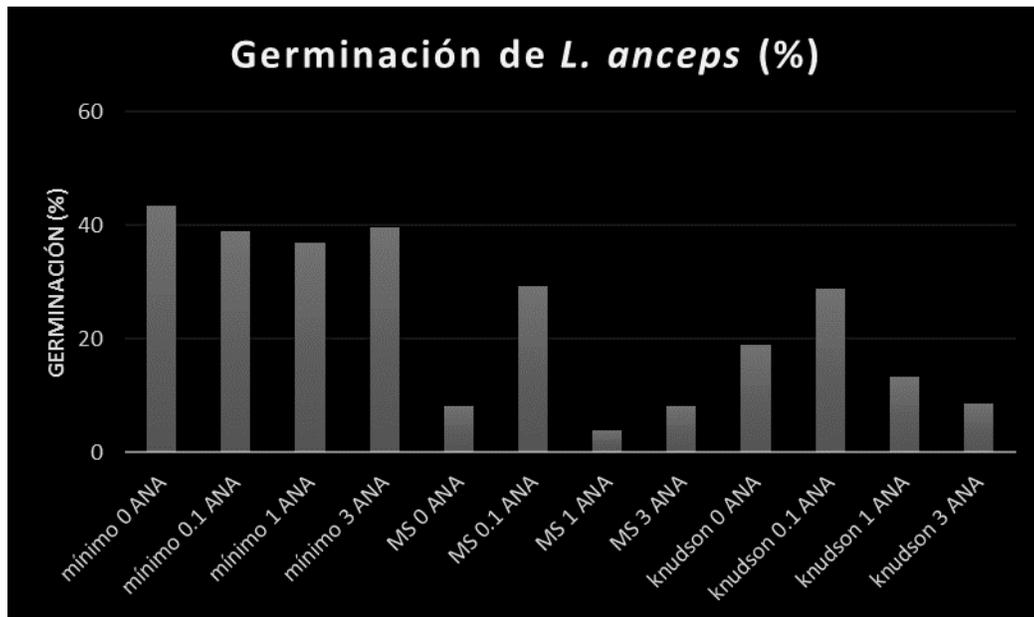


Figura 16. Porcentaje de germinación promedio de *Laelia anceps*. Las barras oscuras indican el porcentaje de semillas germinadas.

Tabla 14. Etapas de desarrollo alcanzadas en *Laelia anceps* hasta febrero del 2017, en tres experimentos realizados por triplicado.

Medio	Experimento	Etapa de desarrollo				
		1 Hidratación	2 Protocormo	3 Germinación	4 Primordio foliar	5 Hojas
Mínimo 0.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Mínimo 0.1	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Mínimo 1.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Mínimo 3.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
MS 0.0	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	
	1	█	█	█	█	
MS 0.1	3	█	█	█	█	
	2	█	█	█	█	█
	1	█	█	█	█	█
MS 1.0	3	█	█	█		
	2	█				
	1	█				
MS 3.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Knudson C 0.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Knudson C 0.1	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Knudson C 1.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		
Knudson C 3.0	3	█	█	█		
	2	█	█	█		
	1	█	█	█		

Los resultados de la velocidad e índice de germinación obtenidos de los experimentos realizados se muestran en la Tabla (15), donde la velocidad de germinación más alta alcanzada se logró en el medio MS con una concentración de 0.1 mg/L de ANA y la menor velocidad de germinación en el medio Knudson C con la concentración de 3.0 mg/L de ANA. En el índice de germinación el mayor resultado se logró en el medio Mínimo con 1.0 mg/L de ANA y el menor índice de germinación en el medio MS con la concentración de 1.0 mg/L de ANA.

Tabla 15. Velocidad e índice de germinación de *Laelia anceps*. La tabla muestra el promedio y desviación estándar de la media, de la velocidad e índice de germinación.

<i>L. anceps</i>		
Medio, ANA mg/L	Promedio	
	Velocidad de germinación	Índice de germinación
Mínimo 0.0	28.37 ± 33.30	322.48 ± 332.89
Mínimo 0.1	25.60 ± 34.37	295.63 ± 311.13
Mínimo 1.0	41.97 ± 55.74	<b>357.43 ± 251.31</b>
Mínimo 3.0	6.57 ± 8.29	171.63 ± 86.02
MS 0.0	3.19 ± 5.49	26.07 ± 34.66
MS 0.1	<b>46.02 ± 58.22</b>	263.00 ± 214.81
MS 1.0	2.65 ± 4.59	<b>24.10 ± 32.13</b>
MS 3.0	3.18 ± 2.91	48.36 ± 32.24
Knudson C 0.0	12.38 ± 12.11	136.71 ± 39.43
Knudson C 0.1	12.36 ± 10.71	201.80 ± 134.53
Knudson C 1.0	11.55 ± 17.78	106.64 ± 103.51
Knudson C 3.0	<b>2.16 ± 3.74</b>	70.78 ± 94.37

#### 9.4.3.1 Análisis estadísticos de *Laelia anceps*

Con respecto al porcentaje de germinación de *Laelia anceps* se observó que varió significativamente tanto entre concentraciones como entre medios ( $P's < 0.0001$ ), y dichas diferencias dependen del medio a analizar, esto de acuerdo con el resultado significativo ( $P < 0.0001$ ) de la interacción.

Para esta especie el mayor porcentaje de germinación se observó en la concentración 0.1 mg/L de ANA, Tabla (9) y en el **medio Mínimo** Tabla (10); en la interacción de la concentración y medio de cultivo, el mayor porcentaje de germinación se observó en la concentración 3.0 mg/L ANA del medio Mínimo Tabla (11).

Con respecto a la velocidad de germinación no se observó ninguna variación significativa entre concentraciones ni entre medios, pero se puede observar que hay una mayor influencia de las concentraciones Tabla (16).

Tabla 16. ANOVA con respecto a la velocidad de germinación de *Laelia anceps*.

Termino	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
A: Medio	2	1658.481	829.2407	1.05	0.366555
B: Concentración	3	2676.776	892.2585	1.13	0.358174
AB	6	3622.893	603.8155	0.76	0.606563

No se encontraron diferencias significativas respecto al índice de germinación, pero se observó una mayor influencia dada por los medios de cultivo Tabla (17).

Tabla 17. ANOVA con respecto al índice de germinación de *Laelia anceps*.

Termino	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
A: Medio	2	259881.8	129940.9	2.43	0.109132
B: Concentración	3	111806.4	37268.79	0.70	0.562542
AB	6	95031.19	15838.53	0.30	0.932550

## 9.5 Microscopia electrónica

La microscopia electrónica de barrido se utilizó para analizar detalladamente la morfología microestructural de las semillas de *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps* y posterior desarrollo y crecimiento del embrión con una mayor claridad, mostrando las diferentes etapas de desarrollo. Las muestras fueron tomadas de los medios de cultivo como se detalla a continuación:

***Cuitlauzina pendula*** las muestras fueron extraídas del medio Mínimo con 0.0 mg/L de ANA.

***Epidendrum radicans*** las muestras fueron extraídas del medio Knudson C con 0.0 mg/L de ANA.

***Laelia anceps*** las muestras con los primeros 3 estadios de desarrollo fueron extraídas del medio Mínimo con 0.0 mg/L de ANA y los estadios 4 y 5 fueron extraídos del medio MS con 0.1 mg/L de ANA.

### 9.5.1 Microscopia electrónica de *Cuitlauzina pendula*

Se obtuvieron imágenes en muestras frescas de cada una de las etapas de desarrollo alcanzadas, para evidenciar cambios morfológicos de *Cuitlauzina pendula* a continuación se describe la morfología de cada una de las etapas alcanzadas para esta especie:

**Etapa 1.** Hidratación. Las semillas tienen forma fusiforme y una abertura en el lado basal, la testa de la semilla es reticulada la cual envuelve al embrión y está formada por células alargadas convexas, con paredes celulares anticlinales lisas o ligeramente onduladas y alargadas por encima de la superficie de la semilla Figura (17a), se sigue la terminología de Barthlott (1976), las células adyacentes de las paredes anticlinales no están fusionadas y sobresalen de la superficie de la semilla a medida que las paredes periclinales externas se hunden al interior, y una bifurcación indica su origen a partir de dos células diferentes. Esta bifurcación es más prominente en las esquinas de las células (donde se reúnen tres células), y luego se desarrolla como una cavidad triangular significativa Figura (17b).

Las células de la testa en la porción media de las semillas son generalmente alargadas, mientras que las células en ambos extremos de la semilla son frecuentemente más pequeñas e irregulares.

**Etapa 2.** Protocormo. Se puede observar el marcado crecimiento del embrión que rompe con la integridad de la testa, dejando ver parte de la estructura del mismo. La

estructura de las paredes anticlinales se hace más evidente con el crecimiento del embrión, al igual que la abertura de la parte basal de la testa Figura (18).

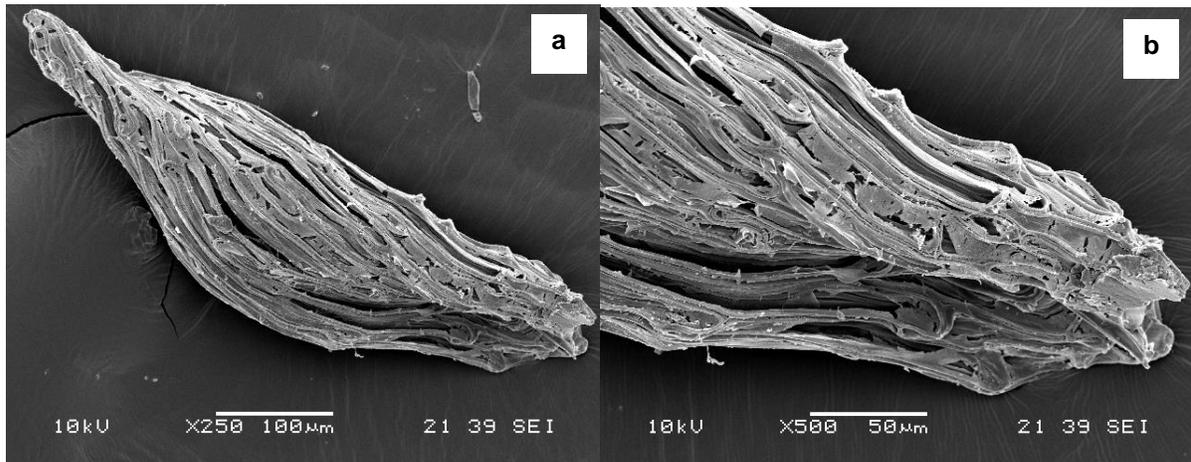


Figura 17. Semilla de *Cuitlauzina pendula*. **a)** Etapa 1 de desarrollo, **b)** acercamiento al extremo basal de la semilla, la fotografía fue tomada con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

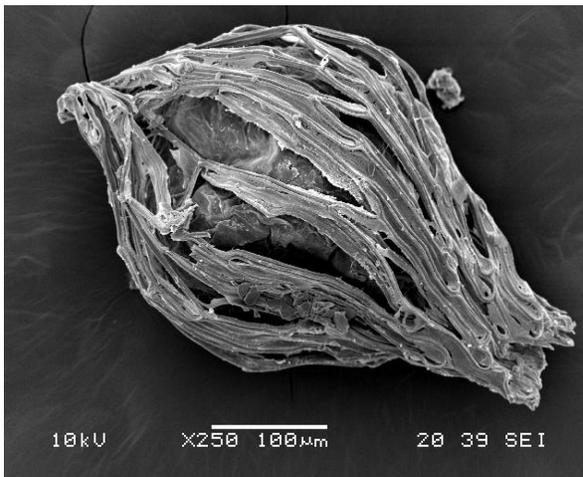


Figura 18. Semilla de *Cuitlauzina pendula* en etapa 2 de desarrollo, la fotografía fue tomada con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

### 9.5.2 Microscopia electrónica de *Epidendrum radicans*

**Etapa 1.** Hidratación. Las semillas tienen forma fusiforme, en la que se puede observar la testa reticulada, la cual envuelve al embrión Figura (19a), las células de la testa son alargadas rectangulares o pentagonales Figura (19b). Las paredes anticlinales de las células adyacentes no están fusionadas y sobresalen de la superficie de la semilla a medida que las paredes periclinales externas se hunden al interior, y una bifurcación indica su origen a partir de dos células diferentes. Esta bifurcación es más prominente en las esquinas de las células (donde se reúnen tres células), y luego se desarrolla como una concavidad triangular. Las paredes periclinales son rectas o ligeramente onduladas y prominentes. Las células de la testa en la proporción media de la semilla son alargadas mientras que las células de la testa en los extremos basal y apical de la semilla son frecuentemente isodiamétricas e irregulares. La testa tiene una abertura en el extremo basal.

**Etapa 2.** Protocormo. Se puede determinar el crecimiento del embrión ya que rompe la integridad de la testa en la parte media de la semilla y los extremos basal y apical de ésta permanecen íntegros Figura (19c).

**Etapa 3.** Germinación. El protocormo se encuentra fuera de la testa, se puede observar el cuerpo esférico de éste, y algunas células empiezan a diferenciarse Figura (19d).

**Etapa 4.** Primordio foliar. Las células apicales del protocormo están bien diferenciadas y empiezan a elongarse Figura (19e).

**Etapa 5.** Hojas. Se pueden observar hojas bien diferenciadas saliendo de la parte apical del protocormo Figura (19f).

### 9.5.3 Microscopia electrónica de *Laelia anceps*

**Etapa 1.** Hidratación. Las semillas tienen forma fusiforme, en la que se puede observar la testa reticulada que envuelve al embrión (figura 20a), las células de la testa son alargadas, rectangulares o en forma de tubo, en la parte media mientras que las células en los extremos de la semilla son isodiamétricas e irregulares, con el extremo basal abierto. Las paredes anticlinales de las células adyacentes están fusionadas y sobresalen de la superficie de la semilla a medida que las paredes periclinales externas se hunden. La fusión de las paredes anticlinales no es completa, y una bifurcación indica su origen a partir de dos células diferentes. Es más prominente en las esquinas de las células (donde se reúnen tres células), y luego se desarrolla como una concavidad triangular significativa. Las paredes periclinales son lisas o ligeramente onduladas Figura (20b).

**Etapa 2.** Protocormo. El crecimiento del embrión rompe la integridad de la testa en la parte media de la semilla y los extremos basal y apical de ésta permanecen íntegros, Figura (20c).

**Etapa 3.** Germinación. El protocormo se encuentra fuera de la testa, y se pueden observar su forma cónica Figura (20d).

**Etapa 4.** Primordio foliar. Las células de la parte apical del protocormo están bien diferenciadas en primordios foliares Figura (20e).

**Etapa 5.** Hojas. Las hojas crecen opuestas y a cierta distancia entre si, delimitando el punto vegetativo del protocormo Figura (20f).

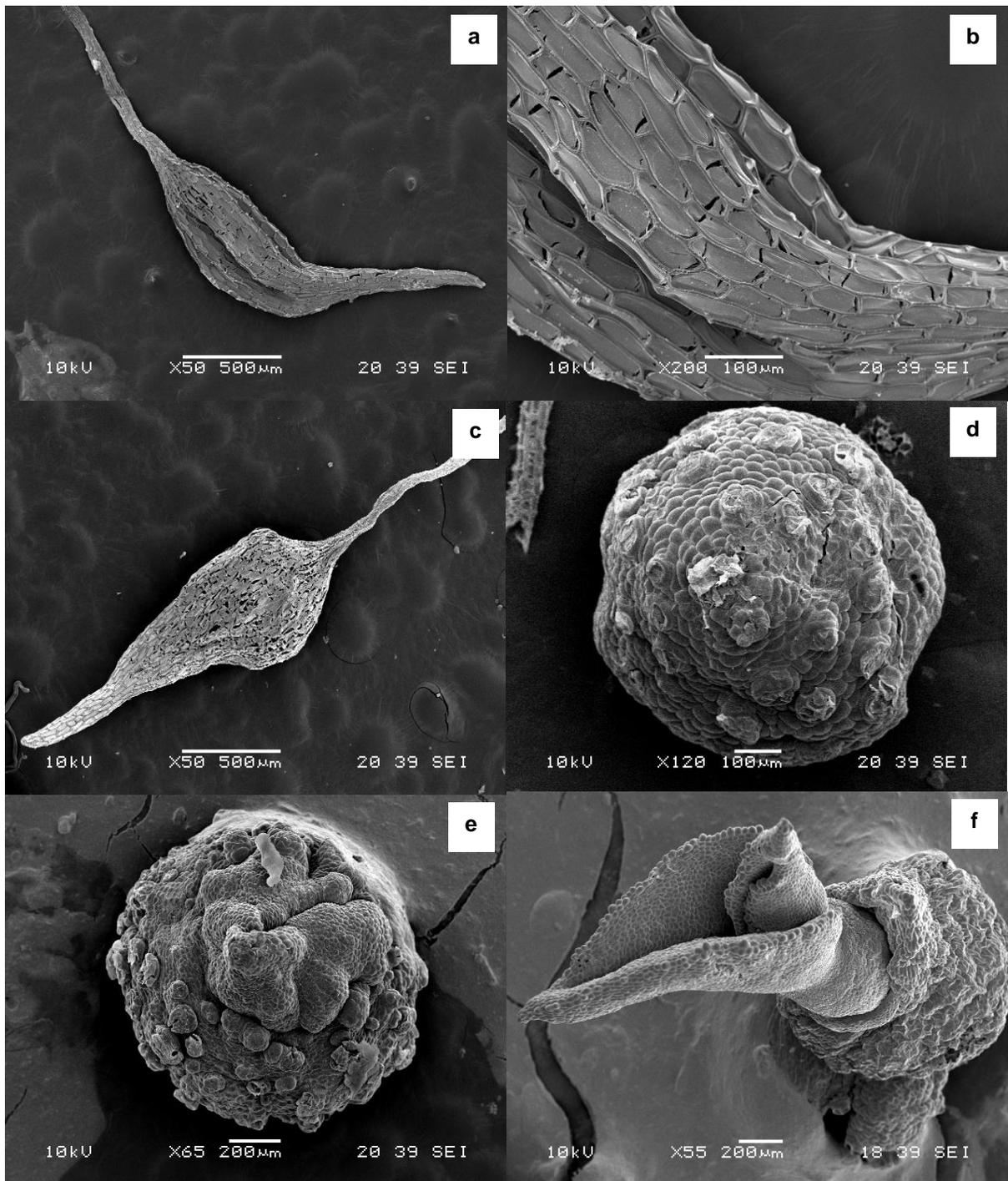


Figura 19. *Epidendrum radicans*. a) semilla en etapa 1 de desarrollo, b) acercamiento a la semilla, c) protocormo en etapa 2 de desarrollo, d) protocormo en etapa 3 de desarrollo, e) protocormo en etapa 4 de desarrollo, f) protocormo en etapa 5 de desarrollo. Las fotografías fueron tomadas con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

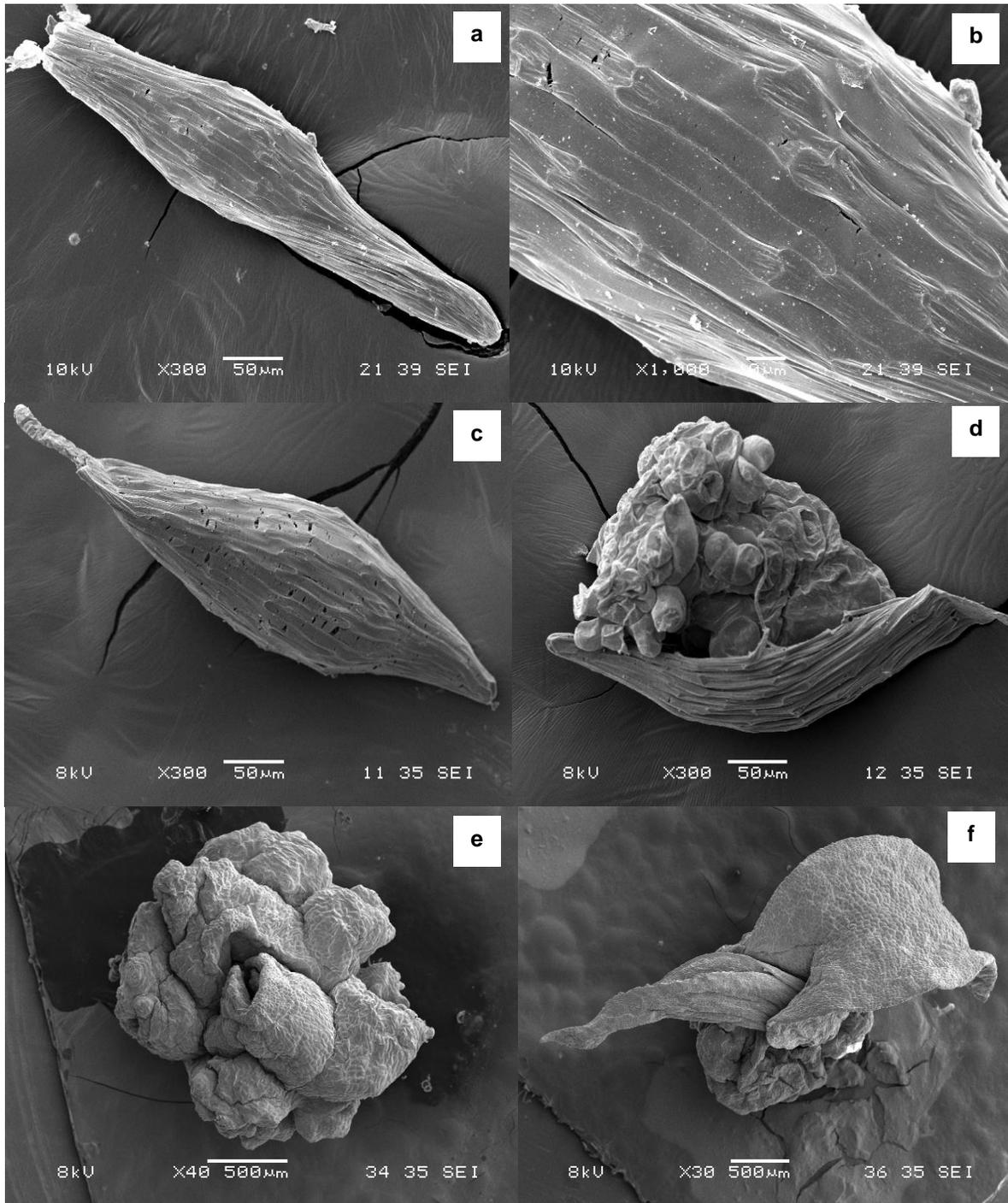


Figura 20. *Laelia anceps*. a) semilla en etapa 1 de desarrollo, b) acercamiento a la semilla, c) protocormo en etapa 2 de desarrollo, d) protocormo en etapa 3 de desarrollo, e) protocormo en etapa 4 de desarrollo, f) protocormo en etapa 5 de desarrollo. Las fotografías fueron tomadas con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

## X Discusión

Las semillas de orquídeas requieren de una metodología especial para lograr bajo condiciones *ex situ* su germinación, esto implica el uso de medios de cultivo adicionados con minerales, carbohidratos, reguladores de crecimiento y un agente hidratante. Esta metodología aún más requiere de asepsia y de la presencia o no de un simbionte, que particularmente en este estudio se realizó de manera asimbiótica. Es así que, bajo condiciones de laboratorio, se lograron germinar dos de las tres especies estudiadas: *Laelia anceps* y *Epidendrum radicans* bajo diferentes concentraciones de ácido naftalen-acético y tres medios de cultivo distintos: medio Mínimo, Knudson C, y Murashige y Skoog. No se logró la germinación de *Cuitlauzina pendula* salvo activar el embrión hasta su segunda etapa según (Mitchell, 1989).

Para lograr el éxito germinativo de una semilla es necesario conocer la morfología, la fisiología, su histoquímica y su ultraestructura, factores que se abordaron para cada una de las especies en este estudio. Lograr la germinación de las especies requirió conocer las semillas en cada una de estas áreas a fin de que al colocarlas bajo las condiciones *in vitro* las semillas estuviesen en condiciones de viabilidad, con los nutrimentos adecuados tanto de minerales como de carbohidratos, como lo señalan estudios previos para este grupo de plantas, particularmente para la germinación asimbiótica y con ello contribuir a la conservación de las orquídeas (Knudson, 1946; Murashige y Skoog, 1962; Arditti 1992; 2008).

## 10.1 Prueba de viabilidad

Las pruebas de viabilidad realizadas para las tres especies fueron la modificación realizada por Hosomi y col (2011), donde se aplicó un pretratamiento con sacarosa al 10 %, lo cual demostró claramente que había viabilidad en las semillas y que a lo largo de la experimentación fue disminuyen con el tiempo para las tres especies: *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*. Lallana y García (2013) mencionan que el pretratamiento con sacarosa no permite mejorar la lectura de la viabilidad de la prueba de tetrazolio por lo que no recomiendan su uso en semillas de *Trichocentrum jonesianum*. Contrario a los trabajos de Hosomi y col. (2011; 2012) donde el pretratamiento de sacarosa aplicado a las semillas de orquídeas de *Cattleya*, mostraron una buena tinción de los embriones indicando posiblemente que la sacarosa activa las vías metabólicas de las células que pueden contribuir al desarrollo de las plantas. En este estudio se observaron de la misma manera que Hosomi y col. (2011) que las semillas viables presentaron tinción roja mientras que las no viables se ubicaron en dos categorías, las que no se tiñeron y las que no contenían embrión.

La ausencia de embriones dentro de las testas para el grupo de las orquídeas se ha visto que se presenta con frecuencia, ejemplo de esto son el trabajo de Santos y col. (2005) donde reportan semillas sin embrión en frutos de *Laelia albida*, debido posiblemente a factores ecofisiológicos y de variabilidad genética; y el trabajo de Ávila y col. (2006) que atribuyen la ausencia de embriones en semillas de *Laelia speciosa* debido al apareamiento mixto, probablemente por

incompatibilidad de gametos. Sin embargo, las semillas sin embriones o con baja viabilidad, en general, son comunes en esta familia *Orchidaceae*, por lo que poner a prueba la calidad fisiológica de las semillas antes de la conservación es de gran importancia (Hosomi, *et al.*, 2011).

El realizar pruebas de viabilidad a las semillas de orquídea tiene el objetivo de poder considerar si éstas se pueden conservar y/o cultivar (Thornhil y Koopowitz, 1992; Vujanovic, *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2003; Salazar y Gélvez, 2015). Es así, que se puede evitar el cultivo de semillas vanas como lo realizaron Aguilar y López (2013) al tener resultados de germinación negativos en semillas maduras de *Laelia speciosa*.

En los resultados de la prueba de viabilidad aplicada a las tres especies en estudio, *L. anceps* fue la que presentó el mayor porcentaje de viabilidad de las tres especies lo que sugiere la existencia de diferencias fisiológicas entre *C. pendula* y *E. radicans* o quizás que estas diferencias en los porcentajes de viabilidad se deban al tiempo de almacenamiento de cada una de las especies, que para *C. pendula*, las semillas ya tenían 18 meses de almacenamiento al realizar la primera prueba de viabilidad, en la segunda prueba tenían 19 meses y para la tercera prueba las semillas tenían 21 meses de almacenamiento, las semillas de *E. radicans* tenían tan sólo 1, 2 y 4 meses de almacenamiento y *L. anceps* 3, 4 y 6 meses de almacenamiento. Debemos considerar que las semillas de orquídea son ortodoxas, tolerantes a la desecación y como tales son fisiológicamente afectadas por las condiciones en las que son almacenadas

(Pritchard y Prendergast, 1989; Pritchard y Seaton, 1993), por lo que el mantenimiento adecuado de los procesos vitales de semillas en reposo asegura su máxima viabilidad (Stanley y Butler, 1961). Thornhill y Koopowitz (1992) mencionan que el control de la temperatura y el contenido de agua en las semillas afecta la preservación de semillas de varias especies de orquídeas. Sin embargo, cada especie puede actuar de manera diferente si bien ésta pudiera ser una causa de los resultados de la baja viabilidad, o bien simplemente debido al envejecimiento de las mismas, ya que el envejecimiento es un factor que por lo general disminuye la viabilidad en las semillas (Stanley y Butler, 1961; Pardo y Ferreira, 2006). Algunos ejemplos de pérdida de viabilidad por envejecimiento son el de *Maxillaria picta* y *Cattleya labiata*, que en dos años y medio casi pierden por completo la viabilidad (Pardo y Ferreira, 2006). Para las especies *Cyrtopodium paludicolum* y *Schomburgkia crispa* Mello (2001) observó que el porcentaje de germinación cayó a valores de entre 20 y 40 % después de 360 días de almacenamiento.

La pérdida de viabilidad también ha sido reportada, para muchas otras especies un ejemplo de ello es el trabajo de Enríquez y col. (2004) donde destacan una reducción drástica de viabilidad después de dos años de almacenamiento en semillas de *Taxodium mucronatum*. Aunque como Berjak y Pammenter (2007) mencionan, son varios los factores que pueden afectar la viabilidad de las semillas de orquídea y, así como de otras especies, no hay que olvidar que

incluso en condiciones ideales, las semillas almacenadas tienen una vida útil prolongada pero no infinita.

## 10.2 Tamaño de las semillas

En 1979 Arditti y colaboradores propusieron una relación entre volumen y tamaño de las semillas, según ellos, el volumen de la semilla y el tamaño de la semilla son directamente proporcionales entre sí. Calevo y colaboradores (2017), reportaron una relación positiva significativa entre el tamaño de la semilla y el tamaño del embrión, ya que las semillas más grandes contenían embriones más grandes. En este trabajo también se coincide con los reportes anteriores, con resultados de tamaño bajos en *Laelia anceps* que fue la semilla más pequeña (con un largo de testa de 0.45 mm y 0.23 mm de largo de embrión) y resultados de tamaño más grandes en *Epidendrum radicans* (3.24 mm y 0.39 mm de largo de testa y embrión respectivamente), pero con respecto a la relación volumen del embrión y volumen de la testa ( $V_e/V_t$ ) los resultados obtenidos fueron contrarios a lo reportado, dándonos resultados de 0.85 y 0.68 para las semillas de *Cuitlauzina pendula* y *Laelia anceps*, mientras que en *Epidendrum radicans* se obtuvo un resultado de 0.06 en la relación  $V_e/V_t$  de las semillas, resultados muy por debajo de las otras dos especies. Es decir, hay mayor espacio aéreo en las semillas de *Epidendrum radicans* que en las de *Cuitlauzina pendula* y *Laelia anceps*, el cual les proporciona a las semillas una mayor flotabilidad,

debido a que la disminución del volumen embrionario aumenta el espacio aéreo, dando como resultado menos peso de semilla y la dispersión a largas distancias (Arditti, *et al.*, 1979; Augustine, *et al.*, 2001; Dangat y Gurav, 2016).

El tamaño de las semillas en este estudio vario de 0.45 mm en *L. anceps* a 3.24 mm de largo en *E. radicans*, estando dentro del rango de largo marcado en semillas de orquídea por Arditti y Ghani (2000). De acuerdo con las mediciones obtenidas, se puede decir que *E. radicans* presenta semillas notablemente más grandes que *C. pendula* y *L. anceps*. El tamaño promedio en semillas de *Cuitlauzina pendula* de largo fue de 0.48 mm, que coincide con el largo de *Pholidota pallida* (Swamy, *et al.*, 2004), y de ancho 0.18 mm, que coincide con el ancho en semillas de *Corallorhiza maculata* y *Corallorhiza striata* (Arditti, *et al.*, 1980); el largo del embrión fue de 0.26 mm, coincidiendo en largo de embrión de *Cypripedium acuaule* (Arditti, *et al.*, 1979), y el ancho fue de 0.16 mm, coincidiendo en con la medida de embrión en *Epipactis gigantea* (Arditti, *et al.*, 1980).

El largo promedio en semillas de *Epidendrum radicans* fue de 3.24 mm, el cual se acerca al tamaño de 3.38 mm en *Lecanorchis* (Arditti y Ghani, 2000), y de ancho 0.48 mm, que coincide con el largo promedio de testa en *C. pendula* y es 0.03 mm más ancha que las semillas de *Catasetum* que miden de ancho 0.45 mm (Arditti y Ghani, 2000); el largo del embrión fue de 0.39 mm y el ancho fue de 0.24 mm, esta última medida parecida al de *Goodyera pubescens* con 0.25 mm (Arditti y Ghani, 2000). Según Veyret (1965) el embrión de *Epidendrum radicans* es uno de los más diferenciados histológicamente.

El tamaño promedio en semillas de *Laelia anceps* de largo fue de 0.45 mm, y de ancho 0.11 mm, que coincide con el ancho en semillas de *Eria dalzellii* (Swamy, et al., 2004), *Goodyera oblongifolia*, *Goodyera tessellata* (Healey, et al., 1980) y *Chloraea philippii* (Lallana, et al., 2016); el largo del embrión fue de 0.23 mm, coincidiendo en largo con *Corallorhiza maculata*, *Epipactis palustris*, *E. atrorubens* (Arditti, et al., 1980), *Cypripedium montanum* (Arditti, et al., 1979) y el ancho fue de 0.09mm, coincide con el ancho de especies como: *Goodyera oblongifolia*, *G. repens* (Healey, et al., 1980), *Corallorhiza striata* (Arditti, et al., 1980) y *Dendrobium crepidatum* (Tongbram, et al., 2012).

### 10.3 Características histoquímicas de las semillas

Las diferencias de los depósitos de lípidos proteínas y carbohidratos en las semillas de las tres especies, se evidenciaron con mayor o menor coloración en diferentes regiones en cada una de las especies, estando de acuerdo con la conclusión a la que llego Aybek (2014), de que, aunque no hay información sobre la relación entre el material del depósito y las propiedades del metabolismo de la germinación, tales diferencias de depósitos en orquídeas afectarán potencialmente a su fisiología y metabolismo de germinación.

En las pruebas histoquímicas realizadas en las semillas de *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps* se observó la presencia de carbohidratos, lípidos y proteínas al igual que lo que observó en los embriones de *Himantoglossum robertianum* Aybek (2014). La diferencia de los resultados obtenidos en este estudio y los de Aybek (2014), radica en las soluciones utilizadas para la observación de estos, mientras que éste utilizó Ácido Peryódico-Reactivo de Schiff (PAS) con azul de toluidina O, para teñir carbohidratos, rojo neutro-rodamina B para lípidos y fluorescencia azul de Evans para observar proteínas, en muestras fijas para la observación en microscopio electrónico de barrido. En el presente trabajo se utilizó: azul de Coomassie y eosina para teñir proteínas, Lugol y Cristal violeta para teñir carbohidratos y Sudan III para observar lípidos, en material fresco para la observación en microscopio óptico. La ventaja de la metodología aquí utilizada es la rapidez con la que se pueden realizar las tinciones, y la posibilidad de poder trabajar con material fresco para su posterior observación al microscopio óptico.

Doria (2010) mencionó que las reservas energéticas de la semilla son lípidos, carbohidratos y en ocasiones proteínas, que sostendrán a la futura planta durante sus primeras etapas de vida y estas reservas pueden encontrarse en diferentes zonas del mismo, lo cual se relaciona con la futura germinación y desarrollo del nuevo individuo. Existen varias metodologías histoquímicas para la detección de carbohidratos, lípidos y proteínas, en vegetales, sin embargo, son muy pocos los estudios que se han dirigido a investigar la histoquímica de las semillas de

orquídeas, debido a que trabajar con ellas se dificulta debido a su pequeña morfología (Aybeke, 2014).

Hosomi y col. (2012), mencionan el contenido de lípidos en las semillas de las orquídeas. Gallo y col. (2016) trabajando con semillas de especies tropicales de la subtribu Laeliinae (*Cattleya loddigesii*, *Cattleya tigrina*, *Handrolaelia purpurata*, *Schomburgkia gloriosa* y *Sophronitis cernua*) reportan, un bajo contenido de lípidos en células embrionarias. Arditti y Ghani (2000) indicaron que las reservas alimenticias en los embriones de orquídeas consistieron en gotas de aceite y granos de almidón a niveles no altos en términos absolutos, como en *Cypripedium calceolus*. Mayer y col. (2011) durante el desarrollo de *Oncidium flexuosum* observaron, que el embrión contenía sustancias proteicas como reservas e identificaron una sustancia lipofílica que cubrió el protodermo del embrión desde el inicio del desarrollo hasta la formación del embrión en la semilla madura, pero no observaron gránulos de almidón en el embrión, durante el desarrollo ni en la semilla madura. Lee y col. (2008) observaron en semillas maduras de *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* donde los principales productos de almacenamiento en células del embrión eran cuerpos proteicos y lipídicos.

## 10.4 Germinación asimbiótica

### 10.4.1 Germinación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*

*Cuitlauzina pendula* llega a mostrar bajo las condiciones probadas como principal respuesta la formación de protocormos, de la misma forma que lo reportaron Salazar y Mata (2003) para esta misma especie, con semillas maduras, obtenidas mediante polinización cruzada, que a diferencia del presente trabajo las semillas maduras se obtuvieron mediante geitogamia, ellos al igual que nosotros, sembraron las semillas en el medio Knudson C y cuando alcanzaron la fase de protocormo, los emplearon como fuente de explantes, cambiando a medio de cultivo: MS y utilizando como testigo medio Knudson C nuevamente, adicionado con una combinación factorial de N6-benciladenina en concentraciones de 0, 0.5, 1, 2 y 3 mg/L de BA y ANA (0, 0.1 y 0.5 mg/L), y obtuvieron cuerpos semejantes a protocormos, con medio MS adicionado únicamente con BA (0.5 mg/L), así como en ausencia de reguladores de crecimiento. Coello y col. (2010) desarrollaron un procedimiento para inducir brotes y raíces en las plántulas de *Guarianthe skinneri*, que parece ser un sinónimo de *Cuitlauzina pendula*, y de manera semejante. Salazar y Mata (2003) obtienen protocormos en cultivo *in vitro* derivados de semillas germinadas en medio MS complementado con sacarosa 30 g/dm<sup>3</sup>, myo-inositol 0.1 g/dm<sup>3</sup>, NaHPO<sub>4</sub> 0.05 g/dm<sup>3</sup> y 2.5 g/dm<sup>3</sup> de phytigel. Y posteriormente los protocormos fueron trasplantados al medio MS complementado con 6-benciladenina (0, 2.5 y 49 µM), ácido indol-3-acético (0, 5.7 y 17.1 µM), ácido naftalen-acético (0, 5.4 y 16.1 µM) y ácido giberélico

(0, 2.9 y 8.7  $\mu\text{M}$ ). Siendo el ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) el factor principal que controló la inducción y la elongación de los brotes y raíces con la más baja concentración.

Aunque para esta especie de *Cuitlauzina pendula* no se alcanzó la fase de germinación (protocormo fuera de la testa), el material obtenido puede ser utilizado como lo han hecho otros autores como fuente del explante (Salazar y Mata, 2003; Coello *et al.*, 2010). Utilizando como medio de cultivo Phytamax al 50 y 100 %, Pérez y col. (2014), obtuvieron la germinación de *Cuitlauzina pendula*, con un promedio de 15.5 y 16 % de germinación respectivamente sin el uso de reguladores del crecimiento.

#### 10.4.2 Germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans*

La germinación de *Epidendrum radicans* se obtuvo de los 16 a los 31 días de cultivo, similar a lo reportado por Rodríguez (2013), la cual reportó la germinación de esta misma especie entre los 14 y 35 días de cultivo. El máximo porcentaje de germinación alcanzado en este estudio fue del 48 % en el medio Knudson C adicionado con 0.1 mg/L de ANA. Jualang y col. (2014) reportaron el mismo porcentaje de germinación utilizando el mismo medio, pero con la concentración de 1.0 mg/L de ANA. en semillas de *Vanda dearei*; mientras que en este trabajo con esa concentración se obtuvo un porcentaje de germinación del 20 %. Dalzotto y Lallana (2015) obtuvieron resultados de germinación del 49 % utilizando el medio MS a la

mitad de su concentración en semillas de *Bipinnula pennicillata*. Por otra parte, se observó que aquellos medios que contenían 3.0 mg/L de ANA, no germinaron o germinaron muy poco y aunque su desarrollo llegó a alcanzar la etapa 3, posteriormente los protocormos perdieron la coloración y detuvieron su desarrollo. Por lo que se comprobó que esta concentración de 3.0 mg/L de ANA en semillas de *E. radicans*, sin importar el medio de cultivo, no es adecuada para la germinación y desarrollo de esta especie en particular. Contrario a la concentración de 0.1 mg/L de ANA con la que se obtuvieron los mayores porcentajes de germinación sin importar el medio de cultivo; aunque para el desarrollo de plántulas los medios MS con 0.0, 1.0 mg/L de ANA y Knudson C con 0.0 mg/L de ANA fueron los únicos en el que se alcanzara la quinta etapa de desarrollo (hojas).

Algunos de los resultados de germinación reportados para este género son: en *Epidendrum jameisonic*, el 99 % de germinación se obtuvo utilizando el medio MS adicionado con 8 g/L de carbón activado (Muños, 2011). En semillas de *Epidendrum radicans* Rodríguez, (2013) obtuvo 96 % de germinación utilizando el medio Superthrive. Santiago y col. (2015) reportaron la germinación de *Epidendrum falcatum* después de 35 días, con 100 % de germinación en medio MS basal adicionado con agua de coco al 10 % y obtuvieron 80 % de germinación en el tratamiento que solo contenía el medio MS.

### 10.4.3 Germinación *in vitro* de *Laelia anceps*

La germinación de *Laelia anceps* se presentó en todos los medios probados, pero fue en el **medio Mínimo** donde se obtuvieron los mayores porcentajes de germinación del 43, 39, 37 y 40 %, en las concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L de ANA respectivamente.

En el **medio MS** con 0.1mg/L de ANA a los 16 días, después de la siembra de las semillas de *L. anceps*, inicio la germinación al igual que lo reportado por Aguilar y López (2013) con semillas inmaduras de *Laelia speciosa* en medio MS sin regulador de crecimiento. Mientras que González (2014) observo la germinación de *Laelia speciosa* en el medio MS a los 40 días.

En este trabajo obtuvimos un bajo porcentaje de germinación del 4 % Utilizando **medio MS** con 1.0 mg/L de ANA; siendo este resultado el doble de lo obtenido por Lauzer y col. (2007) en semillas de *Aplectrum hyemale*, utilizando el medio MS adicionado con: tiamina HCl (5 mg/L), ácido nicotínico (10 mg/L), pantotenato de calcio (5 mg/L), kinetina (1 mg/L), ácido naftalen-acetic (0.1 mg/L), extracto de papa (1.2 g/L, Difco), dextrosa (19 g/L) y agar-Bacto (7 g/L, Difco).

Para *Laelia anceps* en el **medio Knudson C**, obtuvimos el inicio de la germinación a los 34 días después de la siembra. Contrastante con los resultados de inicio de germinación, obtenidos por Aguilar y López (2013) en *Laelia speciosa* después de 178 días, utilizando el mismo medio de cultivo.

El porcentaje de germinación obtenido en el medio Knudson C fue del 19 %. Mientras que Potisek y col. (1996) reportaron 62.5 % de germinación en éste mismo medio, pero con semillas de *Laelia rubescens*. Muñoz y Jiménez (2008) reportaron un bajo porcentaje de germinación (2.9 %) en *Phragmipedium humboldtii*, aún suplementado con 1 mg/L de tiamina, ácido nicotínico y piridoxina, 20 g/L de sacarosa y agar.

Si comparamos los medios de cultivo MS y Knudson C, sin el regulador de crecimiento en *Laelia anceps* los porcentajes de germinación fueron del 8 y 19 % respectivamente, siendo muy similares a los resultados reportados por Pedroza y Mican (2006) para la germinación de *Odontoglossum gloriosum*, en los mismos medios de cultivo, fueron del 2.57 y 19.23 % respectivamente. Es de notar que el medio mínimo favoreció la germinación para las semillas de *Laelia anceps*, es decir tan sólo requieren de ser hidratadas para lograr aparentemente su germinación, y el uso del característico medio Knudson C, especialmente formulado para la germinación de orquídeas no es el medio óptimo para esta especie (Arditti y Ernst, 1993).

## 10.5 Microscopia electrónica

La cubierta seminal de las semillas de orquídeas, presentan células muertas, vacías y generalmente transparentes; sus paredes pueden ser simples o diversamente ornamentadas y raramente muy gruesas y con una apertura en la base (Veyret, 1974; Arditti, *et al.*, 1979, 1980; Healey, 1980; Aybeke, 2014; Gallo, *et al.*, 2016).

Las semillas de las tres especies en estudio, son fusiformes como para la mayoría de las especies epífitas (Arditti, *et al.*, 1979; Gallo, *et al.*, 2016) estas mostraron una testa traslucida y reticulada al igual que especies de: *Laelia eyermaniana* (Nava, *et al.*, 2011), *Cattleya walkeriana* (Galdiano, *et al.*, 2014), *Himantoglossum robertianum* (Aybeke, 2014), *Cattleya loddigesii*, *Cattleya tigrina*, *Handrolaelia purpurata*, *Schomburgkia gloriosa* y *Sophronitis cernua* (Gallo, *et al.*, 2016); pero difieren en la estructura de las células, mientras que *Cuitlauzina pendula* tiene células alargadas convexas, con paredes celulares anticlinales lisas o ligeramente onduladas y alargadas por encima de la superficie de la semilla; *Epidendrum radicans* posee células de testa alargadas rectangulares o pentagonales con paredes anticlinales de las células adyacentes que sobresalen de la superficie de la semilla y las de *Laelia anceps* son alargadas, rectangulares o en forma de tubo, con paredes anticlinales de las células adyacentes fusionadas. Estas características son parecidas a las descritas por Kurzweil (1993), cuando estudió la morfología de 151 especies de *Orchidoideae* del Sur de África, encontrando dos tipos diferentes de semillas mediante microscopia electrónica de barrido: 1) En la mayoría de las especies las semillas son diminutas y fusiformes, la testa se compone de pocas células cóncavas

y alargadas con paredes celulares anticlinales rectas o ligeramente onduladas. 2) semillas tipo globo y testa con células convexas con paredes anticlinales onduladas.

En este estudio se identificaron cinco estadios de desarrollo; **el primero** (semilla hidratada) se dio en los doce medios de cultivo en las tres especies de estudio; **el segundo** estadio del protocormo en las tres especies, (protocormo dentro de la testa; en *C. pendula* y *E. radicans* es esférico mientras que el de *L. anceps* es cónico) no se logró en el medio MS en las concentraciones de 0.0 y 3.0 mg/L de ANA, únicamente en semillas de *C. pendula*; **el tercero** (protocormo fuera de la testa) no se alcanzó en las semillas de *C. pendula* así como en el medio Mínimo con 3.0 mg/L de ANA en *E. radicans*; **el cuarto** estadio (primordio foliar) no se logró en el medio Mínimo en concentraciones de 0.0 y 3.0 mg/L de ANA, como en la concentración de 3.0 mg/L de ANA del medio Knudson C en semillas de *E. radicans*; **el quinto** estadio de desarrollo (hojas diferenciadas) se logró en *E. radicans* en tres tratamientos, MS en las concentraciones de 0.0 y 1.0 mg/L de ANA y en el medio Knudson C con 0.0 mg/L de ANA, en *L. anceps* sólo alcanzó ésta etapa el medio MS con la concentración de 0.1 mg/L de ANA.

## XI Conclusiones

- La viabilidad de las semillas de las tres especies disminuye con el tiempo.
- La especie con semillas de mayor superficie es *Epidendrum radicans*, y comparativamente, el volumen del embrión ocupa el 6 % del volumen de la semilla.
- La especie con semillas de menor tamaño es *Laelia anceps*, y el embrión ocupa el 68 % del volumen de la semilla.
- Las técnicas histoquímicas empleadas en este estudio para las semillas de *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*, pueden facilitar encontrar rápidamente y de modo preciso carbohidratos, lípidos y proteínas, contenidas en las semillas.
- Las semillas de las tres especies contienen lípidos, proteínas y carbohidratos con una distribución característica, los cuales pueden ser una fuente de energía que apoya la germinación.
- Las semillas de *Cuitlauzina pendula* no germinaron, pero se pudo observar actividad metabólica con cambios morfológicos e incremento de masa en los embriones que puede ser utilizada como fuente de explante.
- El mejor medio y concentración para la germinación de *Epidendrum radicans* es el Knudson C con 0.1 mg/L de ANA.

- Los medios que llegan a la etapa 5 de desarrollo para *Epidendrum radicans* fueron el MS 0.0 y 1.0 mg/L de ANA y Knudson C 0.0 mg/L de ANA.
- El mejor medio y concentración para la germinación de *Laelia anceps* es el medio Mínimo con 3.0 mg/L de ANA,
- El medio MS con 0.1 mg/L de ANA, fue el único que alcanzó la etapa 5 de desarrollo en *Laelia anceps*.
- Las semillas de las tres especies presentan morfología fusiforme, testas transparentes con reticulaciones características para cada especie.
- *Laelia anceps* presenta protocormo cónico mientras que *Cuitlauzina pendula* y *Epidendrum radicans* presentan protocormo esférico.

## XII Referencias

Abdelnour E. A. 1999. Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 23:205-214

Abdelnour E. A., Alvarado U. C. 2013. Crioconservación de semillas y protocormos de especies de la familia *Orchidaceae* en peligro de extinción. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 1-105.

Abraham S., Augustine J., Dennis T. T. 2012. Asymbiotic seed germination and *in vitro* conservation of *Coelogyne nervosa* A. Rich. an endemic orchid Western Ghats. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 18:245-251.

Aguilar M. M. A., López E. A. L. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. 2: 18-24.

Arditti J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. United States. 691pp.

Arditti J. 2008. *Micropropagation of Orchids*. (2nd ed.) Blackwell, Cambridge. 756 pp.

Arditti J., Ernst R. 1993. *Micropropagation of orchids*. J. Wiley & Sons Inc. New York. 682pp.

Arditti J. 1993. Storage and longevity of orchid seeds. *Malayan Orchid Review* (Singapore) 27: 59-63.

Arditti J., Ghani A. K. A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*. 145:367-421.

Arditti J., Michaud J. D., Healey P. L. 1979. Morphometry of orchid seeds: I *Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. *American Journal of Botany* 66: 1128-1137.

Arditti J., Michaud J. D., Healey P. L. 1980. Morphometry of orchid seeds: II Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Corallorhiza* and *Epipactis*. *American Journal of Botany*. 67: 347-360.

Augustine J., Yogendrakumar., Sharma J. 2001. Orchids of India-II. Biodiversity and status of *Bulbophyllum* Thou. Daya publishing house, Trinagar, New Delhi. 99pp.

Ávila D. I., Salgado G. R. 2000. Un sistema de propagación masiva de *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter (*Orchidaceae*), como alternativa para la conservación. *Revista de la CIC/UMSNH, México*. 1: 27-30.

Ávila D. I., Salgado G. R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* No.8. San Nicolás de Hidalgo. 138-149.

Aybeke M. 2014. Morphological and histochemical investigations on *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge (*Orchidaceae*) seeds. *Plant Systematics and Evolution*. 300: 91-97

Barthlott W. 1976. Morphologie der Samen von Orchideen im Hinblick auf taxonomische und funktionelle Aspekte. En: Senghas K. (Ed.): Proc. 8<sup>th</sup> World Orchid Conference. Frankfurt. 444-455.

Baskin C. C., Baskin J. M. 2001. Seeds. ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press. San Diego, California, USA. 27-124

Bello-Bello J. J., García-García G. G., Iglesias-Andreu L. 2015. Conservación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. Revista Fitotec. Mex. 38: 165-171.

Benzing, D.H. 1990. Vascular Epiphytes. Cambridge University Press. 354pp.

Berjak P., Pammenter N. W. 2007. Recent progress towards the understanding of desiccation tolerance.17-27. En: Adkins S. W., Navie S. C., Ashmore S. (eds). Seeds: Biology, development and ecology. CAB International. 428pp.

Beutelspacher B. C. R. 2013. Guía de Orquídeas de Chiapas. Asociación Mexicana de Orquideología. México. 187pp.

Borges da Silva V. R., Tupac O. J., Correa P. M., Nogueira C. E. J. B. 2015. The epiphytic orchids *Ionopsis utricularioides* and *Psycmorchis pusilla* associate with different *Ceratobasidium* lineages at Valle del Cauca, Colombia. Acta Botanica Brasilica. 29: 40-44.

Buendía L. Y. O., Izquierdo S. L. L., Mendez F. J. E., Serrano H., García S. M. D. 2012. Prueba de Lakon en semillas de tres especies del género *Laelia* (*Orchidaceae*)

y un híbrido con 26 años de almacenamiento. V Congreso Mexicano de Cactáceas y Suculentas. Juriquilla, Qro. 19 –22.

Bustam B. M., Dixon K. W., Bunn E. 2014. *In vitro* propagation of temperate Australian terrestrial orchids: revisiting asymbiotic compared with symbiotic germination. Botanical Journal of the Linnean Society. 176: 556-566.

Calevo J., Giovannini A., Cornara L., Peccenini S., Monroy F. 2017. *Orchis patens* Desf.: seed morphology of an endangered Mediterranean orchid. Plant biosystems. 1-5.

Catling P. M., Greenwood E. W. 1988. Avispas y moscas encontradas en cápsulas de orquídeas. Orquídea.11: 277-279.

Cazarez F. T. L., Graciano L. J. J., Solís G. S., Díaz R. B., Nájera L. J. A., Montoya A.J. B. 2016. Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 67: 19-25.

Chase M. W., Hanson L., Albert V. A., Whitten W. M., Williams N. H. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). Annals of Botany 95:191-199.

Chávez K. H., Mosquera E. A. T., Otero O. J. T. 2015. Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. Acta Agronómica. 64: 125-13.

Chen Y., Goodale U. M., Fan X.-L., Gao J.-Y. 2015. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*. 3: 367-378.

Clements M. A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3: 73-86.

Coello Y. C., Miceli C. L., Orantes C., Dendooven L., Gutiérrez F. A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W. E. Higgins. *Gayana Botanica*. 67: 19-26.

CONABIO, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 341. Disponible en: [www.biodiversidad.gob.mx](http://www.biodiversidad.gob.mx)

CONABIO, 2010a. El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y oportunidades para su conservación y manejo sostenible. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D. F. México. 197pp.

CONABIO, 2010b Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad. México. 1970 - 1997 Disponible en: [www.conabio.gob.mx/](http://www.conabio.gob.mx/) consultado octubre 2017.

CONAFORT (Comisión Nacional Forestal). 2011. Manual para la propagación de orquídeas. 1-51. Disponible en: [www.conafor.gob.mx](http://www.conafor.gob.mx) consultado octubre 2017.

Cruz H. J. B., Luna R. B. S., Barba A. A. 2015. A novel seed baiting technique for the epiphytic orchid *Rhynchostele cervantesii*, a means to acquire mycorrhizal fungi from protocorms. *Lankesteriana*. 15: 67-76.

Dalzotto C. A., Lallana V. H. 2015. Efecto de la testa en la germinación *in vitro* de *Bipinnula pennicillata* (Rchb. F.) Sisternas & Salazar (*Orchidaceae*). *Investigación Agraria*. 17: 116-121.

Dangat B. T., Gurav R. V. 2016. Studies on seed morphometry of *Habenaria* species from Western Ghats, India. *Richardiana*. 174-188.

Darwin C. 1890. The various contrivances by which orchids are fertilised by insects. London: John Murray. 293pp.

Dearnaley J., Martos F., Selosse M. A. 2012. Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. En: Esser K., Hock B. (eds.), *The mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*. Springer. Berlin-Heidelberg. IX:207-230.

Demarco D. 2017. Histochemical analysis of plant secretory structures. En: Pellicciari C., Biggiogera (eds.). *Histochemistry of Single Molecules*. Springer Science+Business Media LLC. New York, USA. 313-330.

Díaz T. M. H. 2013. Manual de cultivo de orquídeas. Secretaría de Educación de Veracruz. Xalapa, Veracruz, México. 63.

Doria J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su reproducción conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*. La Habana, Cuba. 31:74-85.

Dressler R. L. 1981. *The orchids. Natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, and London, England. 22-141.

Dressler R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press. Portland, Oregon. 7-10.

Emeterio L. A., Palma L. V., Vázquez G. L. M., Mejía C. J. 2016. Uso y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del estado de México. *Polibotánica*. 42: 197-214.

Engelmann F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Engelmann, F. y Takagi, H. (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. International Plant Genetic Resources Institute. Roma, Italia. 8-20.

Enríquez P. E. G., Suzán A. H., Malda B. G. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Taxodium mucronatum* (Ten.) en el estado de Querétaro, México. *Agrociencia*. 38: 375-381.

Espejo S. A. 2012. El endemismo en las Liliopsidas Mexicanas. *Acta Botánica Mexicana* 100: 195-257.

Finch S. W., E., Leubner M. G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*. 171: 501-523.

Fisher D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*. 16:92-96.

Flores E. G., Legaria S. J. P., Gil V. I., Colinas L. M. T. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14: 347-353.

Frankel O. H., Soulé M. E. 1981 Conservation and Evolution. Cambridge University Press. 276pp.

Freuler M. J. 2008. Orquídeas. Albatros. Buenos Aires, Argentina. 10-37.

Galdiano R. F., Mantovani C., Gomes E. S., Gasparino E. C., Moro F. V., Lemos E.G. 2014. Seed germination morphology, and *in vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner under different culture media. *Comunicata Scientiae* 5: 456-463.

Gallo F. R., Souza L. A., Milaneze G. M. A., Almeida O. J. G., 2016. Seed structure and *in vitro* seedling development of certain Laeliinae species (*Orchidaceae*). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87: 68-73.

García C. J., Sánchez L. 1999. *Orchidaceae* II. *Epidendrum*. Flora de Veracruz. Fascículo 112. Instituto de Ecología, A. C. México. 1-9.

González C. L A. 2014. Tesis de Maestría: Propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* (*Orchidaceae*) nativa de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 75pp.

González D. S., Rivera C. L. E., Cuevas G. R. 2012. Incidencia de insectos depredadores sobre las orquídeas de la estación científica las joyas, jalisco, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*.329-339.

González Z. L., Orozco S. A. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda Brachystachya*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 58:15-30.

Groot S. P. C., Soeda Y., Van Der Geest A. H. M. 2007. Gene expression in relation to seed development and longevity. En: Navie S. C., Adkins S. W., Ashmore S. (eds.). *Seeds: Biology, Development and Ecology*. CAB international. London, UK. 28-38.

Hágsater E., Soto M., Salazar G. A., Jiménez R., López M., Dressler R. L. 2015. *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México. 302pp.

Halbinger F., Soto M., 1997. *Laelias* of Mexico. *Orquídea*. México. 51-76.

Harrison C. R., Arditti J. 1972. *Orquídea*. Asociación Mexicana de Orquideología A.C. México 4: 81- 89.

Hay F. R., Merritt D. J., Soanes J. A., Dixon K. W. 2010. Comparative longevity of Australian orchid (*Orchidaceae*) seeds under experimental and low temperatura storage conditions. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 164: 26-41.

Healey P. L., Michaud J. D., Arditti J. 1980. Morphometry of orchid seeds. III. Native California and related species of *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera* and *Spiranthes*. *American Journal of Botany*. 67: 508-518.

Hosomi S. T., Custodio C. C., Seaton P.T., Marks T. R., Machado N. N. B. 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (*Orchidaceae*) sedes following storage. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 48: 127-136.

Hosomi S. T., Santos R. B., Custodio C. C., Seaton P.T., Marks T. R., Machado N. N. B. 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*. 39: 178-189.

Hurtado, N. D. V., Merino M. M. E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México. 232.

Johansen D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGRAW-HILL COMPANY, Inc. New York and London. 49-94.

Jualang A. G., Devina D., Hartinie M., Sharon J. S., Roslina J. 2014. Asymbiotic seed germination and seedling development of *Vanda dearei*. Malaysian Applied Biology. 43: 25-33.

Kessler R., Stuppy W. 2012. Semillas. La vida en capsulas de tiempo. Ediciones Turner. 288.

Knudson L. 1922. Non symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette. 73: 1-25.

Knudson L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217.

Kurzweil H. 1993. Seed morphology in Southern African Orchidoideae (*Orchidaceae*). Plant Systematics and Evolution. 185: 229-247.

Lallana V. H., Billard C. E., Martínez V. A., García L. F., Barsanti M. V., Di Persia J. F., Dalzotto C., Scimpft K. M., De La Cruz V. 2016. Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos "*in vitro*". Ciencia, Docencia y Tecnología. Suplemento. 6: 94-121.

Lallana V. H., García L. F. 2013. Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). *Investigación Agraria*. 15: 129-132.

Lakon, G. 1949. The topographical Tetrazolium Method for Determining the Germination capacity of Seeds. *Plant Physiology*. 24: 389-394.

Lascuráin M., List R., Barraza L., Díaz P. E., Gual S. F., Maunder M., Dorantes J., Luna V. E. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En: *Capital natural de México*. Vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 517-544.

Lauzer D., Renaut S., St-Arnaud M., Barabé D. 2007. *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *Journal of the Torrey Botanical Society*. 134: 344-348.

Lee J., Lee H. 1991. Micropropagación de orquídeas a partir de semillas. *Boletín informativo de Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA) XXIV* 2:15-30

Lee Y.I., Yeung E.C., Lee N., Chung M. C. 2008. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. *Botanical Studies*. 49: 139-146.

Marden F. C. 2006. Vegetative propagation. *Orchids*. 340-347. (En línea). Disponible en: [www.aos.org](http://www.aos.org)

Martija O. M. 2007. *El gran libro de las orquídeas*. Vecchi. Barcelona, España. 34-47.

Martínez O. Y., Castillo A. S., Guadarrama C. P. 2009. La dispersión de frutos y semillas y la dinámica de comunidades. *Ciencias*. 96: 38-41.

Matilla A. J. 2008. Desarrollo y germinación de las semillas. En: Azcón B. J., Talón M. (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw Hill. 537-558.

Mayer J. L. S., Carmello G. S. M., Appezzato-da-Glória B. 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Flora*. 601-609.

Mello C. M.C. 2001. Conservação de sementes de orquídeas do Cerrado. *Acta Botanica Brasilica*. 15: 287-287. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062001000200020>.

Menchaca G. R. A., Moreno M. D. 2006. Conservación de orquídeas, una tarea de todos. Universidad Veracruzana-Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Xalapa, Veracruz, México. 40 pp.

Menchaca G. R. A., Moreno M. D. 2011. Manual para la propagación de orquídeas. Comisión Nacional Forestal. México. 38-39.

Mercadante S. M. O., Mazzottini D. S. H., Nery L. A., Ferreira P. R. B., Ribeiro L. M., Royo V. A., De Oliveira D. 2014. Structure, histochemistry and phytochemical profile of the bark of the sobol and aerial stem of *Tontelea micrantha* (Celastraceae-Hippocrateoideae). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 86:1167-1179.

Miceli M. C. L., Borraz J. F. J., Córdoba C. M. A., Gutiérrez A. H. 2014. Orquídeas de la Reserva de la Biosfera Selva El Ocote. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México. 195 pp.

Mitchell, R. 1989. Growing hardy orchids from seeds at Kew. *Plantsman* 11: 152-169. Citado En: Verdugo, G; Marchant, J; Cisternas, M; Calderón, X; Peñaloza, P.(eds.). Caracterización morfométrica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (Orchidaceae) usando análisis de imagen. *Gayana Botanica*. 64:232-238.

Munien P., Naidoo Y., Naidoo G. 2015. Micromorphology, histochemmistry and ultrastructure of the foliar trichomes of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae). *Planta*. 242: 1107-1122.

Muñoz B. M. 2011. Tesis: Evaluación de medios de cultivo para la germinación “*in vitro*” de las orquídeas *Cyrtochilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rchb. F. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 70pp.

Muñoz M., Jiménez V. M. 2008. Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana*. 8: 23-31.

Murashige, T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Nava J. J. F., Jiménez A. A. R., De Jesús S. A., Arenas O. M. L., Ventura Z. E., Evangelista L. S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* RCHB. F. generadas *in vitro*. *Polibotánica*. 32: 107-117.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010., 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 de la Federación. Segunda Sección, México.

Ortega L. M. P., Martínez P. A., Chávez A. V. M. 2009. Conservación y propagación de orquídeas. Restauración, conservación y manejo. 483-495.

Ossenbach C., Arce J., Warner J. 2007. Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma. I. Maduración, viabilidad y longevidad de semillas. *Tierra Tropical*. 3: 37-45.

Otero J. T., Ackerman J. D., Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*. 89:1852-1858.

Otero J. T., Ackerman J. D., Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*. 13:2393-2404

Otero J. T., Bayman P., Ackerman J. D., 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology*. 19:29 - 43.

Otero J. T., Flanagan N., Herre E. A., Ackerman J. D., Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlatos to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Americaan Journal of. Botany*. 94:1944 - 1950.

Otero J. T., Mosquera A. T., Flanagan N. S. 2013. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. *Lankesteriana* 13:57 - 63.

Otero O. J. T., Bayman P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*. 58: 270-276.

Pardo V A., Ferreira A.G. 2006. Armazenamento de sementes de orquídeas. *Revista Brasileira de sementes*. 28: 92-98.

Pedroza M. J., Mican G. Y. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* RCHB. F. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 42: 543-547.

Pérez D. V. A., Ávila D. I., Salgado G. R. 2014. Propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* la llave & lex. (Orchidaceae) como una alternativa para su conservación. III Simposio Nacional de biotecnología y agricultura sustentable. Zacatecas, México. 209-214.

Pérez M. B. A., Castañeda G. S. L. 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal*. 3: 143-151.

Pérez G. F., Pita V. J. M. 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Hojas divulgadoras N°2112- HD. Universidad Politécnica de Madrid. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 16.

Pérez M. B. A., Castañeda G. S. L. 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal*. 3: 143-151.

Potisek M. C., Sarmiento M., Puc L. N. (1996) Germinación de semillas y su establecimiento *in vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem. Reporte Anual de Ciencia y Tecnología INIFAP. CIR–SURESTE Campeche, Camp., México.187–192

Pritchard H. W. 1985. Determination of orchid seed viability using fluorescein diacetate. *Plant, Cell and Environment* 8: 727-730.

Pritchard H. W., Daws M. I., Fletcher B. J., Gaméné C. S., Msanga H. P., Omondi W. 2004. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *American Journal of Botany*. 91: 863-870.

Pritchard H. W., Prendergast F.G: 1989. Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen. En: Pritchard H. W., (editor) *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*. Cambridge. Cambridge University Press. 1-16.

Pritchard H. W., Seaton P. T. 1993. Orchids seed storage: Historical perspective current status and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* 14: 89-104.

Probert R. J., Daws M. I., Hay F. R., 2009. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany*. 104:57-69.

Quiroga D., Martínez M., Larrea-Alcázar. 2010. Sistemas de polinización de cinco especies de orquídeas creciendo bajo condiciones de invernadero. *Ecología en Bolivia*. Bolivia. 45:131-137.

Rao A. T. 1998. Conservation of wild orchids of Kodagu in the Western Ghats. Bangalore: The Technology Development and Agricultural Technologies and Services Pvt. Ltd. 242.

Raya-Montaña Y.A., Carrillo-Castañeda G., Pedraza-Santos M. E., Corona-Torres T., Carrillo-Salazar A. J., Alcantar-González G. 2011. Propagación *in vitro* de *Laelia halbingeriana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 539-553.

Rodríguez F. A. B. 2013. Tesis: Inducción de la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* Pav. Ex Lindl. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México D. F. 68pp.

Rodríguez L., González R., Díaz A., Fajardo E., Sánchez E., Hernández J., Castañeira M. A., De la Cruz G., González J. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. (En línea). Cuba. ISBN959-250-156-4. Disponible en: [www.dama.gov.co](http://www.dama.gov.co)

Ruiz B. C., Laguna C. A., Iglesias A. I. G., Damon A., Marín H. T. N. J., Azpíroz R. H. S., Moreno M. J. L. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (*Orchidaceae*). *Python* (Buenos Aires). 77: 203-215.

Salazar G. A. 2009. Orquídeas. A. Lot (ed.), Biodiversidad del Ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Libro conmemorativo de 25º aniversario de la

Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.153-169.

Salazar M. S. A., Gélvez M. J. D. 2015. Determining the viability of orchid seeds using the tetrazolio and carmín índigo test. *Revista de Ciencias*. 59-69.

Salazar R. V. M., Mata R. M. 2003. Micropropagación y conservación de orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Clavijero. *Lankesteriana*. 7:151-153.

Sandoval Z. E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 278pp.

Santos L., Martínez M., Campos J., Aguirre E. 2005. *In vitro* Propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for Conservation and Ornamental Purposes in Mexico. *HortScience* 40(2):439-442.

Santiago J. T., Carballar H. S., Chávez A. V. M. 2015. Germinación y regeneración *in vitro* de *Epidendrum falcatum* LINDL. En: Figueroa E., Godinez L., Pérez F.(eds). *Ciencias de la Biología y Agronomía. Handbook T-I*. -©ECORFAN, Texcoco de Mora-México. 151- 160.

Seaton P., Pritchard H. W. 2003. Orchid germplasm collection, storage and exchange. En: Dixon K. W., Kell S. P., Barrett R. I., Cribb P. J. (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Borneo. 227-258.

Selosse M. A., Boullard B. Richardson D. 2011. Noël Bernard (1874-1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Springer*. 54: 61-68.

Shimura H., Y. Koda 2004. Micropropagation of *Cypropedium macranthos* var. rebunense through protocorms-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 78:273-276.

Silva S. M, N., Dos Santos P. E. A. 1985. Formation of Múltiple or Adventive embryo in *Epidendrum nocturnum* Jacq (Orchidaceae) *Annals of Botany*, 55: 331–336

Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin*. 50: 416-418.

Soto A. M. A., Dressler R. L. 2010. A revisión of the mexican and central american species of *Vanilla Plumier ex Miller* with a characterization of their its región of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9: 285 - 354.

Soto A. M. A., Hágsater E. 1990. Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado preliminar de los taxa amenazados. En: José L. Camarillo R. y Fermín Rivera A. (eds.). *Áreas naturales protegidas en México y especies en extinción*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. México. 155-172.

Soto A, M. A., Salazar G. A. 2004. Orquídeas. En: Garcia M. A. J., Ordóñez M. J., Briones S. M. (eds.) *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza- World Wildlife Fund, México, 271-295.

Southworth D. 1973. Cytochemichal reactivity of pollen walls. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 21: 73-80.

Stanley R. G., Butler W. L. 1961. Life process of the living seed. En: Seeds. The Yearbook of the Agriculture. United States Department of Agriculture. United States Government Printing Office. Washington, D. C. 88-94.

Swamy K. K., Kumar H. N. K., Ramakrishna T. M., Ramaswamy S. N. 2004. Studies on seed morphometry of epiphytic orchids from Western Ghats of Karnataka. *Taiwania*. 49: 124-140.

Taiz L., Zeiger E. 2010. Plant Physiology. Fifth ed. Sinauer Assoc. Pub. Mass. USA. 782 pp.

Téllez V. 2011. Diagnóstico de la familia *Orchidaceae* en México. SAGARPA, SNICS, SINAREFI. México. 169.

Teixeira da Silva J. A., Tsavkelova E. A., Bun N. T., Parthibhan S. Dobránszki J., Cardoso J. C., Rao M. V., Zeng S. 2015. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. *Plant Cell Reports*. 34: 1685-1706.

The Plant List. 2013. Version 1.1. Publicado en Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st September).

Thornhill A., Koopowitz, H. 1992. Viability of *Disa uniflora* Berg (*Orchidaceae*) seeds under variable storage conditions: is orchid gene banking possible? *Biological Conservation*. 62: 21–27.

Thorpe T. A. 2006. History of plant tissue culture. En: Loyola-Vargas V.M., and Vázquez-Flota F.(eds.). *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. 9-32.

Tiza A. G., 2010. Tesis de licenciatura: "Propagación *in vitro* de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*". Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. 1-57.

Tongbram J., Rao A. N., Vij S. P. 2012. Seed morphometric studies in some orchids from Manipur. The Journal of the Orchid Society of India. 26: 25-29.

Tremblay R. L., Hutchings M. J. 2003. Population dynamics in orchid conservation: a review of analytical methods, based on the rare species *Lepanthes eltoroensis*. En: Dixon K.W., Kell S.P., Barrett R.L., Cribb P.J. (eds). Orchid Conservation. Natural History Publications Kota Kinabalu, Sabah.163–183.

Van der Pijl, L., Dodson C. H. 1966. Orchid flowers. Their pollination and evolution. University Miami Press, Coral Gables, Florida, 23, 77, 125 pp.

Van Waes J. M., Debergh P. C. 1986. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. Physiologia Plantarum 66: 435-442

Veyret Y. 1965. Embryogénie comparée et blastogénie chez les Orchidaceae-Monandreae. Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer. Paris. 46-48.

Veyret Y. 1974. Development of embryo and young seedling stages of orchids. En: Withner C. L. (eds.). The orchids: scientific studies. John Wiley and Sons Ltd. New York. 223-265.

Vujanovic V., St-Arnaud M., Barabé D., Thibeault G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*. 86: 79-86.

Whigham D. F., O'Neill J. P., Rasmussen H. N., Caldwell B. A., McCormick M. K. 2006. Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent *in situ* seed banks. *Elsevier*. 129:24-30.

Withers L. A. 1985. Long-term storage of *in vitro* cultures. En: *In Vitro Techniques, Propagation and Long-Term Storage*. Schafer-Menuhr, A. (ed.), Martinus Nijhoff & Dr. Junk Pub., Dordrecht. 137-148.

Withner, C. L. 1974. *The orchids scientific studies*. John Wiley and Sons. New York. 618pp.

Wolińska A., Stępniewska Z. 2012. Dehydrogenase activity in the soil environment. En: Canuto R. A (Eds). 2012. *Dehydrogenases*. In *Tech. Croatia*. 183-210.

Wood C. B., Pritchard H. W., Mugambi G. K. 2003. Fluorescein diacetate and orchid seed viability in UK and Kenyan species. En: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard and R.J. Probert (Eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens Kew, United Kingdom. 493-506.

Wright N. P. 1958. *Orquídeas de México*. Foirnier, S. A. México. 23.

Yamazaki J., Miyoshi K. 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (*Orchidaceae*). *Annals of Botany*. 98: 1197-1206.

Yoder J. A., Zettler L. W., Stewart L. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* 156: 145-150.

Young J.A., Young C. G. 1986. *Collecting, processing and germinating seeds of wildland plants*. Timber Press, Portland, USA. 236 pp.

Zotz G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 453–481.

## Índice de fotos

**Foto 1.** Flor de *Laelia anceps* mostrando: S sépalos; P pétalos; L labelo.

**Foto 2.** Acercamiento de la columna, fusión de androceo y gineceo de *Laelia anceps*.

**Foto 3.** Cápsula dehiscente de *Epidendrum radicans* con semillas.

**Foto 4.** Flores de *Cuitlauzina pendula*.

**Foto 5.** Flores de *Epidendrum radicans*.

**Foto 6.** Flores de *Laelia anceps*.

**Foto 7.** Placa multipozo.

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Características de las semillas de orquídea.

**Tabla 2.** Tratamientos de cultivo.

**Tabla 3.** Dimensiones de la testa y embrión en las semillas de *Cuitlauzina pendula*, del largo, ancho (mm) y volumen (mm<sup>3</sup>).

**Tabla 4.** Dimensiones de la testa y embrión en las semillas de *Epidendrum radicans*, del largo, ancho (mm) y volumen (mm<sup>3</sup>).

**Tabla 5.** Dimensiones de la testa y embrión en las semillas de *Laelia anceps*, del largo, ancho (mm) y volumen (mm<sup>3</sup>).

**Tabla 6.** Etapas de desarrollo alcanzada en *Cuitlauzina pendula*, hasta febrero del 2017, en tres experimentos realizados por triplicado.

**Tabla 7.** Etapas de desarrollo alcanzadas en *Epidendrum radicans*, hasta febrero del 2017, en tres experimentos realizados por triplicado.

**Tabla 8.** Velocidad e índice de germinación de *Epidendrum radicans*. La tabla muestra el promedio y desviación estándar de la media, de la velocidad e índice de germinación.

**Tabla 9.** Promedios de porcentaje de germinación con respecto a las cuatro concentraciones de ANA en *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*.

**Tabla 10.** Promedios de porcentaje de germinación con respecto a los tres medios de cultivo en *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps*.

**Tabla 11.** Promedios de porcentaje de germinación con respecto a la interacción de las concentraciones de ANA y el medio de cultivo en *Epidendrum radicans* y *Laelia anceps* de los 12 tratamientos

**Tabla 12.** ANOVA con respecto a la velocidad de germinación de *Epidendrum radicans*.

**Tabla 13.** ANOVA con respecto al índice de germinación de *Epidendrum radicans*.

**Tabla 14.** Etapas de desarrollo alcanzadas en *Laelia anceps* hasta febrero del 2017, en tres experimentos realizados por triplicado.

**Tabla 15.** Velocidad e índice de germinación de *Laelia anceps*. La tabla muestra el promedio y desviación estándar de la media, de la velocidad e índice de germinación.

**Tabla 16.** ANOVA con respecto a la velocidad de germinación de *Laelia anceps*.

**Tabla 17.** ANOVA con respecto al índice de germinación de *Laelia anceps*.

## Índice de figuras

**Figura 1.** Semillas viables y no viables de *Cuitlauzina pendula*, tratadas con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT), tomadas con microscopio óptico Nova, con lente intermedio de 10 y objetivo de 10X (100 diámetros). Semilla viable (izquierda) y no viable (derecha).

**Figura 2.** Pruebas de viabilidad en semillas de *Cuitlauzina pendula*. Los resultados muestran el promedio de los porcentajes de germinación y el error de tres pruebas realizadas por triplicado. El modelo de regresión y el valor de  $R^2$ , solo son válidos para este intervalo y se realizaron con el programa Excel.

**Figura 3.** Semillas viables y no viables de *Epidendrum radicans*, tratadas con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT), tomadas con microscopio óptico a 40 diámetros. Semilla viable (izquierda) y no viable (derecha).

**Figura 4.** Pruebas de viabilidad en semillas de *Epidendrum radicans*. Los resultados muestran el promedio de los porcentajes de germinación de tres pruebas realizadas por triplicado. El modelo de regresión y el valor de  $R^2$ , solo son válidos para este intervalo y se realizaron en el programa Excel.

**Figura 5.** Semillas viables y no viables de *Laelia anceps*, tratadas con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (CTT), tomadas con microscopio óptico a 100 diámetros. Semilla viable (izquierda) y no viable (derecha).

**Figura 6.** Pruebas de viabilidad en semillas de *Laelia anceps*. Los resultados muestran el promedio de los porcentajes de germinación de tres pruebas realizadas

por triplicado. El modelo de regresión y el valor de  $R^2$ , solo son válidos para este intervalo y se realizaron en el programa Excel.

**Figura 7.** Tinciones en semillas de *Cuitlauzina pendula*, tomadas con microscopio óptico Nova, observadas a 100 diámetros.

**Figura 8.** Tinciones en semillas de *Epidendrum radicans*, tomadas con microscopio óptico Nova, observadas a 40 diámetros.

**Figura 9.** Tinciones en semillas de *Laelia anceps*, tomadas con microscopio óptico Nova, observadas a 100 diámetros.

**Figura 10.** Actividad metabólica en semillas de *Cuitlauzina pendula*. Las fotografías fueron tomadas con cámara Omax A35100U en microscopio óptico a 100 diámetros, a 90 días de su siembra.

**Figura 11.** Semillas germinadas de *Epidendrum radicans*. Las fotografías fueron tomadas con cámara Omax A35100U en microscopio óptico a 40 diámetros.

**Figura 12.** Germinación acumulada de *Epidendrum radicans* a través del tiempo en los medios Mínimo, MS y Knudson C, con las diferentes concentraciones de ANA.

**Figura 13.** Porcentaje de germinación promedio de *Epidendrum radicans*. Las barras oscuras indican el porcentaje de semillas germinadas.

**Figura 14.** Semillas germinadas de *Laelia anceps*. Las fotografías fueron tomadas con cámara Omax A35100U en microscopio óptico a 100 diámetros.

**Figura 15.** Germinación acumulada de *Laelia anceps* a través del tiempo en los medios Mínimo, MS y Knudson C, con las diferentes concentraciones de ANA.

**Figura 16.** Porcentaje de germinación promedio de *Laelia anceps*. Las barras oscuras indican el porcentaje de semillas.

**Figura 17.** Semilla de *Cuitlauzina pendula*. a) Etapa 1 de desarrollo, b) acercamiento al extremo basal de la semilla, la fotografía fue tomada con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

**Figura 18.** Semilla de *Cuitlauzina pendula* en etapa 2 de desarrollo, la fotografía fue tomada con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

**Figura 19.** *Epidendrum radicans*. a) semilla en etapa 1 de desarrollo, b) acercamiento a la semilla, c) protocormo en etapa 2 de desarrollo, d) protocormo en etapa 3 de desarrollo, e) protocormo en etapa 4 de desarrollo, f) protocormo en etapa 5 de desarrollo. Las fotografías fueron tomadas con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

**Figura 20.** *Laelia anceps*. a) semilla en etapa 1 de desarrollo, b) acercamiento a la semilla, c) protocormo en etapa 2 de desarrollo, d) protocormo en etapa 3 de desarrollo, e) protocormo en etapa 4 de desarrollo, f) protocormo en etapa 5 de desarrollo. Las fotografías fueron tomadas con microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900LV.

## **Índice de abreviaturas**

AIA – ácido indol-3-acético.

ANA – ácido naftalen-acético.

BA – 6-benzil-adenina.

CTT – Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio

GA<sub>3</sub> – ácido giberélico.

IG – Índice de germinación.

M – Velocidad de germinación.

MEB – Microscopia Electrónica de Barrido.

MS – Murashige y Skoog.

PG – Porcentaje de germinación.

## **ANEXO 1**

Preparación de los colorantes

**Solución Azul de Coomassie-** disolver 25 mg de azul de Coomassie en 10 ml de ácido acético al 7 % y 25 ml de Alcohol isopropílico, aforar a 100 ml con agua destilada.

1. Se colocan dos gotas de colorante azul de Coomassie al 0.25 % durante 15 min. (la preparación de la solución se realiza con una modificación a lo descrito por Demarco, 2017).
2. Enjuagar brevemente en agua destilada.
3. Montar en porta objetos las semillas.
4. Observar en el microscopio óptico y evaluar.

**Solución Eosina-** Disolver 0.3 g de Eosina en 0.025 ml de Ácido acético glacial y 100 ml de agua destilada.

1. Colorante Eosina durante 15 min.
2. Enjuagar brevemente en agua destilada.
3. Montar en porta objetos las semillas.
4. Observar en el microscopio óptico y evaluar.

**Solución Sudan III-** Disolver 200 mg. de Sudan en 100 ml de etanol al 70 %.

Mezclar en baño María y dejar en reposo 24h.

1. Colorante Sudan III durante 15 min.
2. Enjuagar brevemente en etanol al 80 %.
3. Montar en porta objetos las semillas.
4. Observar en el microscopio óptico y evaluar

**Solución Lugol-** Solución de yodo y yoduro de potasio: disolver 1 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua destilada y añadir 1 g de yodo (El yodo no se disuelve inmediatamente. Por lo tanto, agitar la solución y dejar reposar algunas horas a algunos días en la oscuridad hasta que el yodo se disuelva por completo).

1. Sumergir una pequeña cantidad de las semillas de las tres especies en el reactivo de Lugol durante 10 min.
2. Enjuagar brevemente con agua destilada.
3. Monte las semillas en portaobjetos
4. Observar en el microscopio óptico y evaluar

**Solución Cristal violeta-** Disolver 1g de cristal violeta en 100 ml. de agua destilada.

1. Sumergir una pequeña cantidad de las semillas de las tres especies en Sudan III durante 15 min como contraste de la tinción.
2. Eliminar el exceso de solución de sudan III de las semillas.
3. Sumergir las semillas en Solución Cristal violeta durante 10 min.
4. Enjuagar brevemente con agua destilada.
5. Montar las semillas en portaobjetos.
6. Observar en el microscopio óptico y evaluar

## ANEXO 2

### COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

#### Murashige y Skoog

Murashige y Skoog (MS)	(mg/L)
Nitrato de amonio	1650.0
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio anhidro	332.2
Cloruro de cobalto • 6H <sub>2</sub> O	0.025
Sulfato cúprico • 5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.26
Sulfato de hierro • 7H <sub>2</sub> O	27.8
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato de manganeso • H <sub>2</sub> O	16.9
Ácido molibídico (sal sódica) • 2H <sub>2</sub> O	0.25
Yoduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato de potasio monobásico	170.0
Sulfato de Zinc • 7H <sub>2</sub> O	8.6

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/orchid-culture-media.html>

### Para preparar 1L de medio de cultivo MS

Medio MS	4.3 g/L
Agar	10 g/L
Sacarosa	30 g/L
Solución stock de ANA para obtener las concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0, y 3.0 mg/L	

El pH se ajustó a 6.5 con ácido clorhídrico 1N, antes de su esterilización en autoclave

### Knudson C

Knudson C	(mg/L)
Sulfato amonio	500.0
Ácido bórico	0.056
Nitrato de calcio	694.4
Sulfato cúprico • 5H <sub>2</sub> O	0.0624
Sulfato de hierro • 7H <sub>2</sub> O	25.0
Sulfato de magnesio	122.125
Sulfato de manganeso • H <sub>2</sub> O	5.682
Trióxido de molibdeno	0.016
Fosfato monobásico de potasio	250.0
Sulfato de zinc • 7H <sub>2</sub> O	0.331
Sacarosa	20,000

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/orchid-culture-media.html>

**Para preparar 1L de medio de cultivo Knudson C**

Medio Knudson C 21.6 g/L

---

Agar 10 g/L

---

Sacarosa 30 g/L

---

Solución stock de ANA para obtener las concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0, y 3.0 mg/L

---

El pH se ajustó a 6.5 con ácido clorhídrico 1N, antes de su esterilización en autoclave

---

**Mínimo**

**Para preparar 1L de medio de cultivo Mínimo**

Medio Knudson C 21.6 g/L

---

Agar 10 g/L

---

Sacarosa 30 g/L

---

Solución stock de ANA para obtener las concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0, y 3.0 mg/L

---

El pH se ajustó a 6.5 con ácido clorhídrico 1N, antes de su esterilización en autoclave

---

## Productos académicos derivados de la tesis



# XIX Congreso de la Sociedad Mesoamericana para la Biología y la Conservación

24 al 28 de agosto de 2015  
Villahermosa, Tabasco

## Evaluación de la viabilidad de semillas de orquídeas mexicanas

La Familia *Orchidaceae*, se caracteriza por sus bellas flores y para México se conocen 1,263 especies, todas de difícil reproducción natural, con períodos largos para su establecimiento, crecimiento y desarrollo, de al menos cinco años. Sus semillas miden de 0.25 a 1.2 mm, consisten de un embrión indiferenciado, protegido por una testa de una capa o bicapa celular, sin endospermo ni cotiledones; en ocasiones, el embrión falta, aunque parezca normal. Es posible que en una siembra no todas las semillas germinen y más aún, que ninguna germine. George Lakon desarrolló una metodología para probar la viabilidad de semillas que se fundamenta en la reducción del cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio incoloro, a formazan de color rojo no difusible en las células vivas. La coloración de una célula con el tetrazolio es una indicación definitiva de su viabilidad, pues las células muertas permanecen incoloras con lo que se facilita la determinación. Se trabajo con semillas de 10 especies de orquídeas mexicanas: *Epidendrum radicans*, *Laelia albida*, *Laelia anceps* var. *chilapensis*, *Laelia autumnalis*, *Laelia autumnalis* var. *semialba*, *Laelia gouldiana*, *Laelia speciosa*, *Laelio-Cattleya*, *Oncidium cavendishianum* y *Prosthechea vitellina*. A fin de probar su viabilidad, mediante su inmersión en una solución de sacarosa al 10 % y cloruro de trifenil tetrazolio al 1 %, durante 24 horas y en completa obscuridad. Se observaron bajo microscopio óptico 4x, 10x, se contaron las de semillas viables y no viables: *Epidendrum radicans* 95 % viables, *Laelia albida* 80% viables, *Lalia anceps* var. *chilapensis* semillas vanas, *Laelia autumnalis* 50 % viables, *Laelia autumnalis* var. *semialba* 60 % viables, *Laelia gouldiana* semillas vanas, *Laelia speciosa* semillas inmaduras, *Laelio-Cattleya* semillas vanas, *Oncidium cavendishianum* 50 % viables y *Prosthechea vitellina* 30 % viables. El realizar prueba de viabilidad preliminar, contribuye a facilitar el trabajo de siembra que a su vez contribuye con los estudios de la conservación de estas especies mexicanas.

## **Propagación *in vitro* de cuatro especies de orquídeas mexicanas para la conservación.**

Las orquídeas tienen gran importancia ecológica, económica y cultural y es necesario realizar mejoramiento, explotación racional y conservación para estas especies a fin de reducir y desalentar la colecta de ejemplares en la naturaleza. Las especies de orquídeas son vistosas, de interés hortícola y tienen posibilidad de ser atractivas para cultivadores comerciales o aficionados. Mediante el cultivo *in vitro*, se pueden multiplicar a mayor escala y en menor tiempo, que las obtenidas de forma natural. Se sembraron asimbióticamente e *in vitro* semillas de *Epidendrum radicans*, *Laelia autumnalis* var. *semialba*, *Oncidium cavendishianum* y *Prosthechea vitellina*. Se obtuvieron protocormos de los ejemplares, mediante la siembra en medio Knudson C Modificado suplementado con agar, plátano, sacarosa y amoxicilina (500 mg/L). Los cultivos se mantienen en cámara de crecimiento con fotoperiodos de 14/10 horas luz/obscuridad a 30 °C. Las semillas sembradas bajo condiciones asépticas germinaron, produciendo protocormos de *Epidendrum radicans* a los 7 días después de la siembra, de *L. autumnalis* var. *semialba* a los 14 días, de *Oncidium cavendishianum* a los 25 días y de *Prosthechea vitellina* a los 30 días y un mes después se observan protocormos con primordios foliares en *Epidendrum radicans* y después de tres meses en, *L. autumnalis* var. *semialba*, *Oncidium cavendishianum* y *Prosthechea vitellina*. Bajo las condiciones probadas *Epidendrum radicans*, *L. autumnalis* var. *semialba*, *Oncidium cavendishianum* y *Prosthechea vitellina* no han sido difíciles de propagar. El medio de cultivo probado resultó óptimo para la germinación y obtención de protocormos de estos ejemplares, contribuyendo de esta manera con los estudios necesarios de propagación y con la conservación de estas especies. La reproducción de orquídeas en forma masiva y mantener una producción continua de ejemplares de calidad, podrán reducir en cierta medida el saqueo de especies de sus poblaciones naturales y de esta forma contribuir a la conservación de estas especies.



## Morphology, viability and histochemical properties of endemic orchid seeds from Mexico.

**INTRODUCTION.** Orchids are one of the three largest of flowering plants with over 25 000 species worldwide ordered in 850 genera, in Mexico we can find 1,260 species distributed on 164 genera that inhabit several vegetation types from semiarid zones up to mesic environments; they are famed for their beautiful and fascinating flowers that are intensively collected. Orchid seeds hold the world record for the smallest seeds of all flowering plants and present a transparent testa with a fusiform aerodynamic morphology, its embryo take up little space within them, relatively undifferentiated when mature with neither endosperm nor cotyledon present. Here we studied orchid seed size; its viability and describe morphology and histochemical properties of several Mexican epiphytic orchids: *Laelia albida* Batem ex Lindl., *Laelia gouldiana* Reichb.f., *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr, *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., *Prosthechea vitellina* (Lindl.) Higgins and *Cuitlauzina pendula* Lex. in P.de La Llave & J.M.de Lexarza.

**MATERIAL AND METHODS.** Seeds were obtained from a local nursery at Mexico City, they were measured in dimensions length and width, tested for their viability with tetrazolium 1 % and 10 % sucrose solution after three hours exposure. As seeds lack food reserve as an endosperm, food reserves are at the embryo proper, besides embryos do not germinate on their own. Embryo was tested in order to observe oil droplets, starch grains and protein bodies, which were evaluated with histochemical tests using differential dyes: eosine, lugol, sudan III and silver nitrate; observed under a Zeiss light microscope and photographed with a digital camera, measured with Motic Image 2.0 and Image J programs.

**RESULTS.** Tetrazolium test is one of the most reliable for evaluation for seed quality and vigour, all seeds proved viable in different percentages, except for *Laelia gouldiana* which presented mock seeds. Seed morphology showed a fusiform testa formed by one-layered irregular reticulated cells, seeds measured between 370-563 mm in length and 88-182.5 mm in width. Embryos length 80.6-292.3 mm and 37-171.0 mm width, being *Laelia autumnalis* the smallest and *Cuitlauzina pendula* the largest. Mature embryos are globular and covered with cuticular sheath, soluble carbohydrates, lipid and protein bodies were found differentially for each species tested.

**CONCLUSIONS.** Orchids produce a vast number of this tiny seeds perfectly adapted for wind dispersal and with the strategy to meet their specific obligate mycorrhizal symbiont fungi like *Rhizoctonia* genus, in order to be able to germinate and encounter a suitable host tree and a suitable location. The observed reticulated testa, showed a particular pattern that might be useful as an indicative for systematic studies, particularly for epiphytic orchids. The studied orchid species are endemic to Mexico with limited distribution, some are considered as endangered species, *Laelia speciosa* is under special protection NOM- 059 (Norma Oficial Mexicana); all the viable seeds of these epiphytic orchids might be germinated under *in vitro* tissue culture techniques in order to promote their conservation.



## Uso cultural y tradicional de las orquídeas mexicanas.

Introducción. - El uso de las orquídeas mexicanas ha cambiado en su historia siendo el principal el ornamental debido a la belleza de sus flores que se aplica para muchas de las 1,320 especies de Orquídeas Mexicanas conocidas a la fecha, su gran variedad de colores y formas ha llegado a crear el mito de la existencia de la orquídea negra, siendo la especie mexicana más cercana a ello *Prosthechea cochleata* con su labelo purpura. Sin embargo, a lo largo de su historia son varios los usos que las orquídeas mexicanas han brindado y algunos de ellos se han modificado en la actualidad. Objetivo. - Con el presente estudio pretendemos recopilar la información y poder describir algunas de las técnicas sobre el uso de las orquídeas en México. Resultados. - se realizó una tabla con el nombre de la especie utilizada, forma de crecimiento, parte de la planta que se utiliza y el uso. Algunos ejemplos con la forma en que se usan son: *Laelia autumnalis*. Uso: religioso (Celebración de Día de Muertos); *Arpophyllum spicatum*, *Epidendrum anisatum*. Uso: medicinal (contra la disentería); *Laelia speciosa*, *Prosthechea venosa*, *Bletia campanulata*. Uso: adhesivos (*mucílagos para el arte plumario*); *Laelia autumnalis*, *Vanilla planifolia*. Uso: comestible (elaboración de dulces, saborizante); entre otros. Conclusión. -Las orquídeas tradicionalmente han sido utilizadas por distintos pueblos del mundo con distintos fines, desde la época prehispánica cuando la comunión del hombre y la naturaleza era mucho más estrecha y el conocimiento sobre el uso de la flora pasaba de generación en generación, desafortunadamente su aplicación se ha ido perdiendo por falta de uso y de conservación de la tradición. Pero aquella información que aún se conserva y se sigue usando, principalmente por pueblos indígenas en nuestro país, puede ser estudiada por investigadores mexicanos demostrando como en el caso de *Prosthechea michuacana*; conocida desde hace siglos por los zapotecas, quienes suelen cortar y masticar sus bulbos porque almacenan gran cantidad de agua y dicen que es 'para que no te duela la diabetes'; ayuda en forma eficiente a los pacientes con diabetes para elevarles los antioxidantes y controlar las complicaciones más comunes en hígado, riñones y sistema cardiovascular; porque tiene efectos farmacológicos tales como hipoglucemiante, antioxidante y antiglicosis. El reciente estudio pretende alentar el uso tradicional de las orquídeas en México ya que forma parte importante de nuestra cultura y tradición.

## **Propagación *in vitro* de *Trichocentrum pachyphyllum* (Hook.) R. Jiménez & Carnevali.**

Introducción. - La orquídea mexicana *Trichocentrum pachyphyllum* (Hook.) R. Jiménez & Carnevali, especie epífita, de 47 a 100 cm de alto, inflorescencia de 45 a 100 cm de largo, con 7 a 40 flores. Sépalos y pétalos verdes a verde-amarillentos con manchas pardo-rojizas. Labelo amarillo con puntos rojos en la base, conocida como oreja de burro; se reporta para México en Morelos y Jalisco, pero también se le encuentra en América tropical y subtropical y el Caribe, desde Brasil hasta Florida. Habita en bosques de encino, de pino-encino y mesófilos a una altitud que va de 1,850 a 2,300 m. Se le puede ver floreciendo en la época invernal, de enero a marzo. Con el presente estudio se contribuye a la propagación de esta especie productora de una inflorescencia contemplada para el mundo como ornamental. Material y método. -Se sembraron asimbióticamente e *in vitro* semillas de *Trichocentrum pachyphyllum* en medio Knudson C Modificado suplementado con agar, plátano, sacarosa y amoxicilina (500 mg/L). Los cultivos se mantienen en cámara de crecimiento con fotoperiodos de 14/10 horas luz/obscuridad a 30 °C. Resultados. - Las semillas sembradas bajo condiciones asépticas germinaron, produciendo protocormos a los 25 días y tres meses después se observan protocormos con primordios foliares; *Trichocentrum pachyphyllum* no ha sido difícil de propagar. Conclusión. - El medio de cultivo probado resultó óptimo para la germinación y obtención de protocormos de este ejemplar, contribuyendo de esta manera con los estudios necesarios de propagación y conservación de esta especie. La reproducción de orquídeas en forma masiva y mantener una producción continua de ejemplares de calidad, podrán reducir en cierta medida el saqueo de especies de sus poblaciones naturales y de esta forma contribuir a la conservación de estas especies. Recomendación. - *Trichocentrum pachyphyllum* es una de muchas especies mexicanas que ya son explotadas por países como Holanda exportando sus inflorescencias a todo el mundo. Es necesario que no sólo se germinen sus semillas y se logren plántulas sino continuar con el trabajo hasta alcanzar el estado reproductivo, que es donde florece esta especie.



### **Evaluación de la viabilidad, morfología e histoquímica de tres especies de orquídeas mexicanas.**

La familia *Orchidaceae* es uno de los taxa más vulnerables, por sobre colecta, venta ilegal y pérdida de su hábitat. Evaluar las semillas en: dimensiones, morfología, histoquímica y viabilidad de tres especies de orquídeas mexicanas: *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex., *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins y *Trichocentrum pachyphyllum* (Hook) R. Jiménez & Carnevali, recién colectadas y después de un año de almacenamiento a temperatura ambiente, contribuirá con la conservación de su germoplasma en buen estado fisiológico. Se realizaron mediciones de testa-embrión y descripción morfológica. Las pruebas histoquímicas específicas con: lugol, eosina, sudán III, azul coomassie y cristal violeta determinaron la presencia de lípidos, proteínas y carbohidratos en los embriones utilizando microscopia de luz. La viabilidad se evaluó a semillas recién colectadas y después de un año de almacenamiento, mediante la prueba de Lakon modificada, embebiendo las semillas en sacarosa al 10 % y cloruro de trifenil tetrazolio (TZ) al 1 % durante 24 horas/obscuridad.

Las semillas más pequeñas fueron las de *C. pendula* con 0.47 mm de longitud de testa y *P. vitellina* la más larga con 3.23 mm. Las tres especies presentan una testa monoestratificada. Los embriones de las tres especies presentaron proteínas, lípidos y carbohidratos según las pruebas histoquímicas. Los porcentajes de viabilidad inicial y final en las semillas fueron: 95-85 % *C. pendula*, 30-23 % *P. vitellina* y 50-26% *T. pachyphyllum*. La pérdida de viabilidad observada indica claramente que el almacenamiento a temperatura ambiente para *P. vitellina* y *T. pachyphyllum* no es el más adecuado, aunque su viabilidad estuvo por debajo del 51% antes del almacenamiento. La presencia de lípidos, carbohidratos y proteínas en el embrión de las especies en estudio no es característica de toda la familia y probablemente se refiera a elementos estructurales. A pesar de estas limitantes, es posible el cultivo y germinación *in vitro* de estas semillas.



Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México. 5 al 7 de Octubre de 2016.

### **Morfología y viabilidad de las semillas de tres especies de orquídeas.**

Las semillas, se consideran como el inicio y el final del ciclo de la vida de las plantas, su forma y tamaño es diverso como las plantas de las que provienen. Las semillas de orquídea son de las más pequeñas, constituidas por tan solo embrión y testa. En el presente estudio se midieron semillas de tres especies de orquídeas mexicanas y se evaluó su viabilidad antes de su siembra. Se utilizó el software Toup View, para realizar las mediciones de testa y embrión de las semillas de: *Cuitlauzina pendula*, *Prosthechea vitellina* y *Trichocentrum pachyphyllum*. Se realizó prueba de viabilidad de Lakon, embebiendo las semillas en solución de cloruro de trifetil tetrazolio durante 24 horas. Los resultados indican que *P. vitellina* tiene las semillas más pequeñas de las tres especies estudiadas con 0.06 mm de longitud de testa y *T. pachyphyllum* la más larga con 1.39 mm. Los siguientes porcentajes de viabilidad se obtuvieron de semillas recién colectadas y después de ser almacenadas por un año siendo: 95 y 85 % *C. pendula*, 30 y 23 % *P. vitellina*, y 50 y 26 % *T. pachyphyllum*. La pérdida de viabilidad observada puede deberse a diferentes factores tanto bióticos como abióticos, siendo posiblemente una de ellas el almacenamiento a temperatura ambiente, y otros debido a factores estructurales de la semilla ya que la viabilidad para dos de las tres especies se mostró por debajo del 51 % desde la apertura de la cápsula. La germinación *in vitro* de estas semillas es posible realizarla ya que se ha confirmado su viabilidad.



### **Cultivo *in vitro* de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. México.**

*Epidendrum radicans* orquídea mexicana, herbácea, terrestre, generalmente litófito, llega a medir hasta 1.5 m de altura, crece al Sur de México y es a través del cultivo *in vitro*, que se contribuye a su conservación *ex situ* y realizar un manejo sustentable de esta orquídea como una estrategia para reducir el saqueo de plantas silvestres. El objetivo de este trabajo fue determinar el mejor medio de cultivo y concentración de Ácido naftalen acético (ANA) que permita la germinación y desarrollo *in vitro* de *E. radicans*. Se evaluó: índice, porcentaje y velocidad de germinación; las diferencias estadísticas se determinaron con un análisis de varianza. En el presente estudio se compararon 12 tratamientos con tres medios de cultivo adicionados con 0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L de ANA. Las semillas germinaron 16 días después de la siembra en los mejores tratamientos que fueron: mínimo con 0.1 mg/L de ANA, Murashige Skoog (MS) con 3 mg/L de ANA, y en el medio Knudson C con 1 mg/L de ANA y donde no se obtuvo germinación fue en el medio mínimo con 3 mg/L de ANA. El máximo porcentaje de germinación fue de 48 % en el medio Knudson C, con 0.01 mg/L de ANA. Durante el proceso de germinación se describieron cinco estadios ontogénicos. El máximo estadio ontogénico alcanzado fue el de hojas en los medios MS con 0 y 1.0 mg/L de ANA y el medio Knudson C con 0 mg/L de ANA. De este modo se estableció un protocolo de germinación asimbiótico *in vitro* para las semillas de *E. radicans* que permite determinar las mejores condiciones para la germinación y desarrollo.



## **Germinación *in vitro* de *Laelia anceps* Lindley (*Orchidaceae*) para su conservación.**

**Introducción** Las orquídeas se reproducen difícilmente de forma natural, tienen largos períodos para su establecimiento, crecimiento y desarrollo, de al menos cinco años. Sus semillas son microscópicas y consisten en un embrión indiferenciado, sin endospermo. El género *Laelia* incluye algunas de las orquídeas más bellas y mejor conocidas de México, se caracteriza por sus lindas flores, las cuales tienen gran importancia ecológica, económica y cultural, por lo cual es necesario realizar mejoramiento, explotación racional y conservación para estas especies a fin de reducir y desalentar la colecta de ejemplares en la naturaleza. Y es mediante el cultivo *in vitro*, que se pueden germinar en menor tiempo, que las obtenidas de forma natural. El objetivo de este trabajo fue determinar el mejor medio de cultivo y concentración de Ácido naftalen acético (ANA) que permita la germinación y desarrollo *in vitro* de *L. anceps*.

**Materiales y Métodos** Se sembraron asimbióticamente e *in vitro* semillas de *L. anceps* en 12 tratamientos con tres medios de cultivo adicionados con 0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L de ANA. Se evaluó el porcentaje de germinación y las diferencias estadísticas se determinaron con un análisis de varianza. Los cultivos se mantienen en cámara de crecimiento con fotoperiodos de 14/10 horas luz/obscuridad a 28 °C.

**Resultados y Discusión** Se obtuvieron resultados de germinación en los 12 tratamientos. Las semillas empezaron a germinar a partir del día 16 en el medio MS con 0.1 mg/L de ANA. El máximo porcentaje de germinación fue de 43 % en el medio mínimo con 0 mg/L de ANA. Durante el proceso de germinación se describieron cinco estadios ontogénicos. El máximo estadio ontogénico alcanzado fue el de hojas en los medios MS con 0.1 mg/L de ANA. De este modo se estableció un protocolo de germinación asimbiótico *in vitro* para las semillas de *L. anceps* que permite determinar las mejores condiciones para su germinación y desarrollo.

**Conclusión** El medio mínimo resultó ser el mejor para la germinación y obtención de protocormos de estos ejemplares, contribuyendo de esta manera con los estudios necesarios de propagación y con la conservación de estas especies. La reproducción de orquídeas en forma masiva y mantener una producción continua de ejemplares de calidad, podrán reducir en cierta medida el saqueo de especies de sus poblaciones naturales y de esta forma contribuir a la conservación de estas especies.



IV Congreso Iberoamericano de Histología. Santiago de Compostela, España. 5 al 8 septiembre 2017.

### **SCANNING ELECTRON MICROSCOPY STUDY OF *IN VITRO* PROPAGATED *Epidendrum radicans* Pav.ex Lindl.**

**INTRODUCTION.** *Epidendrum radicans* Orchidaceae, the fire star, is a native American tropical and subtropical orchid capable of flowering several times a year. Its *in vitro* micropropagation is an option to overcome disadvantages for its massive production and possible commercialization. However, the seed germination process is poorly understood. The goal of this communication is to gain knowledge about the initial processes of seed germination and follow them at the scanning electron microscopy level.

**MATERIAL AND METHODS.** Seeds were obtained from a local nursery at Mexico City, length and width measured, and viability determined by using a modified Lakon test. Embryos were cultured in Knudson C Medium, supplemented with agar, sugar and water with no plant regulators. Different germination stages were sampled and processed for SEM where embryo and testa were analyzed and their growth was classified.

**RESULTS.** The seeds are formed by embryo and testa with no endosperm inside. We use a 5 different growth size category classification: hydrated seeds, testa-enclosed protocorm, germinated embryo (testa-free protocorm), plantlets with foliar primordium and plantlets with leaves. Structure and organization of *in vitro* seed cultured *Epidendrum radicans* were observed under SEM. True embryo growth and differentiation was characterized by the presence of undifferentiated isodiametric cells and elongated differentiated cells on meristematic zones where future leaves will be formed. Fertile seeds for *E. radicans*, have low viability and decreasing with time. In only six months, at the better storing conditions, viability decreases from 24.44 % to 4.37 %. Under simple culture condition, *E. radicans* seeds do germinate but the efficiency is extremely low and on the tested medium, a germination index of 28 % was obtained.

**CONCLUSIONS.** Under simple germination conditions, besides the low germinative activity of *E. radicans*, it is possible to obtain and analyze under SEM the germinative process. This work shows different structural aspects of embryo and testa of an Orchid and their different growth and developmental stages. The reticulate structure of testa and the differential characteristics of meristematic embryo cells as well as their differentiation into primordial leaf structures could give strong contributions to the *in vitro* germination analysis and to promote *Epidendrum radicans* propagation.