



“EFECTO DEL ESTÍMULO POR  
SACAROSA Y MANITOL AL INICIO  
DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS  
DE *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR”.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A N :

BUENTELLO VOLANTE BEATRIZ

SÁNCHEZ HERRERA SUSANA GRACIELA

FES, ZARAGOZA



LO HUMANO QUE DE  
NUESTRO REFLEJÓN

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales  
Unidad de Investigación en Biología Vegetal.

MÉXICO, D.F.

1998.

TESIS. CON  
FALLA DE ORIGEN

2659 A2



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

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

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

## AGRADECIMIENTOS.

En especial a la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, por su apoyo, dedicación y enseñanzas durante la realización de ésta tesis.

Al M. en C. Amadeo Barba Alvarez por el apoyo brindado para la elaboración de ésta tesis, así como por sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la misma.

A el M. en C. Armando Cervantes Sandoval y al M. en C. Manuel Castillo Rivera, por la ayuda en el procedimiento estadístico para la realización de ésta tesis.

A la M. en C. Alejandrina Ávila Ortiz, al Biólogo Carlos Castillejos Cruz y a la Bióloga Rosa Isela Ramírez por las revisiones y correcciones hechas a esta tesis.

Al apoyo de beca-tesis de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) con el proyecto: DGAPA/ PAPIIT IN206895.

A todos los miembros de la Unidad de Investigación en Biología Vegetal por las facilidades que nos fueron otorgadas durante la realización de esta tesis.

A nuestras compañeras : Hortensia Rosas A. y Ma. del Carmen Neyra M. por la ayuda y consejos para el mejoramiento de ésta tesis.

A mis padres:

Gracias por su apoyo incondicional, amor y confianza que sin ellos no hubiera podido llegar a concluir mi primer objetivo profesional y llegar a ser lo que ahora soy.

A mis hermanas Abby Kim y Charie Hely:

Les agradezco el apoyo que me brindan siempre y que se sientan orgullosas de mi.

Al resto de toda mi familia:

Gracias por todo su cariño y consejos que ayudaron a concluir esta tesis.

A mis amigas:

Betty, Hortensia, Carmen y Xóchitl.

A dos personas especiales que me dieron el don de la vida y me enseñaron a disfrutar de él, mis padres.

A Alfredo porque con su amor, paciencia y comprensión llena mis días de alegría.

A las personas que de una u otra forma siempre estan cerca de mi y tienen mi cariño.

A aquellas personas que ya no se encuentran conmigo, pero que fueron parte importante de mi formación.

A mis amigas: Susana, Hortensia, Carmen, Xóchitl y Leyla.

# ÍNDICE

	PÁGINA
<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	3
<b>Antecedentes</b>	5
Semillas de orquídea.	5
Germinación simbiótica.	5
Germinación asimbiótica.	7
Morfogénesis vegetal.	8
Efecto de manitol y sacarosa en la germinación.	8
Efecto de los carbohidratos en la germinación de <i>Laelia spp.</i>	10
Descripción botánica de <i>Laelia speciosa</i> .	11
Ecología de <i>Laelia speciosa</i> .	13
Clasificación taxonómica.	14
<b>Objetivos e Hipótesis</b>	15
<b>Material y Método</b>	16
Material biológico.	16
Almacenamiento de semillas.	16
Prueba de viabilidad.	16
Cultivo <i>in vitro</i> .	17
Desinfestación, siembra e incubación del material biológico.	19
Diseño experimental.	20
Evaluación del desarrollo y germinación.	21
Diseño estadístico.	23
<b>Resultados y Discusión</b>	24
Viabilidad.	24
Germinación.	25
Evaluación de desarrollo y crecimiento.	30
Tiempo mínimo requerido del estímulo.	43
Plántulas en estadio 6 (con al menos una raíz verdadera).	49
<b>Conclusiones</b>	50
<b>Bibliografía</b>	51
<b>Anexo</b>	58

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Planta completa de <i>Laelia speciosa</i> mostrando pseudobulbos y flor.	12
<b>Figura 2.</b> Estadios de desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	22
<b>Tabla 1.</b> Composición del medio MS comercial.	18
<b>Tabla 2.</b> Esterilización de los carbohidratos experimentales.	19
<b>Tabla 3.</b> Períodos de exposición de las semillas de <i>Laelia speciosa</i> a los carbohidratos experimentales antes de ser transferidos a un medio sin carbohidrato.	20
<b>Tabla 4.</b> Estadios de desarrollo del embrión considerados durante su germinación, establecidos como criterios por Harrison y Arditti.	22
<b>Tabla 5.</b> Viabilidad de las semillas de <i>Laelia speciosa</i> mediante la prueba de tetrazolio.	24
<b>Tabla 6.</b> Plántulas desarrolladas con el estímulo de sacarosa a los 42 y 56 días de edad.	44
<b>Tabla 7.</b> Plántulas desarrolladas con el estímulo de manitol a los 91 días de edad.	46
<b>Tabla 8.</b> Cambio de estadios de <i>Laelia speciosa</i> en los diferentes tiempos de exposición a los carbohidratos.	47



# ÍNDICE DE GRÁFICAS

## PÁGINA

Graf. 1. Efecto del estímulo con sacarosa y manitol durante 98 días sobre la germinación de semillas de <i>Laelia speciosa</i> .	26
Graf. 2. Efecto de 7 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre la germinación de semillas de <i>Laelia speciosa</i> .	27
Graf. 3. Efecto de 38 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre la germinación de semillas de <i>Laelia speciosa</i> .	28
Graf. 4. Efecto de 98 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre la germinación de semillas de <i>Laelia speciosa</i> .	29
Graf. 5. Desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> a los 21 días de cultivo por el efecto del estímulo con sacarosa y manitol.	30
Graf. 6. Desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> a los 35 días de cultivo por el efecto del estímulo con sacarosa y manitol.	31
Graf. 7. Desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> a los 42 días de cultivo por el efecto del estímulo con sacarosa y manitol.	32
Graf. 8. Desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> a los 98 días de cultivo por el efecto del estímulo con sacarosa y manitol.	32
Graf. 9. Efecto de 7 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	33
Graf. 10. Efecto de 15 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	34
Graf. 11. Efecto de 21 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	35
Graf. 12. Efecto de 30 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	36
Graf. 13. Efecto de 38 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	37
Graf. 14. Efecto de 45 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	38
Graf. 15. Efecto de 52 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	38
Graf. 16. Efecto de 60 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	39
Graf. 17. Efecto de 98 días de exposición al estímulo de sacarosa y manitol sobre el desarrollo del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	40
Graf. 18. Porcentaje de plántulas con al menos una raíz sobre sacarosa.	49

## RESUMEN

*Laelia speciosa* es una especie epífita endémica a México, perenne y con flores llamativas de color rosa-lila, por lo que es muy saqueada con fines ornamentales y se encuentra dentro de la categoría de vulnerable que según el libro rojo de la International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), es cuando un taxon tiene un alto riesgo de extinción en el campo a mediano plazo (Soto & Hágsater, 1990).

Las semillas de las orquídeas en condiciones naturales presentan un bajo porcentaje de germinación en un largo período de tiempo, en condiciones asimbióticas *in vitro* el tiempo se reduce y el porcentaje de germinación aumenta considerablemente, esto debido a la adición de carbohidratos al medio de cultivo; sin embargo, los estudios relacionados con los efectos que tienen éstos durante la germinación de las semillas de diversas especies de orquídeas son pocos. Actualmente sólo se conoce que son necesarios para iniciar y culminar el proceso de germinación, pero se desconoce el tiempo que se requiere de éste estímulo al inicio de la germinación.

Las semillas de *L. speciosa* recolectadas en campo se sembraron sobre un medio de cultivo semisólido Murashige-Skoog (MS), suplementado con manitol o sacarosa, esterilizados en autoclave y por filtración, se transfirieron réplicas a un medio MS sin carbohidrato a diferentes edades y unas se mantuvieron en medio MS con carbohidrato hasta el final del cultivo. Para cada réplica se evaluó el porcentaje de germinación y se cuantificó el índice de desarrollo para establecer el efecto que tiene el estímulo de los carbohidratos de diferente origen, sobre el desarrollo de las semillas al inicio de la germinación.

El porcentaje de germinación para las semillas de *Laelia speciosa* vario, en general entre 70 y 100 % sin haber diferencias significativas entre los carbohidratos o tipo de esterilización de los mismos, ni entre los diferentes tiempos de exposición de las semillas a los carbohidratos.

Las semillas estimuladas con manitol presentaron un desarrollo más lento comparado con el de las semillas en presencia de sacarosa; ya que sólo después de 98 días de edad, las semillas alcanzaron la etapa de protocormo, cuando el carbohidrato es esterilizado por filtración y se presentaron plántulas con una hoja cuando el manitol es esterilizado en autoclave, por ello no se observo un tiempo mínimo de exposición a éste.

Las semillas de *L. speciosa* en presencia de sacarosa por 38 días llegaron a formar plántulas completas con raíces verdaderas, y por ello se consideró éste tiempo el mínimo que requieren las semillas del estímulo con éste carbohidrato; sin embargo el tiempo con el estímulo puede ser alargado hasta 98 días, aunque se obtiene un mayor porcentaje de plántulas si sólo se estimulan las semillas por 38 días.

Al final del cultivo, se presentaron diferencias significativas en el desarrollo de las semillas, en cuanto al tiempo de exposición y en el tipo de esterilización al utilizar sacarosa y manitol como fuente de carbono. En general ambos carbohidratos resultaron una buena fuente de carbono, aunque el desarrollo de las semillas es más rápido sobre sacarosa que sobre manitol.

## INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae con sus 35 mil especies y cerca de 900 géneros está considerada como uno de los grupos de fanerógamas más numerosos (Dressler, 1981; Arditti, 1992). Es también de los más ampliamente distribuidos, ya que pueden encontrarse en diversos tipos de hábitat, exceptuando los polos. Es uno de los taxa más vulnerable, debido principalmente a su belleza, la cual eleva su valor hortícola y comercial, razón por la cual generalmente son extraídas de su ambiente natural, así como por la destrucción de los hábitats donde se desarrolla (Soto & Hágsater, 1990); se considera que la mayor riqueza de especies de esta familia se encuentra en los bosques tropicales (lluviosos y de niebla) comunidades incluidas dentro de las más seriamente alteradas (Withner, 1974; Soto & Hágsater, 1990).

En la República Mexicana se conocen alrededor de 1000 especies de orquídeas de las cuales el 35 por ciento son endémicas (Soto, 1988).

Los frutos de las orquídeas son cápsulas tripartitas que se desarrollan a partir del ovario inmediatamente después de efectuada la polinización. Estas cápsulas requieren de un año para su maduración.

La estructura y tamaño de la semillas de orquídea es una de las más notables características de éstas; son diminutas, pesan entre 0.3 y 14  $\mu\text{g}$ , miden usualmente de 0.25 a 1.2 mm de largo y entre 0.09 y 0.27 mm de ancho. Poseen un pequeño embrión alargado suspendido dentro de una membrana transparente o a veces pigmentada. Contiene un suspensor de células alargadas y elongadas en la parte posterior del embrión (Arditti, 1967). Estas semillas no poseen cotiledones y consisten principalmente de un embrión relativamente indiferenciado cuando esta maduro y carece de reservas nutricionales suficientes para su germinación. Por ello, es necesario una fuente de nutrición externa hasta que se desarrollen lo suficiente para sobrevivir.

Una fuente de carbono y energía como son los carbohidratos, son el estímulo disparador de las respuestas morfogénicas para la germinación tanto en condiciones naturales, como *in vitro*. En la naturaleza el estímulo inductor depende de la simbiosis establecida por un hongo que generalmente es del género *Rhizoctonia*; mientras que la germinación en el laboratorio depende de la adición de carbohidratos a un medio de cultivo basado en sales minerales.

Se conoce que la falta de éste estímulo ocasiona la suspensión del desarrollo del embrión aún cuando éste halla iniciado su germinación y exista clorofila en el tejido; mientras que el estímulo continuo provocará la culminación del proceso de germinación, que está establecido para la formación de una plántula con hojas y raíz; pero se desconoce el efecto de éste estímulo durante un tiempo limitado al inicio de la germinación. De acuerdo a lo anterior el objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la exposición limitada que ejerce el manitol y la sacarosa durante la germinación *in vitro* de *Laelia speciosa*.

## **ANTECEDENTES**

### **Semillas de Orquídea.**

Los frutos de orquídea producen numerosas semillas, que pueden ir por lo general de desde 300 y hasta 6 millones, éstas son diminutas y desnudas, las cuales pueden medir usualmente menos de un milímetro (Arditti, 1982, 1992).

Las semillas de las orquídeas poseen un embrión simple y rudimentario formado por un pequeño grupo de 8 a 10 células isodiamétricas (Arditti, 1967), se encuentra relativamente indiferenciado, no presenta endospermo, ni cotiledones (Peterson & Currah, 1990), consta de dos regiones, la anterior o chalazal formado por células pequeñas y densas y la región basal constituida por células grandes a veces vacuoladas (Arditti, 1967). Las reservas alimenticias están almacenadas en el propio embrión (Harrison & Arditti, 1978), y se hallan presentes como pequeños gránulos de almidón y gotas de lípidos (Ernst & Rodríguez, 1984) también presentan un suspensor constituido por una serie de células muertas, que se localiza en la parte terminal del embrión y sirve como un conducto de algunas sustancias nutritivas (Arditti, 1992), por ello se le atribuye el papel en la nutrición (Martínez, 1991). Este embrión se encuentra encerrado dentro de una membrana semitransparente, la testa (Arditti, 1982), la cual puede presentar diversas ornamentaciones (Withner, 1959). En el interior de las semillas hay un gran espacio de aire (Arditti, 1967), lo que ocasiona que la semillas puedan flotar en el aire o en el agua (Abraham & Vatsalá, 1981).

### **Germinación Simbiótica.**

La germinación en las orquídeas no es un proceso sencillo, las semillas apenas visibles, bajo condiciones naturales, deberán caer en un sustrato adecuado con condiciones precisas de humedad, acidez, luz y otros factores bióticos (Del Castillo, 1992), además pasar a través de una fase heterotrófica durante su desarrollo, la cual implica una relación balanceada con un hongo endofítico (Smreciu & Currah, 1989), que le proporcione los elementos necesarios para disparar los eventos fisiológicos del embrión para que se lleve a cabo la germinación (Luna & Barba, 1993). Phillip & Nainar (1988) reportan que aun cuando las condiciones ecológicas sean lo más ideales posible sólo del 1 al 2 por ciento de las semillas germinan.

La relación hongo-orquídea es una de las formas más conocidas de micorriza endotrófica, siendo un proceso de interacción y antagonismo, en el que intervienen reacciones mecánicas y digestión (Margalef, 1995) este proceso es conocido como simbiosis entre un hongo y la planta (Hadley, 1980; en Arditti, 1982).

Esta relación no es en sentido estricto una micorriza, pues el hongo inicialmente no penetra la raíz, sino que infecta al embrión. Después de que las raíces se desarrollan en la mayoría de los casos, forman micorrizas con el hongo que encuentran en el sustrato (Dressler, 1981).

Bernard (1903), estableció por primera vez que la germinación de las semillas de orquídea sólo era posible cuando se daba la infección por un hongo específico y que además pertenecía al género *Rhizoctonia*; contemporáneo a Bernard, Burgeff investigó los patrones de infección de las raíces y describió que en muchas especies de orquídeas hay un incremento en la dependencia al hongo (Burgeff, 1959) Ambos autores consideraron, que el inicio de la infección se establecía en el suspensor y en la porción basal del embrión.

La etapa inicial de germinación es la captación de agua lo que provoca el hinchamiento del embrión (Hadley, 1980 en Arditti, 1982) y eventualmente la ruptura de la testa; el embrión crece hasta formar una estructura globular llamada protocormo (Harrison, 1977). El crecimiento de la semilla sigue hasta el comienzo de la actividad metabólica incluyendo la desaparición de reservas lipídicas y la formación de almidón (Hadley, 1980 en Arditti, 1982), el cual no puede ser sintetizado por los embriones en condiciones naturales antes de la infección por el hongo simbiótico, por lo que se dice que la acumulación de almidón en zonas de división celular puede ser una fuente fácilmente aprovechable de energía para el proceso de organogénesis que inicia después de la etapa de protocormo (Phillip & Nainar, 1988). En muchas especies estas etapas ocurren rápidamente en ausencia de la infección (Hadley, 1980 en Arditti, 1982). Una vez que el hongo penetra a las células del embrión, se desarrollan las primeras hojas en el ápice del protocormo y más tarde las primeras raíces (Harrison, 1977).

La infección en etapas tempranas consiste en la penetración de la hifa fúngica a través de las células basales del suspensor, formado por las últimas células del embrión; aunque en algunas especies la infección normalmente ocurre a través de los tricomas epidérmicos (Hadley, 1980; en Arditti, 1982).

Las enzimas del hongo, pueden hidrolizar los carbohidratos complejos como el almidón, lignina o celulosa de la semilla y convertirlos en carbohidratos simples y solubles, para ser aprovechados por el embrión de éstas (Arditti *et al.*, 1972; Ernst & Rodríguez, 1984).

Sin embargo, la transferencia de carbohidratos del hongo a la orquídea y la síntesis de componentes de pared celular de la planta no contribuyen a la nutrición del hongo, pero puede ser significativa en el control de la invasión fúngica.

A diferencia con otras micorrizas, la transferencia de nutrientes entre el hongo y la orquídea es unidireccional en favor de la planta y esto involucra tanto carbohidratos como nutrientes minerales (Smith *et al.*, 1994).

Las orquídeas dependen de la relación con el hongo conforme van desarrollándose o hasta el momento en que se forma una hoja, ya que entonces es posible la fotosíntesis y la capacidad de satisfacer sus propios requisitos energéticos, por lo que la asociación deja de ser necesaria, sin embargo esta relación frecuentemente persevera durante toda la vida de la planta (Lesica & Antibus, 1990).

Según Alexander y Hadley (1984) en una orquídea adulta totalmente autótrofa se presenta un cambio fisiológico en la micorriza, con lo cual se detiene el movimiento de carbono del hongo a la planta, sin embargo, esto no ocurre en algunas orquídeas como las saprofiticas.

### **Germinación Asimbiótica.**

Knudson (1916), fue el primero en proponer y obtener una germinación de semillas de orquídea mediante el método asimbiótico y demostró que, en la nutrición orgánica de éstas, varios azúcares influyen especialmente sobre el desarrollo, por lo que sugirió que la germinación de semillas de orquídea puede ser obtenida con la presencia de ciertos azúcares. En 1922, logró por primera vez la germinación asimbiótica de hasta el 100 % en semillas del híbrido *Laeliocattleya*, con la utilización de glucosa y fructosa en un medio nutritivo con sales minerales y extractos orgánicos (Arditti, 1984).

La sustitución del hongo por carbohidratos y nutrientes minerales permite que los embriones de varios géneros de orquídea puedan crecer y desarrollarse *in vitro*, lo que se conoce como método no simbiótico o asimbiótico (Arditti *et al.*, 1972; Harrison & Arditti, 1978).

Los carbohidratos además de ser una fuente de carbono y energía para el embrión, son el estímulo disparador de su desarrollo morfogénico durante la germinación (Luna & Barba, 1993); sin embargo, se sabe que no todos los carbohidratos promueven la germinación, así como las diversas especies de orquídeas varían su respuesta de germinación sobre distintos tipos de azúcares (Ernst & Rodríguez, 1984). La tasa de germinación *in vitro* aumenta con respecto a la naturaleza considerablemente mediante la adición de azúcares al medio, obteniéndose miles de plántulas a partir de una sola cápsula (Penningsfeld, 1985).



## Morfogénesis vegetal.

El estudio de la morfogénesis vegetal incluye aspectos de crecimiento y desarrollo. El proceso de desarrollo lo constituyen los cambios de forma, así como el grado de diferenciación y el estado de complejidad alcanzado por el organismo. El crecimiento de la plántula, como de cualquier otro organismo es el incremento irreversible de tamaño, generalmente unido, aunque no de un modo necesario, a un incremento de peso seco y la cantidad de protoplasma (Luna & Barba, 1993).

Gran parte del desarrollo de las plantas esta mediado por estímulos generados en el interior de sus órganos o es el resultado de la organización que han alcanzado. Sin embargo, en estudios sobre el desarrollo vegetal durante el crecimiento de las plántulas *in vitro*, se ha demostrado que éste dependerá de las condiciones nutricionales y de incubación que se le proporcionen al cultivo (Luna & Barba, 1993).

## Efecto de Manitol y Sacarosa en la Germinación.

Las especies de orquídeas, aunque capaces de utilizar muchos azúcares diferentes, muestran algunas preferencias; por ejemplo existen las especies que germinan *in vitro* únicamente si esta presente un azúcar específico o cuando se tiene una combinación de éstos (Arditti, 1967). Entre los carbohidratos que se utilizan como estimulantes de la germinación están los siguientes: glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, manitol, rafinosa y melecitosa (Ernst *et al.*, 1971).

A respecto Kubota (1991), comenta que la concentración del azúcar en el medio es uno de los principales factores que afectan el desarrollo heterotrófico de los cultivos, debido a que es la única fuente de carbono y energía para el crecimiento.

Algunos de los estudios realizados con sacarosa y manitol que se pueden mencionar, son los trabajos de Lewis Knudson en 1922, quien trabajó con géneros epífitos como *Cattleya* y *Epidendrum*, reportando una germinación por encima del 80 % utilizando sacarosa; más tarde LaGarde en 1929 reafirma estos resultados trabajando con *Cattleya trianaei*.

En 1930, Quednow reporta también la germinación de géneros de epífitas con tres carbohidratos, entre ellos la sacarosa, obteniendo una alta germinación (Arditti, 1967); así como también, trabajó sobre los efectos del manitol en *Dendrobium nobile* obteniendo una tasa de germinación por debajo del 50 % (Ernst & Rodríguez, 1984).

Arditti (1967), cita algunos trabajos realizados con éstos azúcares; así Yates y Curtis en 1947 reportan que altas concentraciones de sacarosa estimulan el crecimiento de la raíz de varios géneros de orquídea. En el mismo año Bahme, reporta que el crecimiento de géneros epífitos, fue mejor en sacarosa con presencia de niacina que con otros azúcares. Un año después, Knudson afirma que para *Vanilla planifolia* la sacarosa produce un crecimiento de plántulas si se mantienen a una temperatura menor a 32° C, así mismo Vacin en el año 1950, logra una buena germinación y crecimiento de *Cymbidium* en sacarosa.

Pese a lo anterior los resultados no siempre han sido favorables, en 1951 Mariat obtiene una germinación de menos del 20 % en especies de *Cattleya* cuando experimento con sacarosa y glucosa combinadas con endospermo líquido de coco. Para 1952, el mismo autor reporta una buena germinación y crecimiento con sacarosa en especies de *Cattleya* y *Bletilla hyaciathina*.

Withner en 1953, obtiene la germinación de *Cypripedium acaule* en sacarosa; Bredy en este mismo año, trabaja con varios géneros sobre diferentes carbohidratos y sus resultados muestran que la sacarosa es la mejor fuente de carbono para estos géneros; así mismo, Liddell (1953) combina la sacarosa y la glucosa, para germinar semillas de *Cypripedium* y obtiene así una germinación exitosa.

Para 1964, Raghavan & Torrey, obtienen una germinación de cerca del 100% en semillas de *Cattleya labiata* en un medio con sacarosa y amonio.

Kano (1965), reporta una germinación y desarrollo de plántulas de *Dendrobium*, *Brassolaeliocattleya* y *Brassocattleya* en un medio que contiene una concentración de 4 % de sacarosa, así mismo *Dendrobium* tiene una germinación del 100% en un medio con sacarosa a una concentración del 2 al 4 %.

Ernst en 1967, es uno de los primeros en utilizar el manitol como fuente de carbono en plántulas de *Phalaenopsis* y *Dendrobium* en una concentración del 2%, obteniendo germinación y crecimiento de las mismas (Ernst & Rodríguez, 1984).

En los años setenta, diversos estudios de carácter fisiológico sobre embriones de orquídeas, se plantean utilizando sacarosa (Harrison & Arditti, 1978; Flamée, 1978), en especies como *Cattleya* y *Paphiopedillum*, obteniendo en general una germinación y crecimiento de las plántulas en casi un 100 %.

Arditti y Ernst en 1984 reportan que *Phalaenopsis* germina y crece bien en un medio que contenga sacarosa.

Más recientemente Rubluo *et al.*, en 1989 prueba distintas concentraciones de sacarosa en *Blettia urbana* y obtienen como resultados porcentajes de germinación del 100 %.

Así mismo Tsutsui y Tomita (1990), obtienen un crecimiento de plántulas de *Spiranthes sinensis* al utilizar sacarosa y manitol al 1 %.

### **Efecto de los Carbohidratos en la Germinación de *Laelia spp.***

Hasta ahora, se cuenta con escasos reportes de estudios realizados en éste género y sobre todo de carácter fisiológico; entre ellos se encuentra el trabajo de Bernard en 1909, quien utilizó sacarosa para germinar semillas de *Laelia sp* (Arditti, 1967).

Ichihashi (1979), reporto que un buen crecimiento y desarrollo de *Laelia anceps*, se obtiene al utilizar sacarosa al 2 %.

Lee *et al.*, (1982) determinaron el efecto de sacarosa en semillas de *Laelia briegei* sobre diversos medios de cultivo, reportando que el crecimiento óptimo de las plántulas se presentó con sacarosa a una concentración del 3 y 4 %.

En 1993, Luna y Barba realizaron experimentos sobre el desarrollo morfológico de las semillas de *Laelia speciosa* durante la germinación asimbiótica *in vitro*, bajo el efecto de tres diferentes carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) en concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 %. Se calculó el índice de crecimiento durante cada 10 días y hasta los 90. Encontraron que los tres carbohidratos inducen el desarrollo fisiológico de los embriones, aunque existen diferencias en el índice de crecimiento debidas al tipo y concentración del carbohidrato adicionado. Sin embargo, la sacarosa y glucosa indujeron un desarrollo de protocormos más rápido con respecto a la fructosa, además las concentraciones que favorecen el desarrollo hasta el estadio de plántula se encontró en el rango de 3 al 5 %.

Stancato y Faria (1996), trabajaron con *Laelia cinnabarina* encontrando que hay una germinación por encima del 80 % en un medio Murashige-Skoog adicionado con 20 g/l de sacarosa.

Velázquez (1997), trabajo con sacarosa, glucosa y fructosa, en *Laelia speciosa*, encontrando que la sacarosa en una concentración de 1 al 5 %, es el mejor carbohidrato promotor del desarrollo de las semillas, seguido de la glucosa y finalmente la fructosa, así también reporta que la glucosa es el mejor carbohidrato que promueve la proliferación de brotes y raíces.

En cuanto al manitol no se tienen reportes del efecto que tiene éste sobre la germinación en las semillas del género *Laelia*.

## Descripción Botánica de *Laelia speciosa*.

*Laelia speciosa* es una especie epífita, muy apreciada como ornamental debido a la belleza de su flores, la floración inicia en mayo y finaliza a mediados de junio. Cada inflorescencia mide aproximadamente de 12-20 cm, y porta generalmente una flor, aunque también se han observado plantas con dos flores, éstas miden de 10 a 15 centímetros de diámetro, de color rosa-lila claro hasta oscuro.

Los sépalos son lanceolados y los pétalos son del doble de ancho; el labelo es blanco con líneas rojas en el centro, tiene dos lóbulos laterales que envuelven a la columna con el mismo aspecto que el de *Cattleya* (Caneva, 1978); el lóbulo medio del labelo es casi redondo y de color rosa-lila en los bordes, el centro es más claro y con un diseño más o menos de puntos y rayas de color púrpura. Las flores tienen una tenue fragancia semejante al de las violetas (Fig. 1).

Presentan pseudobulbos globosos u ovoides de aproximadamente 6 cm de largo y 0.3 a 5.0 cm de diámetro estrechamente agrupados, coronadas con una o dos hojas carnosas siempre verdes y rígidas, lanceoladas, suculentas, coriáceas que miden usualmente de 0.5 a 25.0 cm de longitud y de 0.3 a 5.0 cm de ancho.

La fructificación también es estacional, la producción de frutos se inicia en la época de sequía y su proceso de desarrollo y maduración abarca cerca de 10 meses. El crecimiento es simpodial, compuesto por una sucesión de brotes similares (pseudobulbos), los cuales se dividen en una región basal-rizomatosa y una erecta (Halbinger, 1993).

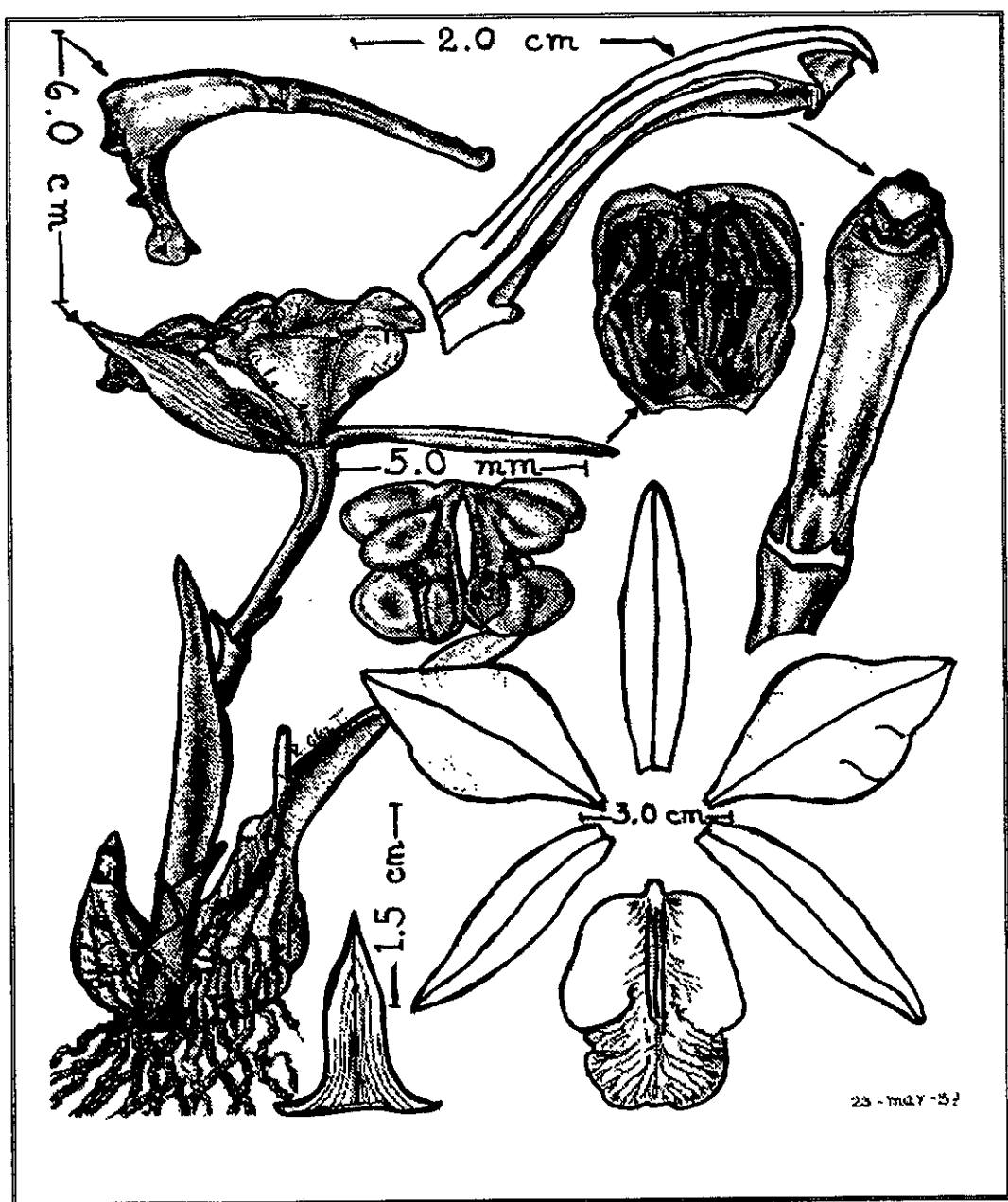


Fig. 1. Planta de *Laelia speciosa* mostrando pseudobulbos y flor (Tomado de Halbinger, 1993).

## Ecología de *Laelia speciosa*.

La mayoría de las plantas del género *Laelia* prefieren como árboles hospederos a numerosas especies de encino, que forman bosques abiertos caducifolios, desde los 100 a los 2700 metros de altitud. La época de floración de las distintas especies de *Laelia* se extiende prácticamente durante todo el año con la mayoría de ellas floreciendo en otoño (Halbinger, 1993)

A *Laelia speciosa* se le considera como una de las especies mas bellas del género y quizá una de las más notables de todas las orquídeas. Es una especie epífita, perenne y pequeña, de afinidad xerófila, endémica a el Altiplano Central de México, presenta flores de gran tamaño, y por ello es una de las especies más saqueadas (Soto & Hágsater, 1990).

Se distribuye en bosques de encinos achaparrados y abiertos, especialmente sobre *Quercus deserticola*, entre los 2000 m y 2400 m de altitud, aunque también puede encontrarse ocasionalmente en otras comunidades como matorrales xerófilos y bosques húmedos de pino-encino, soporta largas sequías de diciembre a junio y tolera grandes periodos con temperatura abajo de 0° C (Halbinger, 1993).

*Laelia speciosa* se localiza en los estados de Zacatecas, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas, sus poblaciones son escasas y poco extensas. Las que tienen mayor número de individuos son las de Michoacán, Jalisco e Hidalgo (Soto, 1990).

Hay una infinita variedad floral, tanto en tamaño como en forma y colorido. El diseño del labelo es tan variable como las huellas digitales y por tanto se puede decir que cada flor es diferente. Son bastante raras las flores completamente blancas pero si se conoce un buen número de ellas.

Las flores son muy hermosas, con delicados tonos; aunque también son muy solicitadas por los comerciantes las flores con colorido muy intenso y contrastante. Se sabe que las flores más grandes y de mejor forma provienen de Michoacán (Halbinger, 1993).

## CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

El género *Laelia* fue descrito por Lindley en 1831. Es uno de los géneros más grandes del Nuevo Mundo, extendiéndose desde Cuba y México hasta Brasil y Argentina (Wiard, 1987). Este género es muy semejante al de *Cattleya*, botánicamente no se diferencian mucho, *Laelia* tiene ocho polinios en dos series que son poco desiguales (fueron observadas por primera vez por Bentham y Hooker), en tanto *Cattleya* sólo presenta cuatro (Williams, 1973).

*Laelia speciosa* es una de las primeras orquídeas mexicanas que se citan en la literatura científica. El sacerdote jesuita Francisco Hernández, médico de Felipe II de España, menciona a ésta orquídea en su obra "De la Naturaleza de las Plantas y Animales de la Nueva España", de 1615. El Barón Alexander von Humbolt encontró la planta en uno de sus viajes por México y su colaborador, Karl S. Kunth, la describió en 1815 como *Bletia speciosa*.

Los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Lexarza, describieron ésta misma orquídea como *Bletia grandiflora* en 1825 y John Lyndley de nueva cuenta la describió como *Laelia majalis*. Finalmente Rudolf Schlechter estableció la combinación actual en 1914, *Laelia speciosa*.

En México es conocida comúnmente con los nombres de "Flor de Mayo", "Flor Grande", "Flor de Corpus", "Tlacuxóchitl", "Deantza", "Itzamahua", "Chichiltictepetzacuxóchitl", entre otros nombres (Halbinger, 1993).

Su clasificación taxonómica según Cronquist (1981) y Dressler (1993) es la siguiente:

Reino:	Vegetal
División:	Spermatophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Liliadae
Orden:	Orchidales
Familia:	Orchidaceae
Subfamilia:	Epidendroidae
Tribu:	Epidendreae
Subtribu:	Laeliinae
Género:	<i>Laelia</i>
Especie:	<i>Laelia speciosa</i> (H.B.K.) Schltr.

## **OBJETIVOS.**

### **GENERAL:**

- Determinar el efecto de la exposición limitada que ejerce el manitol y la sacarosa durante la germinación *in vitro* de *Laelia speciosa*.

### **PARTICULAR:**

- Determinar la viabilidad de las semillas de *Laelia speciosa*.
- Establecer la diferencia de respuesta morfológica del embrión durante su germinación al utilizar manitol y sacarosa, esterilizados en autoclave y por filtración.
- Determinar el tiempo mínimo requerido del estímulo con manitol y sacarosa para inducir la respuesta morfológica del embrión durante la germinación.
- Evaluar el porcentaje de plántulas con raíz a los 98 días de iniciada la siembra.

## **HIPÓTESIS**

El hongo micorrízico que se asocia naturalmente con las orquídeas las provee de azúcares simples y otros nutrientes durante su germinación y desarrollo. Sin embargo, el hongo será necesario hasta que las plántulas hallan alcanzado un estado de desarrollo tal que sean capaces de fotosintetizar. En condiciones asimbióticas *in vitro*, las funciones del hongo son sustituidas por los carbohidratos adicionados en el medio de cultivo y al estimular las semillas de *Laelia speciosa* durante un período de tiempo determinado con sacarosa y manitol, podrán continuar su desarrollo durante la germinación sin el estímulo del carbohidrato.



# MATERIAL Y MÉTODO

## Material Biológico.

La recolecta del material biológico se hizo en la Localidad de Coenembo Michoacán, donde existe una población de esta especie (Hernández, 1992). Se localizaron epífitas sobre ramas de encino y posteriormente se llevó a cabo la recolecta de cápsulas (frutos) de aproximadamente 9 meses de edad, los cuales presentaban una coloración verde intensa, de tamaño regular y sin la presencia de plagas o telarañas y además que se encontraran cerrados, de éste modo se obtuvo el lote de semillas para cada fruto (Thompson, 1980).

## Almacenamiento de semillas.

El transporte de los frutos al laboratorio se realizó en bolsas de papel, y se almacenaron dentro de frascos limpios y secos, cubiertos con una malla de nylon; éstos se guardaron dentro de un desecador con cloruro de calcio anhidro, de éste modo se pudieron tener semillas disponibles por largos periodos de tiempo (Thompson, 1980).

## Prueba de viabilidad.

Esta prueba se realizó mediante el método bioquímico del tetrazolio (2,3,5, trifeniltetrazolio) desarrollado por Låkon en 1949, (Moreno, 1984).

Se colocaron semillas de dos frutos en pequeños sobres de papel filtro (2x2 cm), los que se sumergieron en etanol al 70% durante 5 minutos, posteriormente fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio comercial con 0.6 % de cloro disponible, durante 10 minutos de acuerdo a Velázquez (1997), con el fin de permitir una mayor permeabilidad de la testa y lograr una buena tinción del embrión

Después de esto se realizaron tres enjuagues con agua y se colocaron en una solución de tetrazolio al 1% durante 24 hrs, en obscuridad a una temperatura que osciló entre  $23^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$ . Después de este tiempo los sobres fueron retirados de la solución de tetrazolio y se realizaron nuevamente tres enjuagues, por último se cubrieron con agua destilada, ya que al secarse las partes teñidas toman diferentes tonos.

Las semillas dentro de los sobres se observaron bajo el microscopio estereoscópico y se tomaron al azar cuatro lotes de 50, de las cuales se contaron las teñidas para posteriormente calcular el porcentaje de viabilidad de éstas mediante un rango de tolerancia máxima (Moreno, 1984).

## **Cultivo *in vitro*.**

### **Medio de cultivo.**

La germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas de *Laelia speciosa* se llevo a cabo en un medio de cultivo semisólido, en la cual se emplearon las sales basales de Murashige-Skoog (MS) adicionadas con vitaminas, mio-inositol, carbohidratos y agar gel como agente solidificante (Tabla 1).

### **Carbohidratos experimentales.**

Los carbohidratos que se utilizaron como fuente de energía para la germinación asimbiótica de las semillas durante este estudio fueron sacarosa y manitol. El primero es un disacárido y se localiza en los vegetales comúnmente, el manitol es un poliol de 6 carbonos y es de origen fúngico. Cada uno de los carbohidratos experimentales se emplearon a una concentración de 30 g/l añadiéndolos por separado al medio MS; ya que Velázquez (1997) empleó esta concentración para la especie estudiada reportándola como eficiente para su desarrollo.

### **Ajuste de pH y esterilización del medio de cultivo.**

El pH del medio de cultivo se ajustó a un valor de 5.7, con ayuda de un potenciómetro digital mediante la adición de una solución ácida o básica (NaOH ó HCl), según se requirió.

El medio de cultivo, una vez preparado, se esterilizó en una autoclave horizontal, a una presión de 1.5 kg./cm<sup>2</sup> y una temperatura de 120° C durante 15 minutos.

Los carbohidratos experimentales se esterilizaron de dos formas (Tabla 2): en una se adicionó al medio y se esterilizó en autoclave, en la otra el carbohidrato se agregó disuelto a través de un filtro fillipore con membrana de porosidad de 0.45 µm al medio nutritivo el cual estaba previamente esterilizado.

El medio se vació a tubos de ensaye, agregando 15 ml en cada uno.

NUTRIENTES	CANTIDAD
<b>MACRONUTRIENTES</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/l
MgSO <sub>4</sub>	180.7 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
KNO <sub>3</sub>	1900 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	332.2 mg/l
<b>MICRONUTRIENTES</b>	
ZnSO <sub>4</sub>	8.6 mg/l
CoCl <sub>2</sub>	0.025 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.02 mg/l
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	16.9 mg/l
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0.25 mg/l
KI	0.83 mg/l
EDTA Na <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	37.26 mg/l
FeSO <sub>4</sub>	27.8 mg/l
<b>INOSITOL</b>	
Mio-inositol	100 mg/l
<b>VITAMINAS</b>	
Tiamina HCl	0.4 mg/l
Niacina	0.5 mg/l
Piridoxina HCl	0.1 mg/l
<b>FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA</b>	
Carbohidratos	30 g/l
<b>AGENTE SOLIDIFICANTE</b>	
Agar-gel (Sigma)	5 g/l

**TABLA 1.** Composición del medio de cultivo.

CARBOHIDRATO	TIPO DE ESTERILIZACIÓN DEL CARBOHIDRATO	
	POR FILTRACIÓN	EN AUTOCLAVE
SACAROSA	SF	SA
MANITOL	MF	MA

SF: Sacarosa esterilizada por filtración. SA: Sacarosa esterilizada en autoclave.

MA: Manitol esterilizado en autoclave MF: Manitol esterilizado por filtración.

**TABLA 2.** Esterilización de los carbohidratos experimentales.

### **Desinfestación, siembra e incubación del material biológico.**

Previo a la siembra se colocaron 50 semillas dentro de sobres de papel filtro (2x2 cm). Las cuales fueron desinfestadas en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio con 0.6 % de cloro disponible, durante 10 minutos (Velázquez, 1997), después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Finalmente se colocó un sobre en cada tubo con medio de cultivo, haciendo un total de 45 réplicas para cada uno de los 4 tratamientos (Tabla 2).

Todo esto se realizó en una sala previamente esterilizada con luz UV, en una campana de flujo laminar, la cual se le hizo funcionar 30 minutos antes de iniciar cualquier maniobra de sembrado y se desinfectó la superficie con etanol al 70%. Las semillas una vez sembradas se colocaron en la sala de incubación donde se mantuvieron a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 hrs de oscuridad, con una iluminación de 4670 lux utilizando 6 lámparas de luz blanca fluorescente de 75 watts.

## Diseño Experimental.

### Efecto del Estimulo del Carbohidrato al Inicio de la Germinación.

Para determinar el efecto del estímulo del manitol y sacarosa sobre la respuesta morfológica del embrión, fueron transferidas 5 réplicas de cada tratamiento a un medio MS sin carbohidrato a diferentes tiempos seleccionados (Tabla 3). Cinco réplicas de cada tratamiento permanecieron como testigos manteniéndolos hasta 98 días en medio MS con el carbohidrato experimental.

DÍAS DE EXPOSICIÓN	TIPO DE ESTERILIZACIÓN			
	MA	MF	SA	SF
7	5*	5	5	5
15	5	5	5	5
21	5	5	5	5
30	5	5	5	5
38	5	5	5	5
45	5	5	5	5
52	5	5	5	5
60	5	5	5	5
98	5	5	5	5

\* Número de réplicas

**TABLA 3.** Periodos de exposición de semillas de *L. speciosa* a los carbohidratos experimentales antes de ser transferidos a un medio sin carbohidrato.

# Evaluación del Desarrollo y Germinación.

## Germinación.

La germinación es una forma directa de evaluar la viabilidad de las semillas, ésta se registró cada 7 días, al sumar el número de las semillas para cada réplica, que se encontraban del estadio 2 al 6 (Tabla 4), expresando este número como un porcentaje del número total de individuos evaluados.

## Índice de desarrollo.

Para seguir el desarrollo de forma cuantitativa y establecer la diferencia de respuesta morfogénica del embrión durante su germinación al utilizar manitol y sacarosa esterilizados en autoclave y en frío, cada 7 días se observaron y contaron las semillas o plántulas en cada réplica y se les asignó un valor a cada estadio de desarrollo del embrión (Harrison & Arditti, 1978), durante 98 días (Tabla 4, fig. 2).

El índice de desarrollo se calculó, para cada réplica, registrando la frecuencia de cada valor expresado como un porcentaje del número total de individuos evaluados. Estos porcentajes fueron multiplicados por el valor de sus respectivos estadios asignados, finalmente fueron sumados y el total se consideró como el valor del índice de desarrollo.

$$ID = \sum_{x=1}^{x=6} (e_x / e) (x) (100)$$

$e_x$  = número de semillas en un estadio

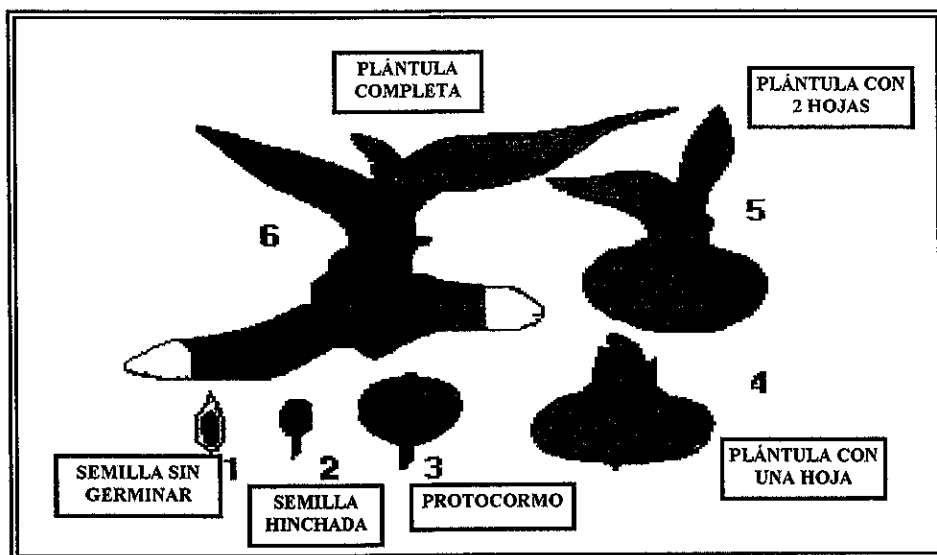
$e$  = número total de semillas

$x$  = valor del estadio

Se observó el desarrollo morfológico de éstas semillas, determinando el porcentaje de plántulas con raíz verdadera (estadio 6) hasta el final del cultivo; evaluando cada tratamiento durante 98 días.

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS	INDICE DE DESARROLLO
1	Semilla sin germinar.	100
2	Semilla hinchada.	200
3	Protocormo.	300
4	Plántula con una hoja.	400
5	Plántula con dos hojas .	500
6	Plántula con raíz verdadera	600

TABLA 4. Estadios de desarrollo del embrión considerados durante su germinación establecidos como criterios por Harrison & Arditti (1978).



Tomado de Arditti, 1967.

FIG. 2. Estadios de desarrollo del embrión de *Laelia speciosa*.

## **Diseño Estadístico.**

A los resultados de la germinación y el índice de desarrollo, se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el sistema de análisis estadístico computarizado Statical Analysis System (SAS ver. 6.08), para conocer si existía una diferencia significativa entre los tratamientos y establecer la respuesta morfogénica del embrión por la exposición limitada de los carbohidratos en el inicio de la germinación.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### VIABILIDAD.

Los resultados obtenidos en la prueba de viabilidad, indicaron que el 51 % de los embriones de las semillas de *Laelia speciosa* del fruto 1 se tomaron de color rojizo, mientras que en el fruto 2 entre 86 y 90 % de embriones se tiñeron (Tabla 5), por lo que se eligió a éste para realizar la prueba. Su coloración varió desde rojo intenso hasta anaranjado, lo que concuerda con los reportes de Shoushtari *et al.*, (1994) quienes mencionan que los embriones viables de semillas de orquídeas, se tiñen desde una coloración rojo intenso hasta un color naranja. El porcentaje promedio de viabilidad de las semillas fue de 87 %.

La prueba de viabilidad con tetrazolio permitió estimar de forma rápida, la condición biológica de las semillas, ya que este compuesto reacciona con ciertas enzimas de las células vivas, donde se da la reducción del tetrazolio formándose un compuesto rojo, este color es indicador de la presencia de células vivas en el embrión y la no coloración de las semillas indica la muerte o poca viabilidad de las células embrionarias.

Esta prueba de viabilidad fue aceptada, ya que la variación entre repeticiones no excede los rangos de tolerancia máxima permitidos (Moreno, 1984).

REPETICIONES PARA FRUTO 2 (% DE SEMILLAS TEÑIDAS)						
1	2	3	4	PROMEDIO	VARIACIÓN	TOLERANCIA
86	90	86	88	87	4	13

**TABLA 5.** Viabilidad de semillas de *Laelia speciosa* mediante la prueba de tetrazolio.

## GERMINACIÓN.

Los criterios de germinación en orquídeas varían de acuerdo a los diferentes autores, entre ellos están: Harrison y Arditti (1978), quienes mencionan que durante la germinación el pequeño embrión se hincha y eventualmente rompe la testa.

Bechtel *et al.*, (1985) mencionan que Harley en 1959, consideró la primera etapa de desarrollo del embrión cuando absorbe agua, se hincha y sale de la testa.

Wirth y Withner (1959) señalan que en el momento de la germinación en el embrión, hay una masa de células similares sin áreas conspicuas de diferenciación y que éstas áreas aparecen sólo después de la germinación.

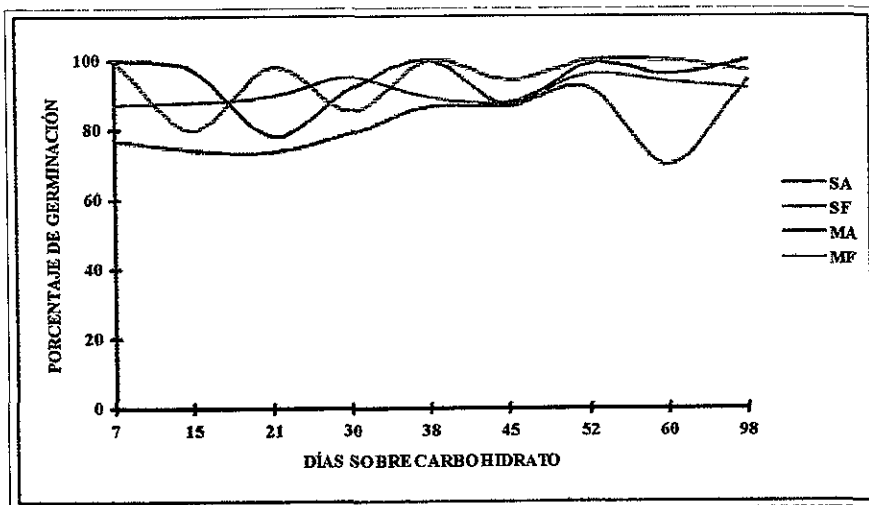
Baker *et al.*, (1987) indican que el proceso de germinación inicia con un hinchamiento del embrión hasta que la etapa de una pequeña esférula es alcanzada. Hadley y Pegg (1989) consideran a la germinación como las etapas secuenciales en el proceso de crecimiento de protocormos.

Smreciu y Currah (1989) consideran que el inicio de la germinación es cuando el embrión se hincha y la testa se rompe. Más recientemente Zettler y Mcinnis (1992) mencionan que el rompimiento de la testa es el inicio de la germinación. St-Arnaud *et al.*, (1992) indican que la germinación inicia con la etapa globular sin un apéndice visible.

Shoushtari *et al.*, (1994) señalan que el proceso de germinación inicia cuando los embriones se tornan verdes; sin embargo, Arditti (1967) menciona que los embriones hinchados no siempre toman una coloración verde.

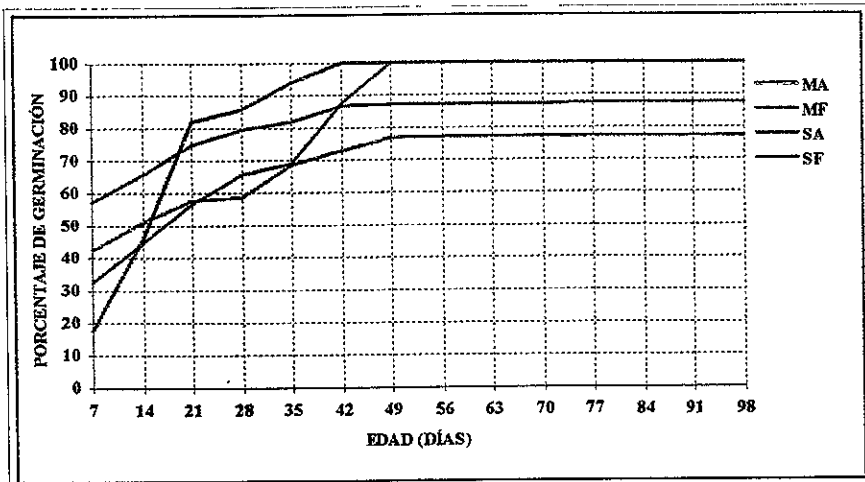
De acuerdo a estos criterios en esta investigación, se consideró como el inicio de la germinación cuando el embrión se encontraba hinchado y rompía la testa, sin importar si presentaba o no una coloración verde.

Los porcentajes de germinación fueron similares para todos los tratamientos y tiempos de exposición, en general superaron el 70 % y algunos lotes alcanzaron hasta el 100 % de semillas germinadas, las semillas estimuladas durante 60 días con manitol fueron las que presentaron el menor porcentaje de germinación desde el inicio del cultivo y hasta los 98 días de edad mantuvieron un porcentaje de 70 %. Esto se debió al mismo lote de semillas, ya que estas fueron obtenidas de una muestra colectada de campo, genéticamente heterogénea. Durante la germinación de las semillas no existieron diferencias estadísticas significativas entre el estímulo con los dos diferentes carbohidratos, ni entre los tiempos de exposición a los mismos ( $P > 0.05$ ) (Gráfica 1).



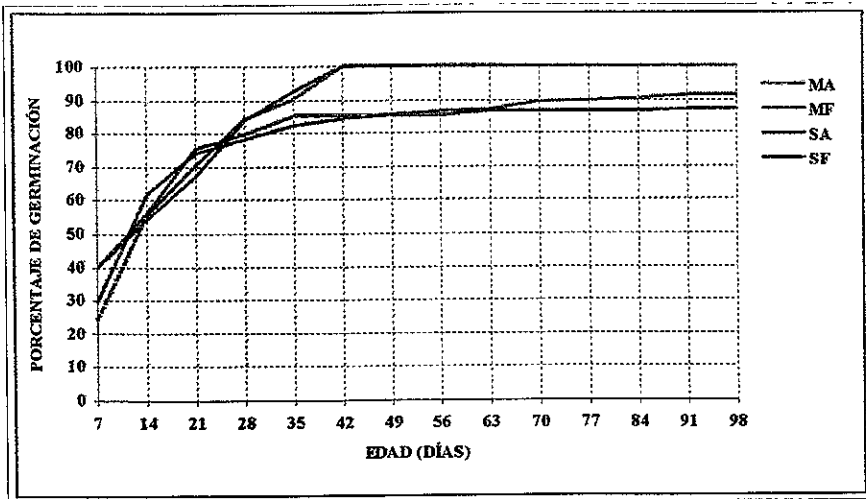
**GRÁFICA 1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Laelia speciosa* A LOS 98 DÍAS DE CULTIVO POR EFECTO DEL ESTÍMULO CON SACAROSA Y MANITOL .**

Las semillas estimuladas por 7 días con los carbohidratos (Gráfica 2), presentaron a los 7 días de edad porcentajes de germinación que variaron entre 18 y 58 % , siendo las semillas en presencia de SA las que tuvieron el menor porcentaje y las estimuladas con MF el mayor. Sin embargo, a los 21 días de edad las semillas en presencia de SA alcanzaron un porcentaje de 80 %, mientras que aquellas en presencia de MF alcanzaron el mismo porcentaje a los 28 días de edad. En las semillas estimuladas con SF los porcentajes de germinación fueron menores al 70 % durante los primeros 28 días de edad y entre los 35 y 42 días de edad alcanzaron el 80 % de germinación. La germinación de las semillas en presencia de MA fue más lenta en comparación con los otros tratamientos, alcanzando el 70 % de germinación a los 35 días de edad. El 100 % de germinación sólo se alcanzó con las semillas estimuladas con sacarosa, ya sea esterilizada en autoclave o por filtración, a los 42 y 49 días de edad respectivamente. El máximo porcentaje de germinación en las semillas en presencia de manitol filtrado se presentó a partir de los 42 días de edad y fue alrededor del 85 %, mientras que para el caso de las semillas estimuladas con MA, el máximo porcentaje de germinación se presentó a los 49 días de edad y fue superior al 75 %.



**GRÁFICA 2 . EFECTO DE 7 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Laelia speciosa*.**

Cuando las semillas fueron estimuladas por 38 días con los carbohidratos (Gráfica 3), estas se comportaron de manera similar en los cuatro tratamientos durante los primeros 28 días de edad, los porcentajes de germinación a los 7 días de edad variaron entre 25 y 40 %, el porcentaje menor corresponde a las semillas con SA y el mayor a las semillas con SF y MA. A los 35 días de edad las semillas en presencia de sacarosa, ya sea esterilizada en autoclave o filtrada superaron el 90 % de germinación, mientras que las semillas estimuladas con manitol, esterilizado en autoclave o filtrado, superaron el 80 % de germinación. El 100 % de germinación se logró nuevamente en las semillas estimuladas con SA y SF a los 42 días de edad, por otra parte las semillas en presencia de MF alcanzaron un porcentaje de germinación de 90 % a los 70 días de edad y aquellas estimuladas en presencia de MA alcanzaron finalmente un 87 % de germinación.



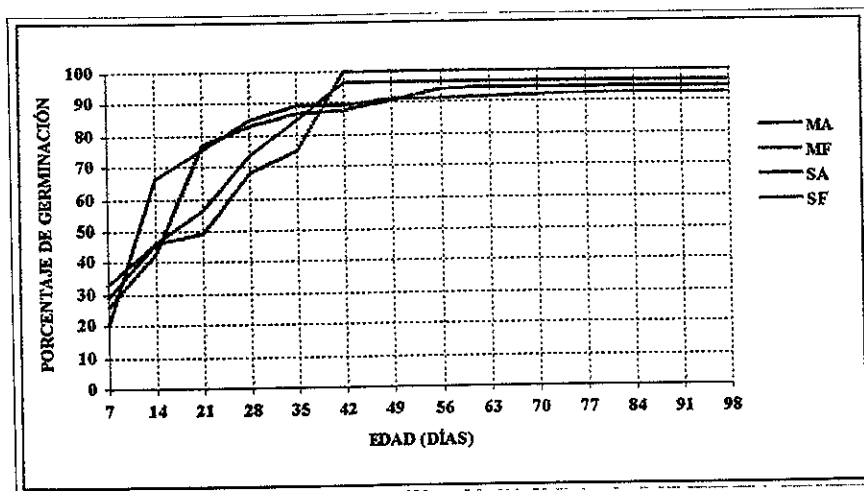
**GRÁFICA 3. EFECTO DE 38 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Laelia speciosa*.**

Los porcentajes de germinación en las semillas estimuladas durante 98 días con ambos carbohidratos (Gráfica 4), varió entre los cuatro tratamientos durante los primeros 35 días de edad, a los 7 días de edad las semillas estimuladas con MF y MA se mantuvieron con un 20 y 26 % de germinación respectivamente y aquellas en presencia de SA y SF tuvieron un 29 y 33% de germinación. Las semillas estimuladas con sacarosa alcanzaron el máximo porcentaje de germinación a los 42 días de edad, las que se encontraban en presencia de SA alcanzaron el 100 % de germinación, y las estimuladas con SF mantuvieron un 97% de germinación. Por otra parte las semillas en presencia de manitol alcanzaron el máximo porcentaje de germinación a los 56 días de edad, siendo de 94 % para MA y 93 % para MF.

Shoushtari *et al.*, (1994) mencionan que los porcentaje de germinación en orquídeas, cuando las semillas son frescas y usadas por primera vez, varían desde un 80 a un 100 % sobre sacarosa; sin embargo, los resultados muestran que después de un mes de almacenamiento, el porcentaje de germinación puede bajar y para las semillas de *Laelia speciosa* varió, en general entre 70 y 100 %.

Los resultados de la prueba de viabilidad con tetrazolio y las pruebas de germinación que se efectúan en forma adecuada, generalmente están en estrecha concordancia dentro de los límites normales de variación (Moreno, 1984) (Tabla 5), por lo cual los resultados demuestran ésta concordancia, ya que el promedio general de germinación fue de 89.3 %.

Estos resultados confirman lo establecido acerca de que el estímulo con carbohidratos sobre las semillas de orquídea disparan el proceso de germinación, aún cuando este estímulo halla sido suspendido en algún momento del proceso germinativo.



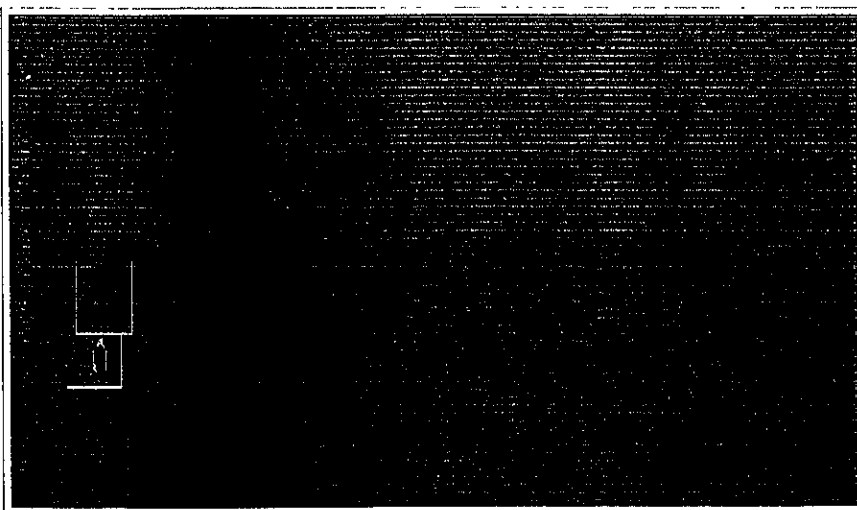
GRÁFICA 4. EFECTO DE 98 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Laelia speciosa*.

## EVALUACIÓN DEL DESARROLLO Y CRECIMIENTO.

### ÍNDICE DE DESARROLLO.

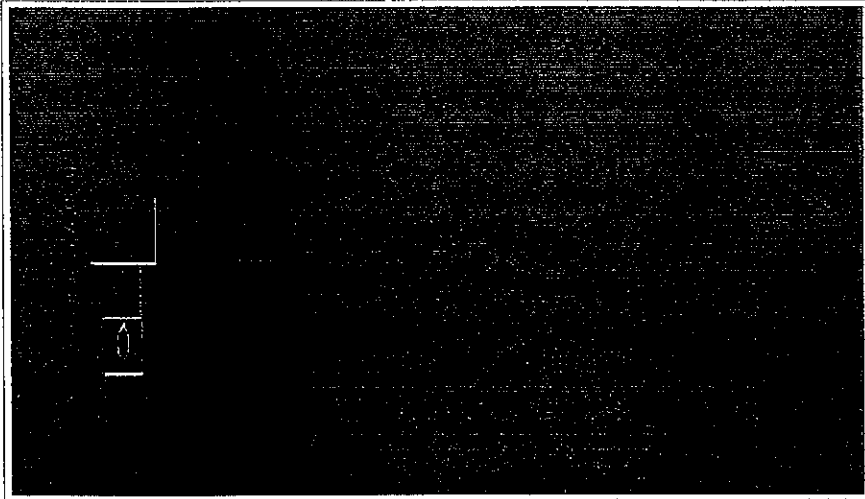
Durante la realización de esta investigación se pudo establecer el tiempo en que suceden los diferentes cambios morfogénicos del embrión por el efecto de sacarosa y manitol, por el tipo de esterilización de estos y por el tiempo de exposición al estímulo. Se observó que a los 7 días de cultivo, el índice de desarrollo fue de aproximadamente 150, lo que indica que un 50 % de las semillas se encontraban en estadio 2 de su desarrollo, es decir, hinchadas sin haber diferencias significativas entre los tratamientos a los 7 días de edad ( $P > 0.05$ ).

A partir de los 21 días y en adelante se presentaron diferencias significativas entre los carbohidratos, tiempo de exposición y tipo de esterilización de los mismos ( $P < 0.05$ ) aunque en la gráfica ésto no se vea a simple vista, sin embargo el análisis bifactorial indicó dos interacciones estadísticamente diferentes, una entre los carbohidratos y el tipo de esterilización ( $P < 0.05$ ) y otra entre los carbohidratos y el tiempo de exposición a los mismos ( $P < 0.05$ ) (Gráfica 5).



GRÁFICA 5. DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa* A LOS 21 DÍAS DE CULTIVO POR EL EFECTO DEL ESTÍMULO CON SACAROSA Y MANITOL .

A los 35 días de edad, las semillas expuestas a SA alcanzaron un índice de desarrollo de aproximadamente 250, esto muestra que el 50 % de éstas se encontraban en el estadio de protocormo, así mismo algunas de las semillas sobre SF alcanzaron este estadio, aunque las expuestas por 7 y 15 días al estímulo permanecieron hinchadas al igual que aquellas con MA y MF (Gráfica 6)

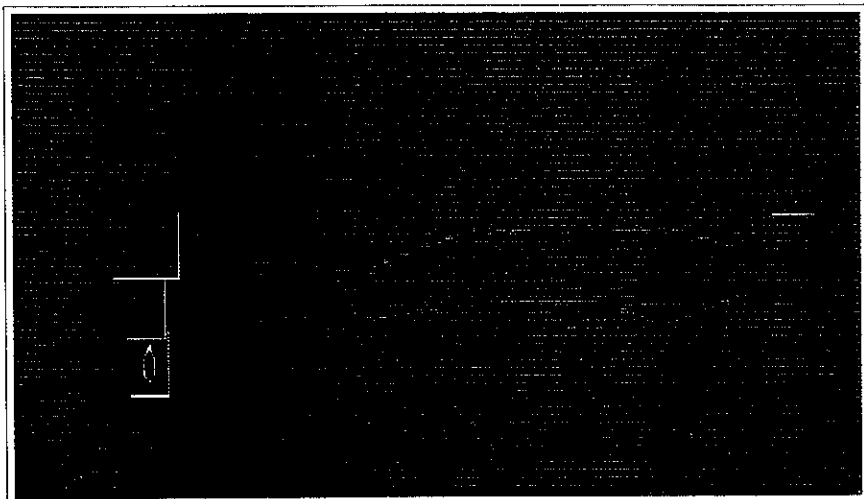


**GRÁFICA 6. DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa* A LOS 35 DÍAS DE CULTIVO POR EL EFECTO DEL ESTÍMULO CON SACAROSA Y MANITOL .**

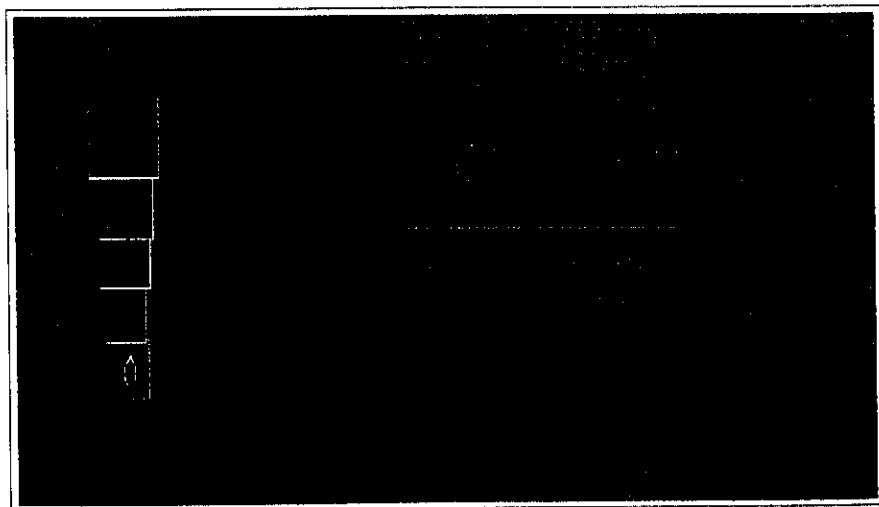
A los 42 días de edad las semillas estimuladas por 38 días con SA, alcanzaron un índice de desarrollo de 300 lo que indica que casi todas se encontraban en estadio de protocormo; las estimuladas el mismo periodo de tiempo con SF se encontraban por debajo de éste índice. Por otra parte las semillas en presencia de MA y MF permanecieron con un índice de desarrollo de 200; es decir hinchadas (Gráfica 7).

A medida que las semillas pasaron más tiempo en manitol se incrementó el índice de desarrollo, sobre todo aquellas que aún permanecían con el estímulo del carbohidrato; es decir las semillas testigo, ya que rebasaron el índice de desarrollo de 200, indicando que algunas de las semillas se encontraban en el estadio de protocormo, por otra parte a las que se les suprimió este estímulo, continuaron su desarrollo pero más lentamente.





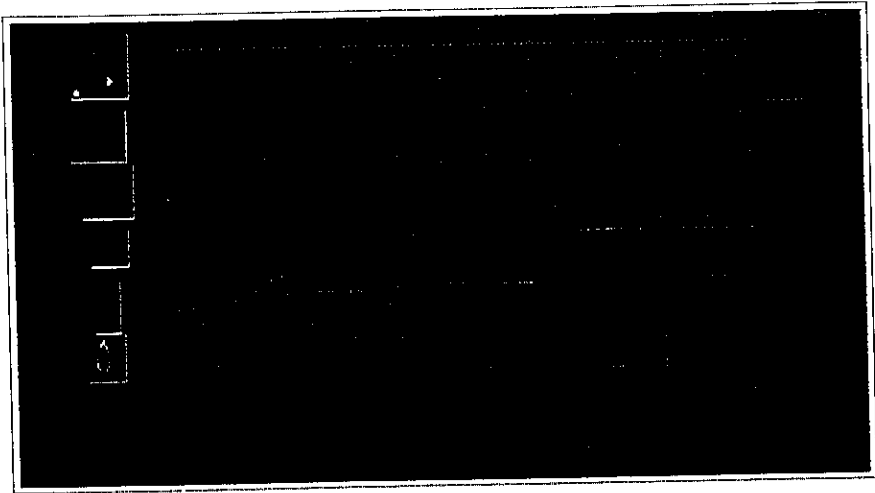
GRÁFICA 7. DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa* A LOS 42 DÍAS DE CULTIVO POR EL EFECTO DEL ESTÍMULO CON SACAROSA Y MANITOL .



GRÁFICA 8. DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa* A LOS 98 DÍAS DE CULTIVO POR EL EFECTO DEL ESTÍMULO CON SACAROSA Y MANITOL .

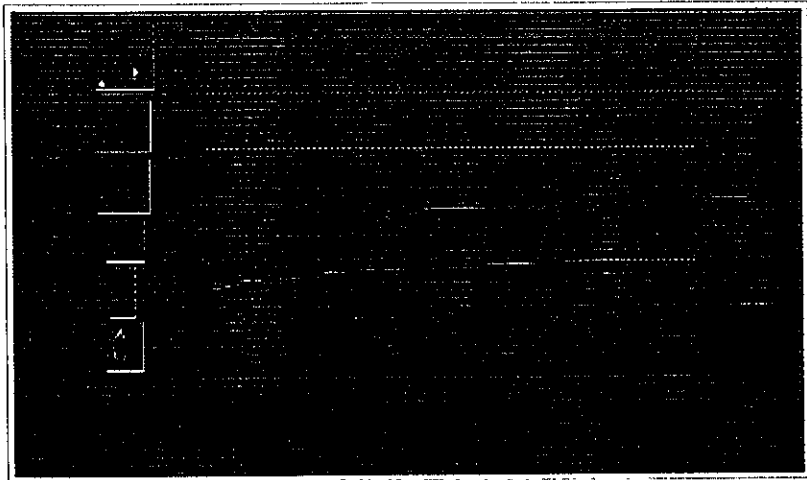
Para MA el máximo índice de desarrollo fue aproximado a 350 éste se alcanzó a los 98 días de cultivo con estímulo constante (Testigo), lo que indica la presencia de protocormos y algunas plántulas con una hoja y para las semillas expuestas a MF el máximo índice de desarrollo se aproximó a 250 y sólo para las que se mantuvieron estimuladas constantemente con el carbohidrato (Gráfica 8)

En la gráfica 9 se muestra el desarrollo que tienen las semillas que se expusieron durante 7 días a los carbohidratos y se observa que las semillas expuestas a la sacarosa alcanzaron a la edad de 49 días, el estadio de protocormo permaneciendo así hasta el final del cultivo (98 días de edad), en ambos tipos de esterilización. En el caso de las semillas expuestas al estímulo del manitol, éstas se encuentran como semillas y es a partir de los 63 días de edad que alcanzan un índice de desarrollo de 200 es decir el estadio de semilla hinchada para ambos tipos de esterilización.



**GRAFICA 9. EFECTO DE 7 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

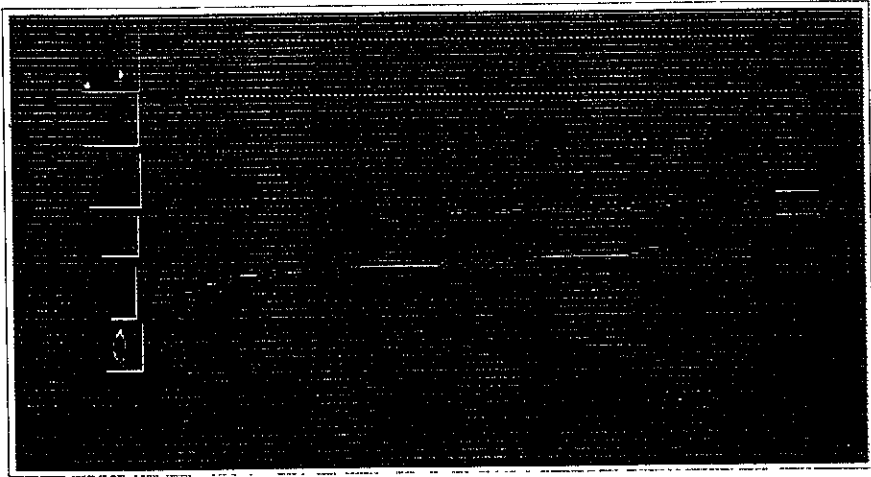
La respuesta que alcanzaron las semillas al estar 15 días estimuladas con los azúcares se muestra en la gráfica 10 en donde se observó que las semillas expuestas a SA, alcanzaron el estadio de hinchada a los 21 días de edad y a partir de los 49 días de edad alcanzaron el de protocormo, permaneciendo así hasta los 98 días. Las semilla expuestas a SF alcanzaron el estadio 2 de desarrollo a los 42 días de edad y sólo menos de la mitad de éstas alcanzaron un índice de desarrollo de 250 aproximadamente. Todas las semillas en presencia de MA y MF permanecieron hinchadas (ID=200) durante todo el cultivo, lo cual indico que un estímulo de 15 días no fue suficiente para que las semillas sobrepasen éste estadio.



**GRAFICA 10. EFECTO DE 15 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

Las semillas que se expusieron sólo por 21 días a SA y SF, alcanzaron el estadio 2 de desarrollo a los 28 días de edad, y llegaron al de protocormo a los 49 días de edad permaneciendo en este estadio hasta los 98 días de edad. Las semillas con el estímulo de SA tuvieron un desarrollo más rápido entre los 28 y 49 días de edad, después de este tiempo el desarrollo de las semillas fue más lento en comparación con las estimuladas con SF.

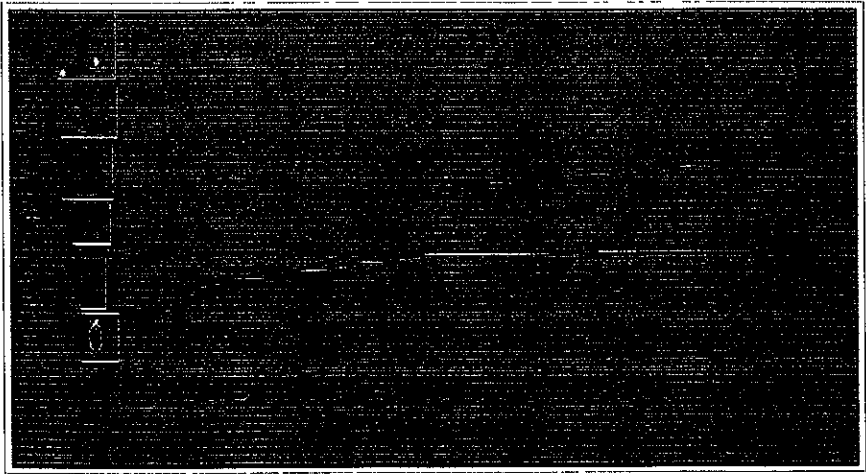
Por otra parte las expuestas al estímulo con MF permanecieron hinchadas a partir de los 63 días de edad y hasta el final del cultivo, rebasando el índice de desarrollo de 200, mientras que las estimuladas con MA permanecieron por debajo de 200 de índice de desarrollo (Gráfica 11).



**GRAFICA 11. EFECTO DE 21 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

Las semillas expuestas 30 días al estímulo de SA alcanzaron un índice de desarrollo de 200 entre los 21 y 28 días de edad, mientras que las expuestas a SF lo hicieron entre los 28 y 35 días; el estadio de protocormo se presentó entre los 28 y 42 días de edad (ID=300) en SA, y las semillas con el estímulo de SF entre los 35 y 63 días de edad; el estadio de protocormo fue rebasado a los 49 días de edad en las semillas inducidas con SA, en donde se presentaron algunas plántulas con una hoja. Por otra parte aquellas en presencia de SF no sobrepasaron el índice de desarrollo de 300.

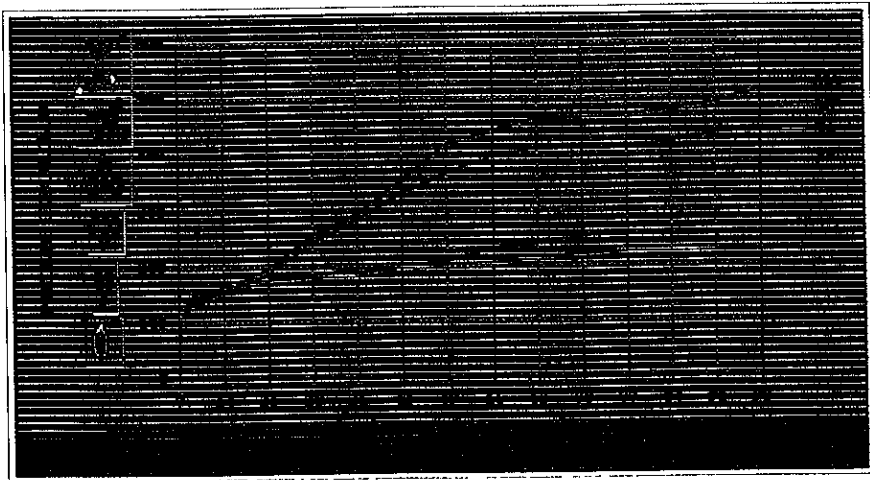
Aquellas semillas en presencia de MF y MA alcanzaron el estadio 2 de desarrollo entre los 35 y 42 días de edad y entre los 56 y 63 días respectivamente, rebasando éste estadio después de los 63 días de edad para ambos casos (Gráfica 12).



**GRAFICA 12. EFECTO DE 30 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

A los 21 días de edad, las semillas que se les suspendió el estímulo a los 38 días con SA y SF se encontraron hinchadas, a los 35 días de edad alcanzaron el estadio de protocormo sólo aquellas en presencia de SA, y entre los 35 y 42 días de edad en SF; la presencia de plántulas con una hoja se observó entre los 42 y 49 días de edad en SA y entre 56 y 63 días para aquellas semillas estimuladas con SF, sólo las semillas estimuladas con SA superaron el índice de desarrollo de 500 hacia el final del cultivo, se observaron plántulas con dos hojas y algunas con al menos una raíz verdadera.

El estímulo del manitol fue similar a las expuestas durante 30 días al carbohidrato, sin embargo el desarrollo fue más rápido con MA en comparación con las expuestas a MF, pero en ambos casos no se alcanzó el estadio de protocormo (Gráfica 13).

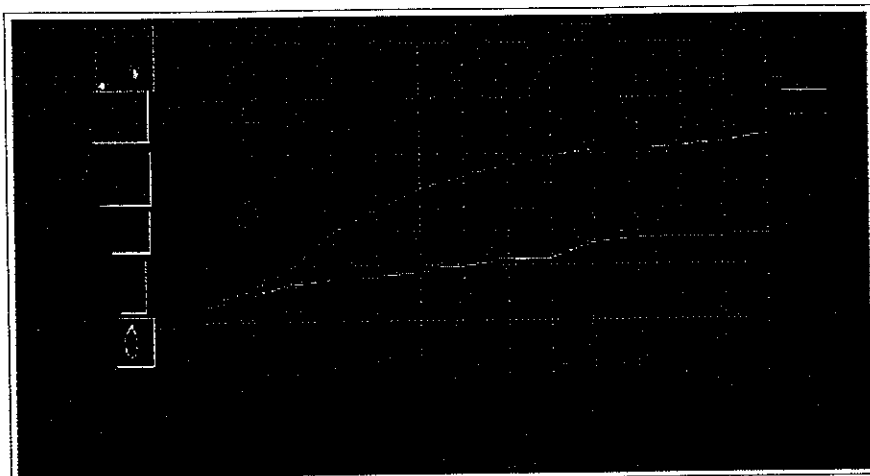


**GRAFICA 13. EFECTO DE 38 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

En la gráfica 14 se observa el desarrollo que tuvieron las semillas al ser estimuladas durante 45 días a los carbohidratos, así para SA el estadio de semilla hinchada se alcanzó entre los 14 y 21 días de edad, los protocormos aparecieron entre los 21 y 35 días de edad, las plántulas con una hoja entre los 35 y 63 días de edad, después de éste tiempo se presentaron algunas plántulas con dos hojas, es decir se sobrepaso el índice de desarrollo de 400.

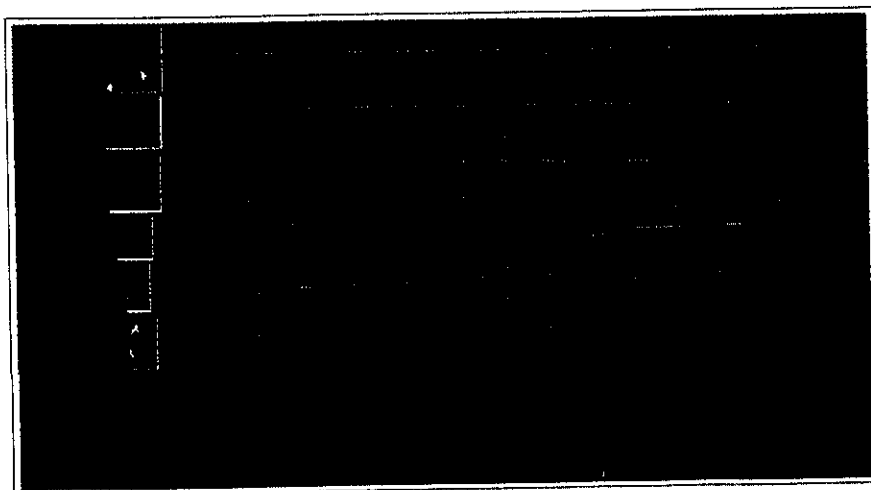
En el caso de las semillas estimuladas con SF, las hinchadas aparecieron entre los 21 y 28 días de edad, el estadio de protocormo se alcanzó entre los 28 y 56 días de edad, a partir de este tiempo y hasta el final del cultivo se sobrepaso el índice de desarrollo de 300.

Las semillas en presencia de MA, alcanzaron el estadio de semilla hinchada entre los 28 y 35 días de edad, los protocormos se empezaron a observar a partir de los 35 días de edad y hasta el final del cultivo; por otra parte las expuestas a MF alcanzaron el índice de desarrollo de 200 a los 49 días de edad y de éste en adelante se presentaron algunos protocormos, es decir alcanzaron un índice de desarrollo aproximado a 250.



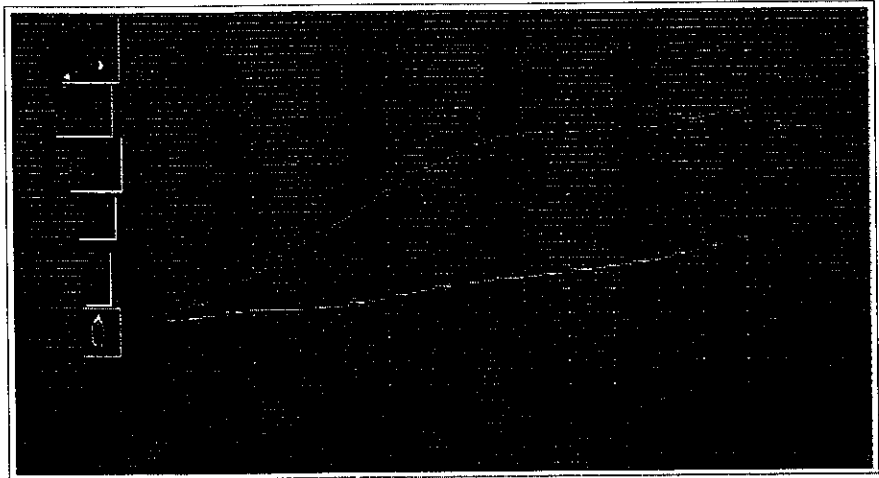
**GRAFICA 14. EFECTO DE 45 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

El desarrollo de las semillas expuestas durante 52 días al estímulo con los carbohidratos es similar al de 45 días, sin embargo hacia el final del cultivo las expuestas a SA y SF tuvieron un índice de desarrollo mayor y las expuestas a MF superaron el desarrollo de aquellas estimuladas con MA (Gráfica 15).



**GRAFICA 15. EFECTO DE 52 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

El estímulo de 60 días con SF y SA, es suficiente para que las semillas sobrepasen el estadio de protocormo y formen una y dos hojas respectivamente, el estímulo con MA sólo fue suficiente para que al final del cultivo las semillas sobrepasen el índice de desarrollo de 300, mientras que las estimuladas con MF no alcanzaron éste índice (Gráfica 16).

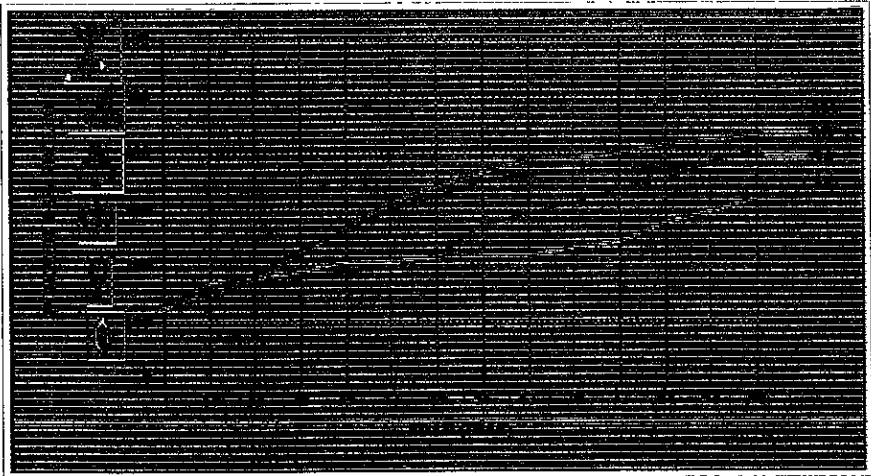


**GRAFICA 16. EFECTO DE 60 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

La influencia de los carbohidratos sobre las semillas expuestas durante 98 días se presenta en la gráfica 17, en donde se observó que aquellas en presencia de SA sobrepasaron el índice de desarrollo de 400 hasta el final del cultivo y las estimuladas con SF no alcanzaron éste índice de desarrollo, esto indicó que se formaron protocormos y algunas plántulas con una hoja.

El estímulo constante del manitol permitió que las semillas expuestas a este carbohidrato esterilizado en autoclave se desarrollaran hasta la formación de una hoja (ID=400), y que aquellas expuestas al manitol esterilizado por filtración sobrepasaran el índice de desarrollo de 300 es decir, se desarrollaron hasta la etapa de protocormo.





**GRAFICA 17. EFECTO DE 98 DÍAS DE EXPOSICIÓN AL ESTÍMULO DE SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Laelia speciosa*.**

El crecimiento de las plantas bajo condiciones *in vitro* es normalmente soportado por una fuente exógena de azúcar (Lipavská & Vreugdenhil, 1996). En orquídeas diversos autores confirman que sólo las series D de azúcares son útiles durante la germinación (Withner, 1959); sin embargo, Arditti (1972) menciona que las semillas de orquídea germinarán más rápido sobre azúcares simples como la sacarosa, glucosa y fructosa que sobre carbohidratos complejos como el almidón. Estos además de ser una fuente de carbono y energía para el embrión, son el estímulo disparador de su desarrollo morfológico durante su germinación (Luna & Barba, 1993).

Así, los dos carbohidratos utilizados resultaron ser una buena fuente de carbono para la germinación y desarrollo de las plántulas; sin embargo el desarrollo fue más rápido sobre sacarosa que sobre manitol.

Los resultados de esta investigación indicaron, que la sacarosa promueve el crecimiento y el desarrollo para las semillas de ésta especie, ya sea esterilizada en autoclave o por filtración, coincidiendo con lo reportado por Arditti y Ernst (1984) para las plántulas de *Phalenopsis*. Sin embargo, la apariencia de las plántulas (color, tamaño, vigor) de *L. speciosa* fue mejor cuando la sacarosa se adicionó al medio de cultivo y se esterilizó en autoclave, lo que provocó la hidrólisis de la sacarosa y suplemento otro tipo de azúcares como la glucosa y fructosa, que posiblemente el embrión no asimiló, aunque aún no está claro como afectan o utilizan éstos azúcares las semillas de orquídea (Ernst *et al.*, 1971).

El desarrollo de las semillas de *Laelia speciosa* sobre sacarosa fue muy similar al reportado para *Cattleya aurantiaca* donde las semillas se hinchan a los 8 días, pasan a la etapa de protocormo y empiezan a ponerse verdes a los 15 días; la primera hoja aparece entre 40 y 47 días y la segunda entre 0 y 90 días (Harrison & Arditti, 1978).

Harrison y Arditti (1978) reportaron que el porcentaje de protocormos de *Cattleya aurantiaca* que fueron transferidos a un medio sin sacarosa y que forman hojas, es directamente proporcional al período de tiempo que crecieron sobre un medio con sacarosa. Sin embargo, las semillas de *L. speciosa* o se comportaron de manera similar ya que el máximo índice de desarrollo se alcanzó con 38 días de exposición al medio con sacarosa y entre más tiempo permanezcan con éste estímulo el desarrollo es menor. Por el contrario, en el caso de manitol la relación sí fue directamente proporcional ya que entre más tiempo permanecieron las semillas con el carbohidrato mayor es el desarrollo que se alcanzó.

Los azúcares solubles detectados en los hongos de las orquídeas son la glucosa, trealosa y manitol, éstos azúcares fúngicos son útiles para las plántulas de orquídea, así como para una buena germinación (Tsutsui & Tomita, 1990; Arditti & Ernst, 1984).

El manitol es un azúcar alcoholado el cual es producido por algunas plántulas como producto secundario de la fotosíntesis y algunas plantas pueden metabolizarlo (Lipavská & Vreugdenhil, 1996).

Ernst (1967) reporta que el manitol fue una buena fuente de carbono para *Phalaenopsis* y *Androbium*, así como ciertos disacáridos (entre ellos la sacarosa), por otra parte Smith (1973) reporta que el manitol no fue útil para *Dactylorhiza purpurella* y *Bletilla hyacinthina*. Así mismo Tsutsui y Tomita (1990) reportan un buen crecimiento con manitol en condiciones simbióticas de *Spiranthes sinensis*, y un pobre crecimiento de *Liparis nervosa*.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las semillas estimuladas con manitol tienen un desarrollo más lento, ya que es sólo hasta los 98 días de edad que las semillas alcanzan la etapa de protocormo en el carbohidrato esterilizado por filtración y presentan una hoja en el carbohidrato esterilizado en autoclave.

En *Bletilla hyacinthina* se demostró que el manitol es absorbido por las plántulas, sin embargo, éste es muy lentamente convertido a otros metabolitos, lo que sugiere una aparente acumulación de manitol en los tejidos (Smith & Smith, 1973).

Lipavská y Vreugdenhil (1996) reportan que numerosas especies de plantas son consideradas como incapaces para metabolizar el manitol y que sus células toman éste muy lentamente, por otra parte Thompson, *et al.* (1986) menciona que el metabolismo de los azúcares alcoholados se da en órganos y tejidos específicos y requiere además de un sistema específico de transporte.

Arditti y Ernst (1984) reportan que las especies varían en su habilidad para germinar sobre diversos azúcares, por lo cual no se puede afirmar que el manitol no es una buena fuente de carbono para la especie estudiada, únicamente podemos inferir que probablemente la concentración que se utilizó debió afectar el desarrollo de las semillas o bien que las células de los embriones pudieron asimilar muy lentamente este carbohidrato y necesitan más tiempo del monitoreado en este estudio, para poder metabolizarlo por completo.

## TIEMPO MÍNIMO REQUERIDO DEL ESTÍMULO.

El tiempo mínimo requerido del estímulo con carbohidratos se determinó cuando el porcentaje de plántulas desarrolladas rebasó el 50 %. Considerando como desarrolladas aquellas plántulas que se encontraban del estadio 4 al 6; es decir las que presentaban una hoja hasta plántulas con al menos una raíz verdadera (Fig. 2).

Se observó que este porcentaje de plántulas sobrepasó el 50 % en las semillas con sacarosa esterilizada en autoclave a los 42 días de edad, expuestas sólo 38 días al estímulo (Tabla 6). Se debe tener presente que a este tiempo de observación, las que se expusieron de 7 a 38 días ya no se mantenían con el estímulo de la sacarosa y a pesar de ello hubo desarrollo de plántulas en las que se expusieron a éste de los 15 a los 38 días, aunque el porcentaje de plántulas no haya sobrepasado el 50 %; sin embargo las semillas que se expusieron por sólo 7 días a la sacarosa no alcanzaron a desarrollar plántulas, esto se debió a que el tiempo del estímulo no fue el suficiente para disparar el mecanismo de germinación por lo que se demuestra que se requiere de un estímulo más prolongado.

En el caso de SF, fue hasta los 56 días de edad que alcanzaron más del 50 % de plántulas desarrolladas, esto en las semillas que se encontraban con el estímulo de 38 días a la sacarosa. Las plántulas que permanecieron con el estímulo de SF (expuestas 60 y 98 días) desarrollan plántulas en más del 50 % pero éstas aún permanecen con el estímulo y por ello no pueden considerarse como tiempo mínimo.

Las observaciones hechas indican que las semillas requieren estar expuestas mínimo 38 días al estímulo con sacarosa con ambos tipos de esterilización, aunque los tiempos de desarrollo morfológico de más del 50 % de las plántulas sean distintos para cada caso, notando que este porcentaje se alcanza más rápido sobre las semillas que fueron estimuladas con sacarosa esterilizada en autoclave; esto puede explicarse debido a que el requerimiento de una fuente exógena de carbohidratos no es esencial después de que la primera hoja ha aparecido o bien, es potencialmente capaz de generarla (Harrison & Arditti, 1978; Arditti & Ernst, 1984), así el tiempo de éste estímulo le fue suficiente para almacenar el azúcar y así disparar sus procesos metabólicos.

Para *Cattleya aurantiaca*, una especie cercana al género *Laelia*, se ha reportado que la sacarosa esterilizada en autoclave es necesaria por un periodo de 40 días (Harrison & Arditti, 1978; Arditti, 1990). Las semillas de *L. speciosa* después de 38 días de exposición sobre sacarosa en autoclave llegaron a formar plántulas desarrolladas, éste tiempo de exposición puede ser alargado a 98 días; sin embargo se obtiene un mayor porcentaje de plántulas si sólo se exponen por 38 días (Tabla 6).

DÍAS CON ESTÍMULO	PORCENTAJE DE PLANTULAS			
	42 DÍAS		56 DÍAS	
	AUTOCLAVE	FILTRACIÓN	AUTOCLAVE	FILTRACIÓN
7	0	0	0	0
15	9.9	1.6	8.7	1.6
21	16.6	5.7	22.5	6.1
30	36.7	12.2	43	26
38	64.7	42.4	82.4	63.4
45	50	13.9	57.6	29.8
52	53	20.2	70.8	43.2
60	61.1	39.6	81.8	61.6
98 (TESTIGO)	36.2	27.8	52.1	52.9

**TABLA 6. PLANTULAS DESARROLLADAS CON EL ESTÍMULO DE SACAROSA A LOS 42 Y 56 DÍAS DE EDAD.**

Las semillas con manitol esterilizado en autoclave, alcanzaron hasta los 91 días de cultivo más del 50 % en el desarrollo de plántulas, únicamente en aquellas expuestas siempre al estímulo con carbohidrato (semillas testigo),(Tabla 7).

A los 91 días de observación las semillas expuestas al MF tienen un desarrollo de plántulas pero éstas no rebasaron más del 50 %. A partir de los 30 días de exposición comienza el desarrollo de éstas, mientras que las que se expusieron por menos tiempo no alcanzaron a formar plántulas desarrolladas, esto es para ambos tipos de esterilización y no se observó un tiempo mínimo de exposición.

Por lo tanto entre mayor sea el tiempo de exposición de las semillas al carbohidrato mayor es el porcentaje de plántulas desarrolladas. Esto confirma lo antes mencionado respecto a la toma de manitol por el embrión de las semillas de *L. speciosa*.

La incapacidad de las semillas para convertir el almacén de reservas a carbohidratos, los cuales son almacenados en el embrión, puede explicar el requerimiento de un suplemento exógeno de carbohidrato para la germinación de las semillas (Harrison & Arditti, 1978).

El tiempo que tardaron las semillas en pasar de un estadio de desarrollo al siguiente se muestra en la tabla 8. Después de 7 días de edad se apreciaron semillas hinchadas (estadio 2) en ambos carbohidratos y en todos los tiempos de exposición. El estadio 3 de desarrollo (protocormo) se presentó entre los 14 y 21 días de edad sobre SA y SF, mientras que en MF entre 21 y 35 días de edad y en MA entre 21 y 42 días para todos los tratamientos de exposición.

Las plántulas con una hoja (estadio 4) aparecieron en SA y SF entre los 28 y 35 días de edad; sin embargo, las semillas que sólo estuvieron 7 días expuestas al carbohidrato alcanzan este estadio a los 70 y 77 días de edad en SA y SF respectivamente. Este mismo estadio se presentó entre los 42 y 49 días en MF y sólo en las semillas que se expusieron 30 días o más al carbohidrato, en MA aparecieron entre los 49 y 98 días de edad en todos los tratamientos exceptuando el de 21 días.

El estadio 5 de desarrollo (plántula con dos hojas) se observó entre los 35 y 42 días de edad en las expuestas al estímulo durante más de 15 días a SA y entre los 42 y 49 días de edad en las expuestas de 21 días en adelante sobre SF. En el caso de manitol éste estadio se presentó únicamente en las semillas expuestas 45, 60 y 98 (testigo) días al estímulo del carbohidrato esterilizado en autoclave entre los 70 y 84 días de edad y en MF entre los 77 y 84 días de edad, en las semillas expuestas al manitol por más de 45 días.

DÍAS CON ESTÍMULO	PORCENTAJE DE PLANTULAS	
	AUTOCLAVE	FILTRACIÓN
7	0	0
15	0	0
21	0	0
30	0.3	0.3
38	7.6	6.1
45	18.5	8.9
52	15.2	16.2
60	14	17.1
<b>98 (TESTIGO)</b>	<b>55.6</b>	<b>40.2</b>

**TABLA 7. PLANTULAS DESARROLLADAS CON EL ESTÍMULO DE MANITOL A LOS 91 DÍAS DE EDAD.**






		TIEMPO DE EXPOSICIÓN AL ESTIMULO (DIAS)			
		SACAROSA		MANITOL	
ESTADIO	DIAS DE EDAD	FILTRACIÓN	AUTOCLAVE	FILTRACIÓN	AUTOCLAVE
	7	7,15,21,30, 38,45,52,60, TESTIGO	7,15,21,30, 38,45,52,60, TESTIGO	7,15,21,30, 38,45,52,60, TESTIGO	7,15,21,30, 38,45,52,60, TESTIGO
	14	45,52,60, TESTIGO	15		
	21	7,15,21, 30,38.	7,21,30,38, 45,52,60, TESTIGO.	TESTIGO	21,30,38, 45,52, TESTIGO.
	28			7,15,21,30,60.	
	35			38,45,52.	15,60.
	42				7.
	28	15,38,45, 52,60, TESTIGO	21,30,38, 45,52,60, TESTIGO		
	35	21,30.	15.		
	42			TESTIGO.	
	49			30,38,45, 52,60.	38,45,52, 60,TESTIGO.
	70		7.		
	77	7			30.
	98				15.
	35		21,30,38, 45,52,60.		
	42	21,38,52.	15,TESTIGO.		
	49	30,45,60, TESTIGO.			
	70				45,TESTIGO.
	77			45.	
	84			52,60, TESTIGO	60.
	70		30,45,52,60.		
	77	21,30,38.	15,21,38, TESTIGO.		
	84	TESTIGO			
	91	52,60.			
	98	45			

TABLA 8. CAMBIO DE ESTADIOS DE *Laelia speciosa* EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION A LOS CARBOHIDRATOS.



Las semillas lograron alcanzar el estadio 6 de desarrollo (plántulas con al menos una raíz verdadera) sólo cuando estuvieron en presencia de sacarosa; lo que ocurre entre los 70 y 77 días de edad, en las semillas expuestas al estímulo por más de 15 días a SA y entre los 77 y 98 días de edad sobre SF en los tratamientos expuestos al carbohidrato 21 días o más.

En general, en el caso del manitol hay una relación directamente proporcional entre el tiempo del estímulo a éste y el desarrollo de las semillas, es decir, entre menor sea el tiempo de estímulo, éstas alcanzan un menor estadio de desarrollo y aunque en el índice de desarrollo de las plántulas sobre MF no superaron el estadio de protocormo y las expuestas a MA el estadio de plántula con una hoja hasta el final del cultivo (98 días de edad), en la tabla 8 se puede observar que sí se obtuvieron plántulas con dos hojas en ambos casos a partir del día 70 de edad, pero el porcentaje de éstas es tan pequeño que no se percibe gráficamente.

En el caso de las semillas expuestas a sacarosa en ambos tipos de esterilización se obtuvieron plántulas con al menos una raíz verdadera a partir del día 70 de observación, esto no se refleja en las gráficas, ya que el porcentaje es menor.

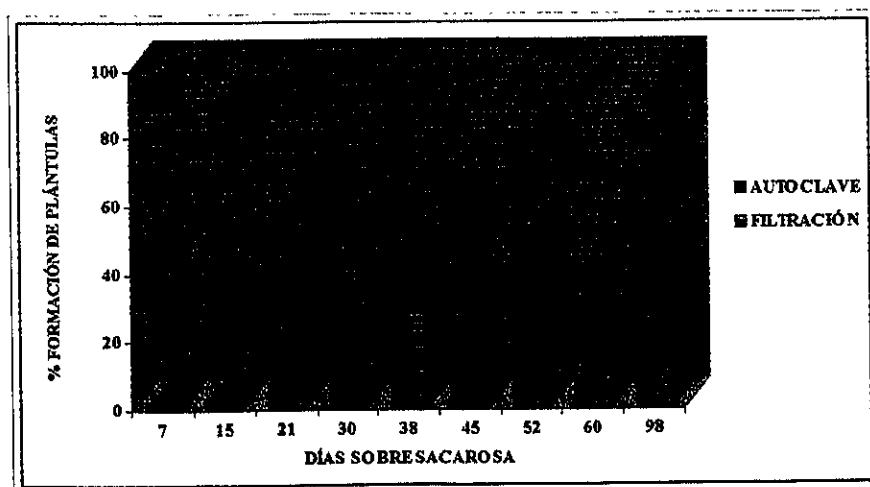
**PLÁNTULAS EN ESTADIO 6 (CON AL MENOS UNA RAÍZ VERDADERA).**

Al final del cultivo (98 días de edad), las semillas que se expusieron al estímulo de sacarosa en ambos tipos de esterilización, crecieron y se desarrollaron hasta convertirse en plántulas con hojas y raíces (estadio 6) (Gráfica 18). La presencia de sacarosa en el medio permite a las semillas desarrollarse hasta el estadio 6; pero el porcentaje que se obtuvo de éstas dependió del tiempo de exposición al carbohidrato.

En una exposición de 7 días en presencia de sacarosa para ambos tipos de esterilización, no fue suficiente para desarrollar plántulas completas; si se exponen 15 días sólo un 2.5 % de plántulas en estadio 6 se forman sólo con el estímulo de la sacarosa en autoclave, mientras que las expuestas el mismo tiempo pero a la sacarosa filtrada, no desarrollaron ningún porcentaje de plántulas completas

A partir de los 21 y hasta los 98 días con el estímulo del carbohidrato, fue mayor el porcentaje de plántulas que se obtiene. Sin embargo solamente continúan con el estímulo las plántulas expuestas 98 días (testigo) al carbohidrato

Es importante hacer notar que las semillas que se expusieron sólo por 38 días a la sacarosa ya sea esterilizada en autoclave o por filtración, alcanzaron el máximo porcentaje de plántulas con hojas y raíces, siendo de 44 % para SA y 30 % para SF, coincidiendo con el tiempo mínimo que requieren las semillas con éste estímulo para alcanzar su desarrollo.



**GRÁFICA 18. PORCENTAJE DE PLÁNTULAS CON AL MENOS UNA RAÍZ SOBRE SACAROSA.**

## CONCLUSIONES

- ◆ La viabilidad promedio de los embriones de *Laelia speciosa* fue en general alta, de 87 %.
- ◆ La germinación para esta especie fue de 89.3 %, lo que se considera alto, ya que en condiciones naturales es menor al 1%.
- ◆ La sacarosa esterilizada en autoclave fue el mejor carbohidrato y el mejor método de esterilización, ya que promueve más rápidamente el desarrollo del embrión de *Laelia speciosa*.
- ◆ 38 días del estímulo con sacarosa fue el tiempo mínimo requerido para inducir una mayor respuesta morfológica del embrión y el desarrollo de plántulas con raíces, en menor tiempo.
- ◆ A mayor tiempo de exposición al estímulo con manitol esterilizado en autoclave se obtiene una mayor respuesta morfológica del embrión.
- ◆ La apariencia de las plántulas obtenidas sobre sacarosa esterilizada en autoclave fue mejor.
- ◆ Las semillas expuestas durante 7 días al estímulo con sacarosa esterilizada en autoclave o por filtración no culminan el proceso de germinación.
- ◆ Las semillas expuestas más de 15 días al estímulo con sacarosa esterilizada en autoclave y más de 21 días al mismo carbohidrato esterilizado por filtración, culminan el proceso de germinación en plántulas con hojas y al menos una raíz.
- ◆ La efectividad de los carbohidratos sobre el embrión de *Laelia speciosa* se dio en la siguiente secuencia: con sacarosa esterilizada en autoclave, después con el mismo esterilizado por filtración, manitol esterilizado en autoclave y por último manitol esterilizado por filtración.
- ◆ El estadio en el cual las plántulas permanecieron por más tiempo en SA fue el de plántula con dos hojas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A. & P. Vatsalá. 1981. Introduction to Orchids with Illustrations of 159 South Indian Orchids. Tropical Botanic Garden And Research Institute. Indian. 534 pp.
- Alexander, C. & G. Hadley. 1984. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New. Phytol.* 101: 657-665.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33:1-97.
- \_\_\_\_\_, P.L. Healey & R.Ernst. 1972. The role of mycorrhiza in nutrient uptake of Orchids II. Extracellular hydrolysis of oligosaccharides by asymbiotic seedlings. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 41: 503-510.
- \_\_\_\_\_. 1982. Orchid Biology. Vol. II. Comstock Publishing Associates. USA. 390 pp.
- \_\_\_\_\_. & R.Ernst. 1984. Physiology of Germinating Orchid Seeds in Orchid Biology. Reviews and Perspectives, III. J., Arditti (Ed.). Comstock Publishing Associates. USA. 177-222 p.
- \_\_\_\_\_. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 691 pp
- Baker, M.K., M.C. Mathes & B.J. Wallace. 1987. Germination of *Pontieva* and *Cattleya* Seeds and Development of *Phalenopsis* Protocorms. *Lindl.* 2 (2): 77-83.
- Betchel, H., P. Cribb & E. Launert. 1985. The Manual of Cultivated Orchids Species. The MIT Press. Cambrige, Massachussetts. 444 pp
- Burgeff, H. 1959. Micorrhiza in Orchids. 361-395 p. In C.L. Withner (Ed). The Orchids: a Scientific Survey. The Ronald Press, Company. USA

- Caneva, S. 1978. Orquídeas: Principales géneros y especies, su cultivo. Albatros. Argentina. 230 pp.
- Cronquist, A. 1981. An Integral System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. New York. 1262 pp.
- Del Castillo, M. 1992. The Orchids of Puerto Rico and the Virgin Island. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico. 167 pp.
- Dressler, R. L. 1981. The Orchids: Natural History and Classification. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts and London England. 332 pp.
- \_\_\_\_\_. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland. Oregon. 314 pp.
- Ernst, R. J. 1967. Effects of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalenopsis* and *Dendrobium* seeds. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 36: 1068-1073.
- \_\_\_\_\_, J. Arditti & P. L. Healey. 1971. Carbohydrate Physiology of Orchid seedlings II. Hidrolysis and effects of oligosaccharides. *Amer. J. Bot.* 58 (9): 827-835.
- \_\_\_\_\_ & E. Rodríguez. 1984. Carbohydrates of the Orchidaceae in *Orchid Biology. Reviews and Perspectives*, III. J., Arditti (ed). Comstock Publishing Associates. USA. 223-260 p.
- Flamée, M. 1978. Influence of selected media and supplements on the germination and growth of *Paphiopedilum* seedlings. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 47 (5): 419-423.
- Hadley, G. 1980. Orchid Mycorrhiza. in *Orchid Biology. Reviews and Perspectives*, II. 1982 J., Arditti (ed) Comstock Publishing Associates. USA. 83-118 p.

- \_\_\_\_\_ & G. F. Pegg. 1989. Host-fungus Relationships in Orchid Mycorrhizal systems. *in* Modern Methods in Orchid Conservation: The role of Physiology, Ecology and Management Cambridge University Press. Great Britain. 73-85 p.
- Halbinger, F. 1993. *Laelias* de México. AMO. México 71 pp.
- Harrison, C. R. 1977. Ultrastructural and Histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Bot. Gaz.* 138(1): 41-45.
- \_\_\_\_\_ & J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Bot. Gaz.* 139 (2): 180-189.
- Hérmendez, A. M. 1992. Dinámica Poblacional de *Laelia speciosa* (H.B.K.). Tesis de Licenciatura de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 138 pp.
- Ichihashi, S. 1979. Studies on the media for orchids seed germination. *J. Japan. Hort. Sci.* 48 (3): 345-352.
- Kubota, Ch. & T. Kozai. 1991. Effects of initial amount of sugar in the medium on the growth of *Cymbidium* PBL *in vitro*. *Hort* 26 (6): 150.
- Lee, J. K., K.Y. Peek, H.S. Lee & S.H. Sin. 1982. Studies on the Non-symbiotic germination of *Laelia briegei* seeds. I Morphological characters of germinating, seeds and effects of pH, sucrose and growth regulators on seed germination. *J. Korean. Hort. Sci.* 23 (2): 163-171
- Lesica, P. & K. R. Antibus. 1990. The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forests. *Biotropica*. 22 (3): 250-258.
- Lipavská, H. & D. Vreugdenhil. 1996. Uptake of mannitol the media by *in vitro* grown plants. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 45: 103-107.

- Luna, R & A. Barba. 1993. Estudio Morfogénico de la Semilla de *Laelia speciosa* (H. B. K ) SCHLTR durante su Germinación Asimbiótica *in vitro* In V Encuentro Latinoamericano de Orquideología. Octubre, 19-25· 24-25.
- Margalef, R. 1995 Ecología. Omega. Barcelona. 539-540 p.
- Martínez, P. A. 1991. Propagación Masiva *in vitro* y Recuperación de Poblaciones de Orquídeas en Peligro de Extinción. Tesis de Maestría UNAM. México. 90 pp.
- Moreno, M. E. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Instituto de Biología. UNAM. México. 383 pp
- Penningsfeld, F. 1985. Soilles propagation and cultivation of orchids. Possibilites, advantages and disantages *Soil. Cult.* 1 (1): 55-66.
- Peterson, R.L. & Currah, R.S. 1990. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. *Can. J. Bot.* 68 : 1117-1125.
- Philip, V.J. & S.A.Z. Nainar. 1988. Structural changes during the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 61: 139-145.
- Rubluo, A. ,V. Chávez & A Martínez. 1989. *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindl.* 4 (2): 68-73.
- Sheehan, J. T. 1980. Introduction to Floriculture. Ray A. Jarson. (ed) Academic Press. USA. 165 pp.
- Shoustari D. B., R. Heydari, G.L. Jonhson & J. Arditti. 1994. Germination and viability staining of ochid seeds following prolonged storage. *Lindl.* 9 (2): 77-84.

- Smith, S. E. 1973. Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin *New Phytol.* 72: 497-499.
- \_\_\_\_\_ & Smith, F. A. 1973. Uptake of glucose, trehalose and manitol by leaf slices of orchid *Bletilla hyacinthina*. *New Phytol.* 72: 957-964.
- \_\_\_\_\_, V. Gianinazzi- Pearson, R. Koide & J. W. G. Cairney. 1994. Nutrient transport in mycorrhizas: Structure, Physiology and Consequences for efficiency and of the symbiosis. *Plant. Soil.* 159: 103-113.
- Smreciu, A.E. & R. S. Currah 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial Orchids of North America and Europe. *Lindl.* 4 (1): 6-15.
- Stancato, G.C. & R.T. Faria. 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* BATEM. (Orchidaceae) 1: Effects of macro and microelements. *Lindl.* 11(1): 41-43.
- St-Arnaud, M. D., D. Lauzer, & D. Barabé. 1992. In vitro Germination and Early Growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) I: Effects of Macro and Microelements. *Lindl* 7 (1): 22-27.
- Soto, M.A. 1988. Listado actualizado de la orquídeas de México. *Orquidea.* 11: 233-277.
- \_\_\_\_\_. 1990. *Laelia speciosa* (H.B.K.) Kund. in *Icones Orchidacearum, Orchids of México*. E. Hágsater y Salazar G. (eds). Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. 233 pp.



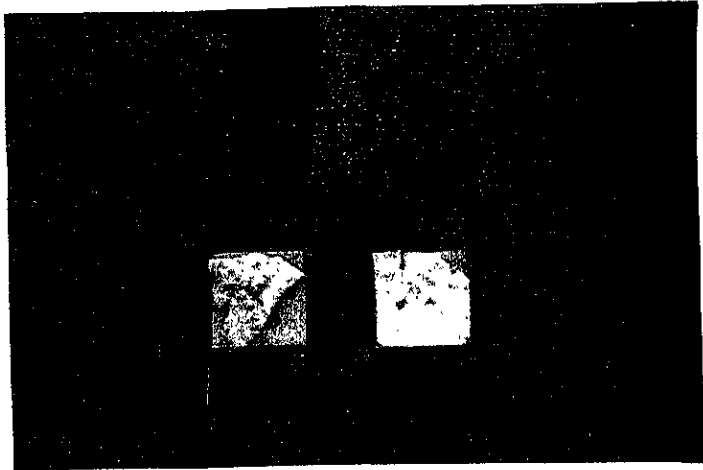
- \_\_\_\_\_ & E. Hagsater. 1990. Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado terminal de los taxos amenazados. En: Areas Naturales Protegidas en México y Especies en Extinción. J. L. Camarillo y Rivera, F. (eds) UNAM. 155-172 p.
- Thompson, A. P. 1980. Orchids from seed. Royal Botanic Gardens. England. 30 pp.
- Thompson, M., T.J. Douglas, H. Obata-Sasamoto & T.A. Thorpe. 1986. Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiol. Plant.* 67: 365-369.
- Tsutsui, K. & M. Tomita. 1990. Suitability of the several carbohydrates as the sources for symbiotic seedling growth of two orchid species. *Lindl.* 5 (2): 134-139.
- Velázquez, V.R. 1997. Efecto de Sacarosa, Glucosa y Fructosa sobre la Germinación de las Semillas, el Desarrollo y Crecimiento de Plántulas de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr Cultivadas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. 63 pp.
- Wiard, L. A. 1987. An Introduction to the Orchids of Mexico. Comstock Publishing Associates. USA. 239 pp
- Williams, B. 1973. Orchid Grower's Manual. Strauss & Cramer GmbH. Alemania. 425-440 p.
- Wirth, M. & C.L. Withner. 1959. Embryology and Development in the Orchidaceae. 155-185 p. In: The Orchids: A Scientific Survey. C.L. Withner (Ed) Ronald Press. New York.
- Withner, C.L. 1959. The Orchids: A Scientific Survey. Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar. Florida. USA. 648 pp
- \_\_\_\_\_. 1974. Development in Orchid Physiology. In: The Orchids Scientifics Studies (eds). Withner. Wiley. New York. 129-168 p.

Wright, P.N 1958. Orquídeas de México. Fournier S.A. México. 23 pp

Zettler, W. L & T.M. McInnis, Jr. 1992. Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll.) Luer., and Endangered Terrestrial Orchid, Through Symbiotic Seed germination. *Lindl.* 7(3): 155-162

Semillas estimuladas por 7 días con sacarosa y manitol esterilizados en autoclave, después de 98 días de cultivo.

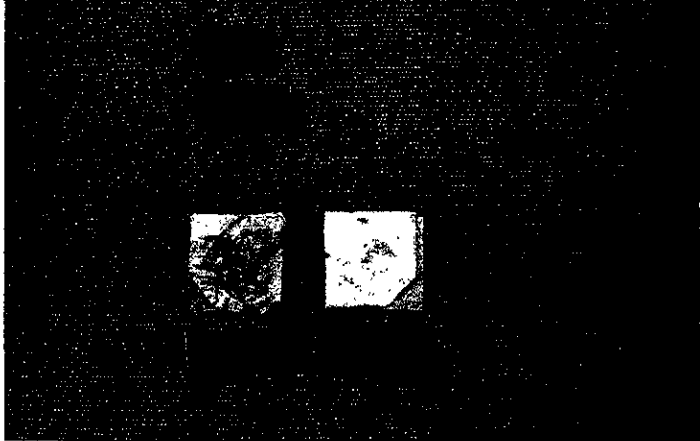
semillas estimuladas por 7 días con sacarosa y manitol esterilizados por tración, después de 98 días de cultivo.



Plántulas y semillas estimuladas por 38 días con sacarosa y manitol esterilizados en autoclave, después de 98 días de cultivo.



Plántulas y semillas estimuladas por 38 días  
con sacarosa y manitol esterilizados por  
filtración, después de 98 días de cultivo.



Plántulas y semillas estimuladas por 98 días  
con sacarosa y manitol esterilizados en  
autoclave, después de 98 días de cultivo

Plántulas estimuladas por 98 días con  
sacarosa y manitol esterilizados por  
filtración, después de 98 días de cultivo

