

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Tecnológico Nacional de México Instituto Tecnológico de la Zona Maya

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA E *in vitro* EN *Lophiaris andrewsiae*

Informe Técnico de Residencia Profesional

Que presenta el C.

EDESIO PECH MORENO

Número de control:

11870041

Carrera: Ingeniería en Agronomía

Asesora Interna: Dra. Esmeralda Cázares Sánchez

Juan Sarabia, Quintana Roo

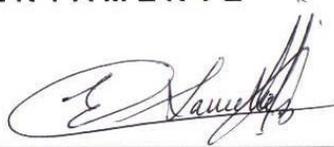
Diciembre 2015



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de **INGENIERÍA EN AGRONOMÍA, EDESIO PECH MORENO**, aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por la asesora interna **DRA. ESMERALDA CÁZARES SÁNCHEZ**, el asesor externo el **LIC. OMAR MARTÍNEZ GARCÍA** habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo titulado: **EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA E IN VITRO EN *Lophiaris andrewsiae*** que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fe de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

ATENTAMENTE



Asesora Interna

Dra. Esmeralda Cázares Sánchez



Asesor Externo

Lic. Omar Martínez García

Juan Sarabia, Quintana Roo, diciembre, 2015.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	2
III. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO.....	3
IV. OBJETIVOS	5
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	5
V. MATERIALES Y METODO	6
5.1 PROPAGACION VEGETATIVA	6
5.1.1 Preparacion De Sustrato	7
5.1.2 Llenado De Mazetas Con Los Sustrato	8
5.1.2.1 Lavado y desinfeccion de mazetas	8
5.1.2.2 Llenado de mazetas.....	9
5.1.3 Desinfeccion De Sustratos.....	10
5.1.4 Siembra De Los Bulbos	10
5.2 PROPAGACION <i>IN VITRO</i>	11
5.2.1 Desinfeccion De Semillas.....	11
5.2.1 Preparación de medio de cultivo (MS).....	13
5.2.2 Preparación de semillas	16
VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
VII. PROBLEMAS RESUELTOS Y LIMITANTES	20
VIII. COMPETENCIAS APLICADAS O DESARROLLADAS	21
IX. CONCLUSIONES.....	22
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	23
XI. ANEXOS	24
11.1 anexo 1.	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Macronutrientes	13
Cuadro 2. Micronutrientes.....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macro localización laboratorio biotecnología.	3
Figura 2. Micro localización del laboratorio de biotecnología.....	3
Figura 3. Macro localización UMA.	4
Figura 4. Micro localización UMA.	4
Figura 5. Selección de bulbos.	6
Figura 6. Eliminación de bulbos y raíces dañados.....	6
Figura 7. Separación de dos bulbos sanos.....	7
Figura 9 a). Madera picada de negro. B) Madera picada de tinto.	8
Figura 10. Lavado de las mazetas.Figura 12. Desinfección de la mazetas.....	8
Figura 13. Llenado de mazetas con tinto y negro 9	9
Figura 14. mazetas listas para el trasplante.	9
Figura 15. Desinfección del sustrato.....	10
Figura 16. Preparación de maxigrowexcel®.	11
Figura 18. Vista en microscopio de las semillas de <i>Lophiaris andrewsiae</i>	12
Figura 18. A).Colocación de semillas en los sobres b) Solución de hipoclorito de sodio... 12	12
Figura 19. a) Sobres dentro de la solución b) Agitador magnético c) Enjuague con agua destilada.....	13
Figura 19. Selección de elementos químicos.	14
Figura 20. a) Pesado de químico b) Agua destilada para la solución.....	15
Figura 21. a) Preparación de la solución b) Verificación del pH.....	15
Figura 22. a) Preparación del medio b) Esterilización del medio de cultivo.	15
Figura 21. Sobres de semillas.....	17
Figura 22. A) Colocación de semillas en el medio b) Aplicación del fungicida.....	17
Figura 23. Frascos del medio en los anaqueles.....	18
Figura 24. Monitoreo del cultivo.	18

I. INTRODUCCIÓN

El principal problema de la reproducción mediante semillas en las orquídeas es que difícil distinción de los cotiledones, la radícula y carecen de endospermo (Pierik, 1990). Además, la tala de árboles, extracción ilegal de orquídeas silvestres para su comercio y los incendios forestales, frenan su actividad reproductiva, acelerando el proceso de extinción; por eso, es muy importante realizar trabajos o proyectos que vayan encaminados a la propagación vegetativa e *in vitro*. Cabe destacar que de estos dos métodos la propagación *in vitro* tiene un mejor resultado debido a la gran cantidad de semillas que poseen dentro de la baya lo con lo que se puede obtener un gran número de orquídeas.

La familia *Orchidaceae* constituye uno de los grupos de plantas más diversas, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial (Chase et al., 2003; Dressler, 2005). Las orquídeas se distribuyen en todos los continentes (excepto la Antártida) pero su mayor diversidad se concentra en las regiones tropicales. México, situado en el límite norte del trópico americano, alberga una notable riqueza de orquídeas y han sido registradas en el país alrededor de 1260 especies y 170 géneros (Hágsater et al., 2005; Soto et al., 2007).

En los dos últimos siglos, se han extinguido varias especies de orquídeas en México y a partir de 1998 han desaparecido al menos 22 (Hágsater et al., 2005). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 incluye a la familia *Orchidaceae* (ANEXO 1).y a todas sus especies como amenazadas y en peligro de extinción (SEMARNAT, 2003).

II. JUSTIFICACIÓN

Lophiaris andrewsiae es una de las especies de orquídeas consideradas por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL como amenazada. De manera natural, se le encuentra en la ribera del río Hondo y dado su estatus en la NOM, en el presente trabajo de Residencia Profesional, se probaron técnicas de propagación *in vitro* y vegetativas, para incrementar el número de plantas en la UMA (Unidad de Manejo Ambiental) denominada INVERUCUM, ubicada en el poblado Ucum, Quintana Roo.

Además de la oportunidad de participar en una empresa dedicada al manejo y conservación de orquídeas, realizar esta actividad me permitió poner en práctica los conocimientos adquiridos durante la formación profesional, en la carrera de Ingeniería en Agronomía.

III. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

El proyecto se llevó a cabo en dos lugares, debido a que para realizar la propagación *in vitro* se requiere de un laboratorio equipado y con las condiciones adecuadas. Por lo tanto la propagación *in vitro* se realizó en el laboratorio de Biotecnología (Figura 1) del Instituto Tecnológico de la Zona Maya el cual se encuentra ubicado en el ejido de Juan Sarabia municipio de Othón Pompeyo Blanco.

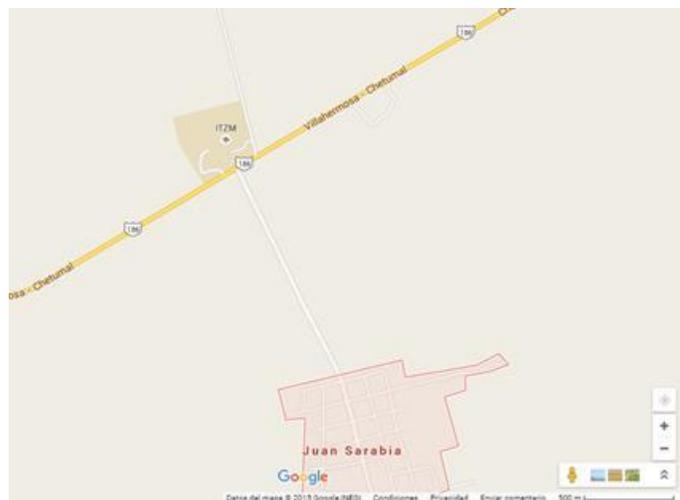


Figura 1. Macro localización laboratorio biotecnología.

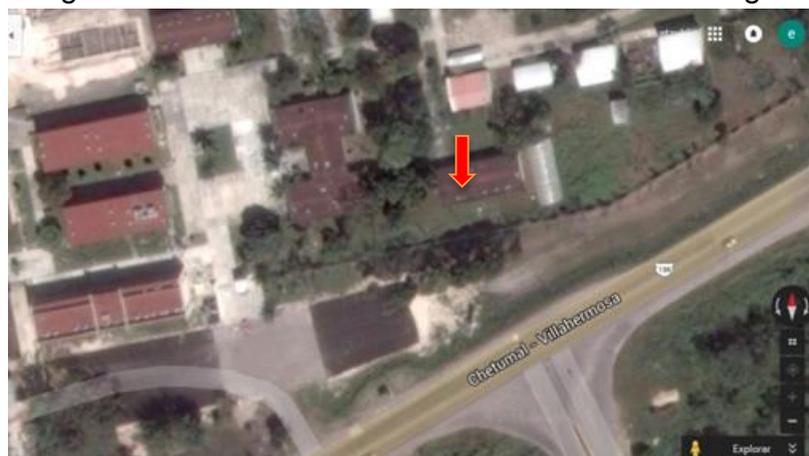


Figura 2. Micro localización del laboratorio de biotecnología.

Por otro lado, la propagación vegetativa de la orquídea *Lophiaris andrewsiae* se llevó a cabo en la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) denominada INVERUCUM, la cual se encuentra ubicada en la comunidad de Ucum, municipio de Othón Pompeyo Blanco. Durante el periodo de agosto – noviembre del 2015. Cuenta con 1345 habitantes. El clima es Aw1, cálido subhúmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual que se registra es de 26.4 °C, la precipitación promedio anual es de 1133.7 mm de lluvia.

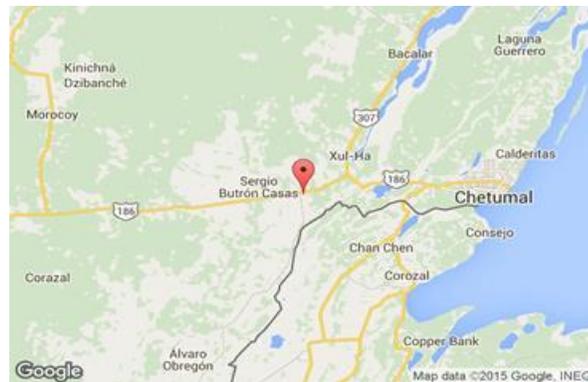


Figura 3. Macro localización UMA.



Figura 4. Micro localización UMA.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta de la semilla de *Lophiaris andrewsiae* en diferentes métodos de propagación *in vitro* y vegetativa con bulbos.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Evaluar la respuesta de germinación de semilla de *Lophiaris andrewsiae* en el medio de cultivo de Murashagui y Skoog.
- Evaluar el tiempo de adherencia por la propagación vegetativa en la separación de bulbos.
- Comparar la eficiencia de la propagación por bulbos y la respuesta de germinación de la semilla.

V. MATERIALES Y METODO

5.1 PROPAGACION VEGETATIVA

Para poder obtener los bulbos necesarios para la siembra se obtuvieron apartir de la planta madre de orquídea. Con la ayuda de una tijera de poda se cortaron los bulbos (Figura 5) que cumplieran con la características necesarias, es decir se seleccionaron aquellos bulbos que no presentaban daños como perforaciones, cambio de color o la presencia de alguna plaga o enfermedad (Figura 6) esto con la finalidad de garantizar un mayor porcentaje de esquejes que logren adaptarse a la siembra, de igual manera se eliminaron las raices viejas (Figura 7). Las tijeras se desinfectaron con cloro. Se obtuvieron un total de 10 bulbos para realizar la siembra.



Figura 5. Selección de bulbos.



Figura 6. Eliminacion de bulbos y raices dañados.



Figura 7. Separación de dos bulbos sanos

5.1.1 Preparacion De Sustrato

Los sustratos utilizados para la propagacion se seleccionaron con base a la invetigacion realizada sobre arboles en los cuales las orquideas aereas tienen un mejor desarrollo de la raiz, en este caso se opto por elegir al negro y al tinto.

Para poder ser utilizados como sustratos se picaron en trozos pequeños con el fin de poder introducirlos en la mezetas (Figura 8). hasta obtener la cantidad necesaria para las mazetas (Figura 9 y 10).



Figura 8. Picado de la madera



Figura 9 a). Madera picada de negrito. B) Madera picada de tinto.

5.1.2 Llenado De Mazetas Con Los Sustrato

5.1.2.1 Lavado y desinfeccion de mazetas

Antes de llenar las mazetas con los sustratos se desinfectaron las mazetas esto con la finalidad de prevenir la presencia de algun patogeno que pueda perjudicar el optimo desarrollo del bulbo. Para el lavado (Figura 10). se utilizo jabon en polvo e hipoclorito de sodio en el caso del hipiclorito de sodio se diluio a razon de al 2%, se dejo remojado en la solución de desinfección (Figura 11). 10 minutos luego se retiraron y se colocaron en un sitio adecuado para que se sequen.



Figura 10. Lavado de las mazeta.Figura 12. Desinfeccion de la mazetas.

5.1.2.2 Llenado de mazetas

Una vez que las mazetas se encontraban limpias y desinfectadas se prosiguió a realizar el llenado con los sustratos. Para lo cual se realizó de la siguiente manera:

Se colocó los trozos de madera picada dentro de cada una de las mazetas hasta que estaban alcanzaban el 90% del tamaño de los recipientes (Figura 14).



Figura 13. Llenado de mazetas con tinto y negro



Figura 14. mazetas listas para el transplante.

5.1.3 Desinfeccion De Sustratos

Cada uno de los sustratos fueron regados con captan a razón 2 gramos por litro de agua para la prevención de hongos patógenos. Para la preparación de la solución fungicida (captan®) se llenó una regadera manual de una capacidad de 4 litros de agua después se le agrego los 8 gramos de fungicida y con la ayuda de un pedazo de madera se diluyó una vez preparada la solución se prosiguió verter en los sustratos, esto se realizó con el cuidado de mojar el 100% del sustrato (Figura 15).



Figura 15. Desinfeccion del sustrato

5.1.4 Siembra De Los Bulbos

La siembra de los bulbos en los sustratos se llevo a cabo a las 7 de la mañana esto debido a que para realizar los cortes y la siembra de los bulbos se recomienda que se realice en horas tempranas para evitar que el sol y la temperatura dañen los bulbos.

Para ello se coloco un bulbo por cada mazeta preparada con el sustrato tratando que toda la raíz quede en el centro y en la parte inferior. Posterior a la siembra se rego para humedecer el sustrato y que este tenga una humedad adecuada para el desarrollo de la raices, el riego se realizaba cada dos dias.

De igual manera se le aplico maxigrow excel® a razon de 3 ml por litro de agua con el objetivo de estimular a los bulbos al desarrollo y crecimiento de las raices,

esta aplicación se repetía una vez cada semana. Para su preparación en una cubeta de veritieron 3 litros de agua posterior a esto se agrego el maxigrow excel® (Figura 16). Para su aplicación en las orquideas se virtio la solución en una regadera seguidamente de esto se mojaron los sustratos enfocando la solución en las áreas donde se encontraban las raíces en crecimiento.



Figura 16. Preparación de maxigrowexcel®.

5.2 PROPAGACION *IN VITRO*

La propagación *in vitro* como ya se había mencionado anteriormente se llevó a cabo en las instalaciones del instituto tecnológico de la zona maya para lo cual se tuvo asesoría de la Dra. Esmeralda Cázarez Sánchez para el manejo del equipo de laboratorio y la preparación de medio de cultivo (MS)

5.2.1 Desinfección De Semillas

La UMA donde se estaba realizando el proyecto ya contaba con semillas (Figura 17). seleccionadas para realizar la siembra, sin embargo por cuestiones de prevención se realizó la desinfección de las semillas en el laboratorio para lo cual se realizó de la siguiente manera.



Figura 18. Vista en microscopio de la semillas de *Lophiaris andrewsiae*. Se elaboraron pequeños sobres de papel filtro donde se colocaron pequeñas cantidades de semillas (Figura 19 a). las cuales sellaron a partir de la utilizacion de grapas para evitar la perdida de las semillas en a realizacion del metodo de desinfeccion. Se preparo hipoclorito de sodio al 5% en 500 ml de agua para lo cual se utilizo un vaso precipitado de 1000 ml (Figura 19 b). una vez preparado el hipoclorito de sodio se colocaron los sobres dentro del vaso al igual que un magneto el cual serviria para agitar la solucion a partir de la utilizacion de un agitador magnetico, se dejo la solucion durante 15 minutos, posterior a esto se retiraron las semillas de la solucion para realizar un enjuague en agua destilada para eliminar los residuos de cloro, dicho enjuague tambien se realizo con ayuda del agitador magnetico durante 10 minutos, seguidamente de retiraron los sobres colocandolos en un colador para eliminar los residuos de agua, se colocaron en la campana la cual ya habia sido encendida con 5 minutos de ventilador y 3 de luz ultravioleta con la finalidad de prevenir la presencia de agentes patogenos que puedan perjudicar al momento de realzar la siembra.



. Figura 18. A).Colocación de semillas en los sobres b) Solución de hipoclorito de sodio.

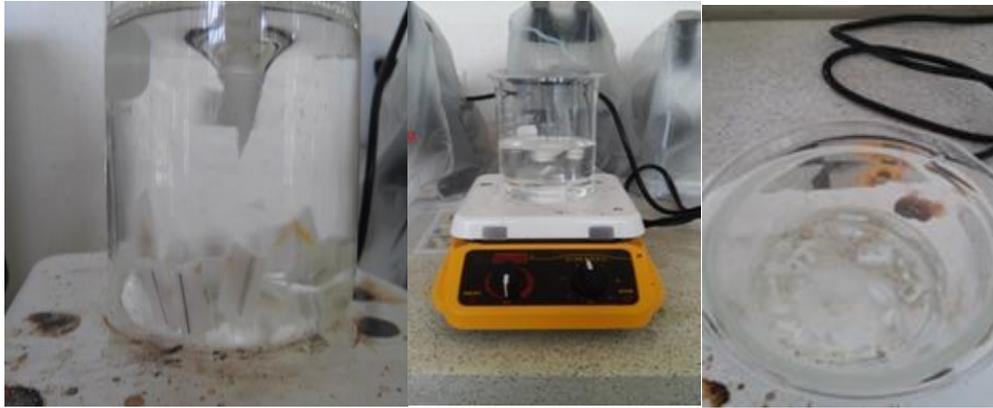


Figura 19. a) Sobres dentro de la solución b) Agitador magnético c) Enjuague con agua destilada.

5.2.1 Preparación de medio de cultivo (MS).

El medio propuesto para realizar la propagación vegetativa fue Murashige y Skoog (1962, 30 g·L⁻¹ de sacarosa y 6.5 g·L⁻¹ de agar como agente gelificante (T1)). La preparación del medio depende del tipo de vegetal que se desea sembrar por esta razón el medio de Murashige y Skoog tiene varias modificaciones o adaptaciones.

El medio de cultivo MS (Murashihe y Skoog, 1992) se realizó con las siguientes sustancias.

Cuadro 1. Macronutrientes

MACRONUTRIENTES	
	Mg/ L
(NH ₄)NO ₃	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440

Cuadro 2. Micronutrientes

MICRONUTRIENTES	
	Mg/L
FeSO ₂ 7H ₂ O	27,8
Na ₂ ECTA	37,3
H ₃ BO ₃	6,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
KI	0,83

Lo primero que se realizó fue la identificación de los químicos (Figura 19). que se necesitaban para la preparación, posterior de haberlos localizados se prosiguió a pesar cada uno de los elementos (Figura 20 a). Necesarios en la medida que se requiere para preparar la cantidad de solución madre que se utilizó se diluyeron en 500 ml agua destilada (Figura 20 b). Una vez mezclado todos los elementos se colocó la solución en un agitador magnético para posterior a esto agregar el azúcar y el agar, una vez que se había agregado todos los elementos necesarios para preparar la solución madre se colocó en el horno por unos 15 minutos.



Figura 19. Selección de elementos químicos.



Figura 20. a) Pesado de químico b) Agua destilada para la solución.



Figura 21. a) Preparación de la solución b) Verificación del pH.



Figura 22. a) Preparación del medio b) Esterilización del medio de cultivo.

5.2.2 Preparación de semillas

Para la siembra se prepara una solución de fungicida (captan®) a razón de 2 gramos por litro de agua destilada en el cual se agregaron los sobres de semillas con la finalidad de utilizarlo como medio de prevención se dejaron 10 minutos dentro de la solución posterior a esto fueron sacados y colocados en una caja Petri esperando que se sequen para poder manipularlos de una mejor manera al momento de realizar la siembra.

Para realizar la siembra se realizó de la siguiente manera:

1. Con unas pinzas se tomaron los sobres de semillas y se abrieron, se tomaron con una espátula las semillas para colocarlos en los frascos con el medio de cultivo (Figura 21).
2. Los frascos ya se tenían preparado con el medio de cultivo, al momento de realizar la siembra se colocó un mechero encendido, cada frasco que se tomaba para introducir las semillas se colocaba cerca del mechero con el objetivo de utilizar la flama de este como medio de prevención y eliminación de agentes patógenos así se realizaron en cada uno de los frascos (Figura 22 a).
3. Una vez finalizada la introducción de las semillas a los frascos se les agregó una gota de la solución fungicida que se tenía preparada con ayuda de una pipeta (Figura 22 b).
4. Se cerraron los frascos y se sellaron con cinta como medio de prevención.
5. Al finalizar la siembra en cada uno de los frascos se les escribió la fecha de siembra, el número de repetición, la especie de orquídea y el nombre de la persona que realizó la siembra esto con la finalidad de identificar cada una de ellas por si en un momento dado se presentaba alguna anomalía como el desarrollo de algún agente patógeno.
6. Al finalizar todo este proceso los frascos fueron llevados en los anaqueles los cuales se encuentran ubicados en un cuarto con la iluminación adecuada para el crecimiento y desarrollo de las orquídeas (Figura 23).



Figura 21. Sobres de semillas.



Figura 22. A) Colocacion de semillas en el medio b) Aplicación del fungicida.



Figura 23. Frascos del medio en los anaqueles.

Despues de la siembra se realizaron monitoreos para identificar la presencia de algun agente patogeno como hongos o bacterias, de ser encontrado algun frasco contaminado se procedia a eliminarlo del área donde se encontraban.

Despues de retiralos del anaquel se colocaban dentro del autoclave para realizar una esterilizacion del materiar, posterior a de esto es lavaba el frasco eliminando el medio de cultivo del laboratorio despues del lavado se colocaba todo el material dentro de la estufa para el secado del mismo esto de dejaba por 6 horas dejandolas dentro y se sacaban hasta el dia siguiente colocandolos en su lugar correspondiente de almacenamiento.



Figura 24. Monitoreo del cultivo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos hasta el 4 de diciembre son los siguientes, del total de las repeticiones hechas el porcentaje de perdidas es del 20% esto debido a problemas con hongos y bacterias esto en cuanto a la propagacion *in vitro*, por otro lado en la propagacion vegetativa no se ha tenido ninguna perdida pero a diferencia de la propagacion *in vitro* el numero de repeticiones es menor esto debido a que se contaban con un número limitado de bulbos.

VII. PROBLEMAS RESUELTOS Y LIMITANTES

Con los resultados obtenidos la UMA tendra una mayor cantidad de ejemplares de la orquidea *Lophiaris andrewsiae* lo cual favorece la conservacion de esta especie de orquidea silvestre, de continuar con esta forma de trabajo los encargados de la UMA podra hacer una excelente labor contra la extincion de esta especie vegetal.

El impacto de este trabajo sera limitado a un área local abarcando a la UMA y áreas donde los encargados de la UMA realizan estudios de campo para conocer el estado de las diferentes orquideas que se encuentran en esas áreas de estudio.

Entre la limitantes que se presentaron durante el tiempo que se realizo el proyecto fue la poca capacidad de germinacion que presentaron las semillas, que se utilizaron para la siembra.

Dos de los objetivos propuestos no pudieron ser completados dado que se tuvieron problemas con la germinacion de las semillas con las que se contaban lo que ocasiono que estas no logran germinar impidiendo asi completar lo establecido.

VIII. COMPETENCIAS APLICADAS O DESARROLLADAS

Las diferentes asignaturas que me permitieron adquirir conocimientos antes de realizar este trabajo y que en el transcurso de éste pude ponerlos en práctica fueron las siguientes.

8.1 Botánica general

8.1.1 Competencias específicas

8.1.1.1 Distinguir los diferentes órganos de la planta.

8.1.2 Competencias genéricas

8.1.2.1 Capacidad de análisis y síntesis

8.1.2.2 Capacidad de organizar y planificar

8.1.2.3 Trabajo en equipo

8.1.2.4 Compromiso ético

8.1.2.5 Habilidades de investigación

8.1.2.6 Preocupación por la calidad

8.2 Fitopatología

8.2.1 Competencias específicas

8.2.1.1 Identificar los síntomas y signos de los principales fitopatógenos en campo.

8.2.1.2 Aplicar técnicas de monitoreo de enfermedades en campo.

8.2.2 Competencias genéricas

8.2.2.1 Habilidades en el manejo de instrumental de laboratorio.

8.2.2.2 Solución de problemas.

8.2.2.3 Toma de decisiones.

8.2.2.4 Destrezas sociales relacionadas con las habilidades interpersonales.

IX. CONCLUSIONES

En base al segundo objetivo establecido podemos concluir que el tiempo de adherencia de los bulbos en cada uno de los sustratos utilizados fue distinto se notó que en el sustrato hecho de madera de tinto las orquídeas presentaron una mayor rapidez de adaptación y desarrollo de las raíces a diferencia del sustrato realizado a base de negro.

No se pudo comparar los tipos de propagación debido a un problema que se presentó en la propagación vegetativa en el cual las semillas no lograron germinar en el tiempo que se tenía previsto.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

ARDITTI, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. Department of Developmental and Cell Biology. Ed. John Wiley and Sons. USA. 691 p.

ARDITTI, J. 1993. Micropropagación of orchids. Ed. John Wiley and Sons. New York. 949 p.

ARDITTI, J.; GHANI, A. K. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Physiologist* 145 (3): 367–421.

BENAVOLI, M. R.; PENNISI, A. M. 1998. The effect of PVP on chestnut callus formation. *Acta Hort (ISHS)* 457: 17–20.

BECTHEL, H; CRIBB, P; LUANERT, E. 1981. The Manual of cultivated orchids species. Ed. Eugen Ulmer GmbH and Co. West Germany. 444 p

HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M. A.; SALAZARCHÁVEZ, G. A.; JIMÉNEZ-MACHORRO, R; LÓPEZ-ROSAS, M. A.; DRESSLER, R. L. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoin, México. 303 p. MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. 2006. Rapid in vitro propagation of Dendrobium hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocormlike bodies. *Scientia Horticulturae* 108 (1): 95-99.

Pierik R. 1990. Cultivo in vitro de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 301 p.

PAN, CH. L. 2007. Marching Towards the Market: The Business Potencial of Agricultural Biotechnology in the Republic of China, pp. 89– 92. *In: Business Potencial for Agricultural Biotechnology Products*. TENG, S. P. (ed). The Asian Productivity Organization. Tokio, Japon.

XI. ANEXOS

11.1 anexo 1.

NORMA Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003, Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

JUAN RAFAEL ELVIRA QUESADA, Subsecretario de Fomento y Normatividad Ambiental de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, con fundamento en lo dispuesto en los artículos 32 Bis fracciones I, II, IV y V de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 36, 37, 37 Bis, 137 segundo párrafo, 160 y 171 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; 38 fracción II, 40 fracciones III, X y XIII, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 51 y demás aplicables de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, 33 y 34 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo establecido en la fracción I del artículo 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, con fecha 10 de octubre de 2003 se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, con carácter de proyecto la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-083-SEMARNAT-2003, Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial, con el fin de que dentro de los 60 días naturales siguientes a su publicación, los interesados presentaran sus comentarios ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, sito en Bulevar Adolfo Ruiz Cortines número 4209, 5o. piso, colonia Jardines en la Montaña, código postal 14210, Delegación Tlalpan, Distrito Federal o se enviaran al fax 56-28-08-98 o al correo electrónico: debuen@semarnat.gob.mx, que para el efecto se señalaron. Durante el citado plazo, la Manifestación de Impacto Regulatorio correspondiente estuvo a disposición del público en general para su consulta en el citado domicilio, de conformidad al artículo 45 del citado ordenamiento.

Que en el plazo de los 60 días antes señalado, los interesados presentaron sus comentarios al proyecto en cuestión, los cuales fueron analizados en el citado Comité, realizándose las modificaciones correspondientes al mismo. La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales publicó las respuestas a los comentarios recibidos en el **Diario Oficial de la Federación** el día 29 de septiembre de 2004.

Que habiéndose cumplido con el procedimiento establecido en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, en sesión ordinaria de fecha 9 de junio de 2004, aprobó la Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003, Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial. Por lo expuesto y fundado se expide la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-083-SEMARNAT-2003,
ESPECIFICACIONES DE PROTECCION AMBIENTAL PARA LA SELECCION
DEL SITIO, DISEÑO, CONSTRUCCION, OPERACION, MONITOREO,
CLAUSURA Y OBRAS COMPLEMENTARIAS DE UN SITIO DE DISPOSICION
FINAL DE RESIDUOS SOLIDOS URBANOS Y DE MANEJO ESPECIAL**