



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *Barkeria uniflora*  
LEX. DRESSLER & HALBINGER, UNA ORQUÍDEA  
ENDÉMICA DE MÉXICO.**

**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:

**IRVING JULIAN DUARTE SALINAS**

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

Financiado por: DGAPA-PAPIME PE206113



MÉXICO, D.F

2014

**Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Maestra en Ciencias Bárbara Susana Luna Rosales, en la Unidad de Investigación en Biología Vegetal en La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

***In Memoriam Maestro Amadeo Barba Álvarez***



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**"ZARAGOZA"**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **DUARTE SALINAS IRVING JULIAN**, con número de cuenta **409017575**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **10** del mes de **junio** de 2014 a las **10:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Biól. JUAN ROMERO ARREDONDO

**VOCAL** M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES

**SECRETARIO** Biól. MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ MUÑOZ

**SUPLENTE** Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

**SUPLENTE** M. en C. FLORENCIA BECERRIL CRUZ

*[Handwritten signatures of the jury members]*

El título de la tesis que presenta es: **GERMINACIÓN IN VITRO DE *Barkeria uniflora* LEX. DRESSLER & HALBINGER, UNA ORQUÍDEA ENDÉMICA DE MÉXICO.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
México, D. F., a 10 de junio del 2014

**DR. VÍCTOR MANUEL SANDOVAL NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**  
**ZARAGOZA**  
**DIRECCION**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

*[Handwritten signature]*  
VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## **AGRADECIMIENTOS**

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales por todo su apoyo, tiempo, confianza, disposición y ayuda brindada para la elaboración de ésta tesis. Pero sobre todo gracias por su amistad.

Al M. en C. Armando Cervantes Sandoval por todo su apoyo brindado para el término de esta tesis.

A los miembros del jurado, por su tiempo, disposición y aportaciones durante la revisión de la tesis.

Biól. Juan Romero Arredondo  
M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales  
Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz  
Dra. Hortensia Rosas Acevedo  
M. en C. Florencia Becerril Cruz

## DEDICATORIAS

**A mis padres,** por su paciencia, comprensión, su inmenso apoyo, sus palabras de aliento, por todo el esfuerzo y sacrificio, pero sobre todo por su gran cariño y amor, siempre estaré agradecido por su ayuda incondicional.

**A mis hermanos,** por estar siempre conmigo, por compartir mis metas y derrotas, sus consejos y apoyo, pero sobre todo, gracias por ser mis mejores amigos.

**A mi má Juana,** por estar siempre a mi lado, por apoyarme siempre, por tu amor, cariño y buenos consejos, tu confianza y educación. **A mi pá Santos,** aunque ya no estés en este mundo siempre estaré agradecido por todo el apoyo, amor y educación que siempre me brindaste.

**A Martha,** gracias por tu inmenso apoyo, tu amor, tus consejos, por estar conmigo en las buenas y en las malas, tus palabras de aliento, tus regaños, por hacer más alegres esos días de trabajo en el laboratorio, te agradezco por ayudarme a crecer como persona.

**A mis compañeros,** Alejandra, Héctor, Bernardo y Paola, por hacer las prácticas de campo más divertidas, por su apoyo en el laboratorio y por su amistad.

A mis **amigos del Museo de la Luz,** de la **FES ZARAGOZA,** especialmente a Oscar, Aldo y Ramiro, gracias por todo su apoyo, por todos los buenos y malos momentos y por todas sus palabras de aliento.



**Gracias maestro Amadeo, por su apoyo, confianza, tiempo y ayuda brindada para la elaboración de ésta tesis, gracias por sus consejos, su confianza, sus enseñanzas y conocimiento. Pero sobre todo por su amistad, por esas largas y amenas pláticas que teníamos, por todos esos momentos de risas y por haberme orientado acertadamente un gran número de veces.**

**Siempre lo recordaré.**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	I
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
Generalidades de las Orquídeas .....	3
Germinación de las Semillas de Orquídea .....	7
Reproducción .....	10
Cultivo <i>in vitro</i> .....	10
Cultivo <i>in vitro</i> de Orquídeas .....	11
Medios de cultivo .....	12
Medios Nutritivos .....	13
Sales inorgánicas .....	13
Carbohidratos .....	14
Carbón Activado .....	16
Materiales inertes de soporte .....	16
Género <i>Barkeria</i> (Knowles y Wetc., 1838) .....	17
Clasificación taxonómica .....	17
Descripción Botánica <i>Barkeria uniflora</i> (La Llave & Lex.) Dressler & Halb. ..	18
Distribución .....	19
Ecología .....	20
Estado de conservación .....	21

<b>CULTIVO <i>IN VITRO</i> DEL GÉNERO <i>Barkeria</i></b> .....	<b>22</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>25</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	<b>26</b>
<b>Material Biológico</b> .....	<b>26</b>
<b>Evaluación de Viabilidad</b> .....	<b>26</b>
<b>Medios de Cultivo</b> .....	<b>27</b>
<b>Carbohidratos Experimentales</b> .....	<b>27</b>
<b>Desinfestación y siembra de semillas</b> .....	<b>28</b>
<b>Evaluación de la Germinación</b> .....	<b>29</b>
<b>Evaluación del Índice de Desarrollo</b> .....	<b>29</b>
<b>Evaluación del estadio 8 a los 98 días de cultivo</b> .....	<b>30</b>
<b>Diseño estadístico</b> .....	<b>30</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>Viabilidad</b> .....	<b>32</b>
<b>Germinación de semillas de <i>Barkeria uniflora</i></b> .....	<b>33</b>
<b>Índice de Desarrollo</b> .....	<b>36</b>
<b>Índice de Desarrollo para el Medio Murashige &amp; Skoog</b> .....	<b>41</b>
<b>Índice de Desarrollo para el Medio Kao y Michayluk</b> .....	<b>46</b>

<b>Índice de Desarrollo para el Medio Knudson C .....</b>	<b>50</b>
<b>Respuesta Morfogénica en los diferentes Carbohidratos. ....</b>	<b>55</b>
<b>Medio MS al 100 % .....</b>	<b>55</b>
<b>Medio MS al 75 % .....</b>	<b>56</b>
<b>Medio MS al 50 % .....</b>	<b>57</b>
<b>Medio KM al 100 % .....</b>	<b>57</b>
<b>Medio KM al 75 % .....</b>	<b>58</b>
<b>Medio KM al 50 % .....</b>	<b>59</b>
<b>Medio KC al 100 %.....</b>	<b>60</b>
<b>Medio KC al 50 %.....</b>	<b>61</b>
<b>Plantas Completas a los 98 días de cultivo. ....</b>	<b>62</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo 1. Composición de los medios nutritivos.....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo 2. Resultados .....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 3 Análisis de varianza para ID por todos los tratamientos. ....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 3.1 Rangos Múltiples para ID por Tiempo. ....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 3.2 Rangos Múltiples para ID por Medio nutritivo. ....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo 3.3 Rangos Múltiples para ID por [ ] Sales. ....</b>	<b>85</b>

<b>Anexo 3.4 Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos.....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo 3.5 Análisis de varianza para el ID por Medio MS.....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo 3.6 Rangos Múltiples para ID por Tiempo (MS).....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 3.7 Rangos Múltiples para ID por [ ]Sales (MS). ....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 3.8 Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos (MS).....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 3.9 Análisis de varianza para el ID por Medio KM.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 3.10 Rangos Múltiples para ID por Tiempo (KM). ....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 3.11 Rangos Múltiples para ID por [ ] Sales (KM). ....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 3.12 Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos (KM).....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 3.13 Análisis de varianza para el ID por Medio KC.....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 3.14 Rangos Múltiples para ID por Tiempo (KC).....</b>	<b>88</b>
<b>Anexo 3.15 Rangos Múltiples para ID por [ ] Sales (KC).....</b>	<b>88</b>
<b>Anexo 3.16 Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos (KC).....</b>	<b>88</b>
<b>Anexo 3.17 Análisis de varianza plantas completas. ....</b>	<b>88</b>
<b>Anexo 3.18 Rangos Múltiples para plantas completas .....</b>	<b>88</b>

## RESUMEN

*Barkeria uniflora* (Lex.) es una orquídea epífita endémica de México con flores de gran belleza que se ha visto afectada por la alteración de su hábitat, propiciado por la intensa actividad humana y por la extracción de ejemplares adultos con fines de ornato o comerciales.

El presente estudio tuvo como objetivo establecer un protocolo efectivo para la germinación de *B. uniflora* por medio del estudio del efecto de distintas fuentes exógenas de azúcares y de medios nutritivos a diferentes concentraciones. Se indujo la germinación a partir de la siembra de semillas de *B. uniflora* durante 98 días se registró el desarrollo ontogénico y el índice de desarrollo, al término del cultivo se determinó el porcentaje de plantas completas obtenidas. Los medios nutritivos utilizados fueron las sales inorgánicas analíticas, Kao y Michayluk (KM), Murashige & Skoog (MS) y Knudson C, en una concentración del 100 %, 75 % y 50 %, suplementados con sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y galactosa como fuente exógena de azúcar.

Las semillas germinaron a partir de los siete días de iniciado el cultivo en todos los tratamientos, excepto en aquellos suplementados con galactosa. El máximo porcentaje de germinación fue de 99 %, en los medios con maltosa, fructosa, glucosa y sacarosa.

El medio de cultivo Kao y Michayluk (KM) fue el que promovió de mejor manera el desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* ya que para los 56 días de cultivo los protocormos ya presentaban una hoja, seguido por el medio Murashige & Skoog y por último el medio Knudson C. Las sales inorgánicas diluidas a la mitad de su concentración son las que generan una mayor respuesta para la germinación de *B. uniflora* independientemente del medio de cultivo usado.

La maltosa y fructosa como fuente exógena de carbón y de energía induce el desarrollo morfológico del embrión en las semillas de *Barkeria uniflora* y concluyen su desarrollo a los 91 días de cultivo. La galactosa es tóxica para las semillas de *B. uniflora* ya que no inducen su germinación y éstas mueren.

El máximo porcentaje de plantas completas se obtuvieron en el medio MS con el estímulo de maltosa (84 %) y en KM adicionado con fructosa (83 %). Se estableció así un protocolo de germinación asimbiótica *in vitro* para las semillas de *Barkeria uniflora*, como una estrategia de conservación con la finalidad de reducir la presión en las poblaciones silvestres de esta especie.

## INTRODUCCIÓN

México es un país con una excepcional riqueza biológica, en parte debido a su ubicación geográfica, ya que se sobrepone y entrelaza con 2 regiones biogeográficas: la neártica y la neotropical (Hágsater *et al.*, 2005). A esta condición se suma una compleja historia geológica y una accidentada topografía, lo que explica la enorme variedad de condiciones ambientales que hacen posible la inmensa heterogeneidad en su diversidad biológica. En México es posible localizar 10% de las especies de plantas superiores del planeta, y más del 40% de ellas son exclusivas del territorio nacional, es decir son especies endémicas (CONABIO, 2000). Las familias de plantas mejor representadas en México son las Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Orchidaceae, esta última con aproximadamente 1260 especies y 170 géneros (Villaseñor, 2003; Hágsater *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007) y se estima que el número final de especies estará entre 1 300 y 1 400, lo que le confiere el cuarto lugar en cuanto a riqueza de especies vegetales (Hágsater *et al.*, 2005).

La Orchidaceae incluye aproximadamente 800 géneros y alrededor de 20,000 especies. Los miembros de esta Familia se pueden encontrar en todo el mundo, aunque su presencia es más importante en el cinturón tropical del planeta en donde se encuentra casi el 56 %. (Espejo *et al.*, 2002). En México la riqueza Orquideológica se manifiesta con más de 1260 especies, el porcentaje de endemismos es alto, aproximadamente 40 % de especies, 8 % de géneros y generalmente se delimita a cadenas montañosas o a zonas de extensión reducida. (Luna *et al.*, 2007). Las Orquídeas se ubican al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y del Golfo, en altitudes que pueden rebasar los 3, 500 m. (Espejo y López-Ferrari, 1998; Hágsater *et al.*, 2005; Soto, 1988).

La Orchidaceae se considera la más evolucionada dentro del reino vegetal, ya que presentan una gran complejidad y especialización en su morfología floral y en sus tipos de polinización. Lo anterior es el resultado de sus numerosas adaptaciones estructurales y funcionales. Algunas de las más interesantes son las que están relacionadas con sus semillas y con los procesos relacionados a la germinación y al desarrollo de las plántulas. Asimismo existen dentro de la familia muy diversas formas de vida y desde el punto de vista ecológico muchos de sus integrantes son componentes importantes en diversos tipos de vegetación. (Espejo *et al*, 2002).

Dado la belleza y rareza de sus flores, un gran número de especies son buscadas por horticultores y el público en general, por lo que constituye además una importante fuente de ingreso para algunos países tropicales. (Espejo *et al*, 2002).

Una de las características más interesantes de esta familia es su alta proporción de especies endémicas, se han registrado 444 especies o subespecies que corresponden aproximadamente al 40 % del total del taxa en el país. (Espejo *et al*, 2002). Lo anterior la convierte en una de las familias más ricas en endemismos entre los países de América Tropical. (Hágsater *et al*, 2005).

Las Orchidaceae es una de las familias más vulnerables por la destrucción y transformación de sus hábitats, crecimiento urbano desordenado, extracción masiva de plantas de poblaciones silvestres (tráfico ilegal de especies), dado su alto valor hortícola, comercial y por las características ecológicas que presentan las especies, como sus bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y el escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales (Sarmiento y Romero, 2000).

Las orquídeas presentan problemas serios para su propagación en forma natural debido a que la mayor parte de las semillas están escasamente diferenciadas por lo que no se les distinguen los cotiledones ni las radículas y carecen de endospermo (Pierik, 1990).

Es bien conocido el largo periodo de tiempo que se requiere para la propagación; establecimiento, desarrollo y floración de las orquídeas, sin embargo es posible disminuir este tiempo e incrementar las poblaciones a través de modernas técnicas biotecnológicas de cultivo; suministrando las condiciones óptimas y los nutrimentos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Francisco, 2008).

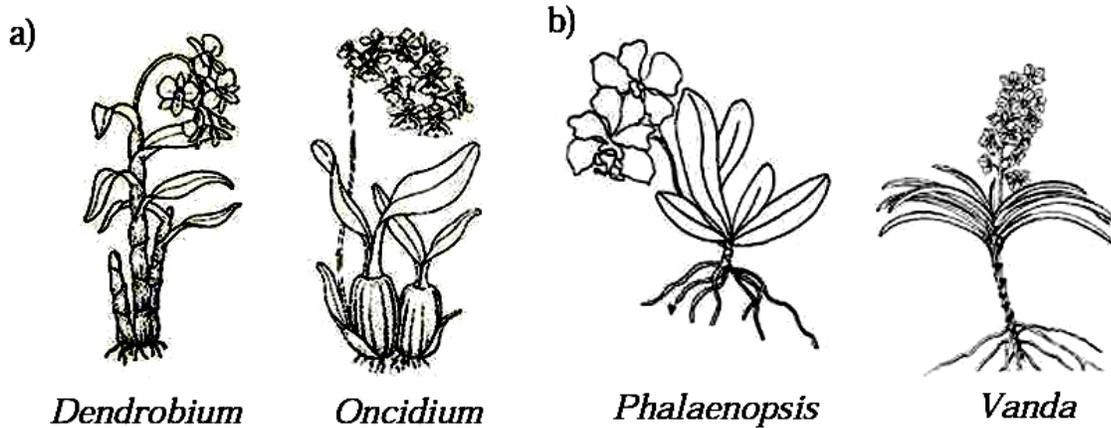
La presente investigación tuvo como finalidad establecer un protocolo de germinación *in vitro* para *Barkeria uniflora*, especie endémica, por medio del estudio del efecto de distintas fuentes exógenas de azúcares y de medios nutritivos a diferentes concentraciones para su conservación y desarrollo sostenible.

## **ANTECEDENTES**

### **Generalidades de las Orquídeas**

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes, de hábito epífita, terrestre, litófilo, semiacuático, saprófito y raramente subterráneo (restringidas a Australia). Presentan una estructura básica a la de muchas otras monocotiledóneas. Están constituidas por vástagos organizados que pueden generar dos hábitos de crecimiento; en el primer tipo de crecimiento, el desarrollo se da mediante la extensión vegetativa a partir de un meristemo apical que da lugar a un solo eje principal (monopodial). Entre las orquídeas mexicanas este tipo de crecimiento se presenta principalmente en las vainillas, en los géneros *Campylocentrum*, *Dendrophylax* y *Dichaea* y en algunas especies de *Epidendrum*.

En el segundo el eje está formado por una serie de vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemas o yemas de renuevo situadas basal, lateral o apicalmente en el vástago anterior, el conjunto de vástagos forma un eje compuesto (simpodial) (Fig.1). En los géneros *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Cymbidium* se aprecia este tipo de crecimiento (Bell y Bryan, 1991).



**Figura 1.** Tipos de crecimiento en orquídeas: a) Simpodial, b) Monopodial.

Los tallos de las orquídeas son comparables a una caña o carrizo. Pueden ser caulescentes o acaules. Las orquídeas con tallo caulescentes por lo general presentan pseudobulbo, los cuales son tallos aéreos notablemente engrosados, presentes en muchas orquídeas epífitas y algunas terrestres o rupícolas, como en el género *Cyrtopodium* (Hágsater *et al.*, 2005).

Están formados por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrizales donde originalmente se insertaban hojas, vainas o escamas foliares: son de distintas formas y grosores. Las orquídeas acaules tienen un tallo corto, como en muchas orquídeas terrestres que presentan tubérculos o cormos característicos en varios grupos de orquídeas epidendroides terrestres como *Bletia*, *Govenia*, *Liparis* y *Malaxis* (De la Cruz, 2006).

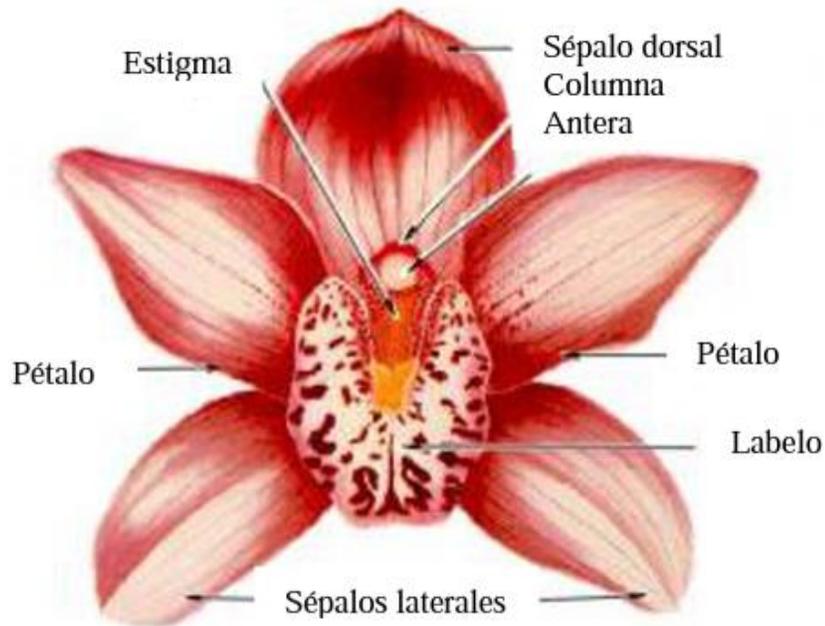
Ambos tipos de tallos engrosados son útiles como almacenes de agua y sustancias de reserva, como el almidón, que son utilizados para sustentar la producción de flores y frutos y el desarrollo de vástagos (Hágsater *et al.*, 2005).

Las raíces de las orquídeas son órganos que presentan diferentes adaptaciones. Tienen las funciones de absorber agua, nutrientes y fijar la planta al suelo o a materia orgánica acumulada en troncos. Son simples o ramificadas, carnosas y con un diámetro aproximado de entre 1 y 10 mm dependiendo de la especie. Por lo general son circulares con corte transversal (Hágsater *et al.*, 2005). La porción más externa de la raíz es la epidermis, que suele formar un tejido esponjoso constituido por células que al madurar mueren y pierden el citoplasma, quedando sólo sus paredes parcialmente engrosadas, está cubierta de células muertas llamada velamen puede tener entre una y ocho células de grosor y es lo que le confiere el aspecto blanquecino característico a muchas raíces de orquídeas epífitas como *Barkeria scandens* y *Laelia autumnalis* (Hágsater *et al.*, 2005).

Las hojas son como en la mayoría de las monocotiledóneas, es decir simples, con nervaduras paralelas, alargadas, generalmente persistentes, solitarias, en número de dos o más hojas, lanceoladas, trianguladas, forma ovalada y de color generalmente verde (De la Cruz, 2006).

Estos órganos pueden ser filiformes y hasta orbiculares, membranosas o coriáceas e incluso pueden almacenar agua (Dressler, 1981). En algunas especies como las pertenecientes al género *Trichocentrum*, donde los pseudobulbos son diminutos, las hojas cumplen el papel de almacenar agua y de reservas alimenticias (Hágsater *et al.*, 2005; De la Cruz, 2006). Las hojas suculentas presentan una inversión importante de recursos para la planta y por lo general son funcionales durante varios años. Una estrategia alternativa es la producción de hojas delgadas relativamente poco costosas que mueren y caen al finalizar cada temporada de crecimiento (Hágsater *et al.*, 2005).

La flor está constituida por tres sépalos generalmente coloreados, al igual que los pétalos y pueden estar libres o más o menos unidos formando un tubo. El sépalo dorsal difiere generalmente en la forma de los laterales, los cuáles son más o menos oblicuos y pueden estar libres uno del otro o adheridos frecuentemente por la base, (Fig. 2). Se componen de 3 pétalos, dos son semejantes morfológicamente y el tercero llamado labelo está modificado, su posición inferior corresponde al giro del pedicelo o de éste y el ovario (resupinación) (Hágsater *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Morfología básica de la flor en orquídeas: Género *Cymbidium*

El labelo generalmente difiere en forma, tamaño y coloración de los otros pétalos, la superficie interna generalmente está adornada con papilas o lamelas y la base puede ser pequeña o muy amplia formando un nectario. Las flores de las orquídeas por lo general son hermafroditas y portan tanto órganos sexuales masculinos (estambres y sus anteras) como femeninos (ovario, estilo y estigma), para constituir una estructura única llamada columna o ginostemio.

En muchas especies un lóbulo estigmático llamado rostelo, se proyecta sobre la superficie estigmática que permite adherir los polinios a los insectos. La antera puede estar dividida y contener 2, 4, 6 y 8 polinios y se ubica en una cavidad llamada clinandrio. Tienen ovario ínfero con 1-3 divisiones que puede ser inconspicuo o notorio (Hágsater *et al.*, 2005).

Entre las características más notables de las orquídeas está el tamaño y estructura de las semillas. Tienen un peso promedio de 3 a 14  $\mu\text{g}$  y miden de 0.4 a 1.25 mm de longitud y de 0.08 a 0.27 mm de ancho, la semilla contiene un pequeño embrión esférico o piriforme dentro de una testa membranosa, frecuentemente transparente o bien pigmentada. La mayoría de las especies tienen embriones relativamente indiferenciados, sin cotiledones, ni endospermo, lo cual se considera una característica de grupos avanzados evolutivamente.

El número de semillas producido por fruto varía con el género y la especie, fluctúan de 1 300 a 4 000 000 (Chávez, 1980; Arditti, 1992), Chávez (1980) reportó para frutos de *Bletia urbana* entre 92 625 y 117 200 semillas.

Hay algunas semillas que presentan un embrión relativamente diferenciado que incluye un cotiledón rudimentario, como en *Sobralia macrantha* y otras que no tienen embrión diferenciado y carecen de cotiledón o se presenta incipiente y sin endospermo, por lo que las reservas nutritivas se encuentran almacenadas en las células del embrión, además al suspensor se le atribuye parte del papel de la nutrición (Arditti, 1967).

## **Germinación de las Semillas de Orquídea**

El proceso de germinación es similar en todas las especies de Orquídea (Arditti, 1992), este comienza con el hinchamiento del embrión (imbibición) y rompimiento de la testa (Estadio 2), el embrión se elonga para formar una estructura globular llamada protocormo (Estadio 3) (Harrison, 1977; Leroux *et al.*, 1995) en éste, se forma una depresión en la superficie más alta y los pelos absorbentes comienzan a crecer de la epidermis.

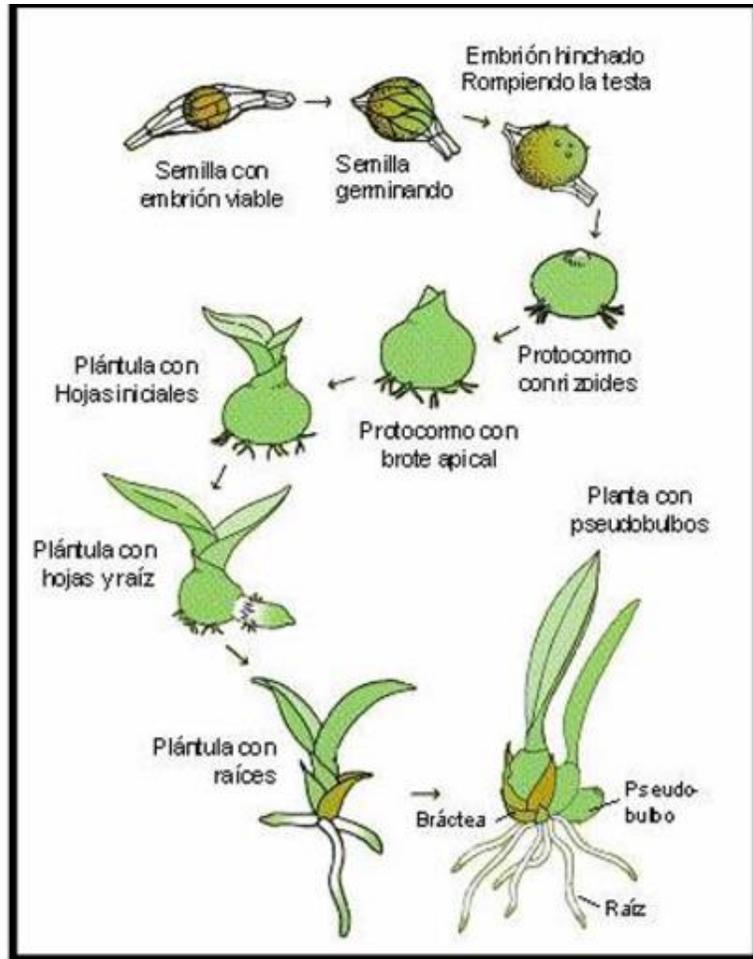
Un primordio foliar (Estadio 4) emerge de esta depresión a medida que el protocormo sigue creciendo y una segunda (Estadio 5) y tercera hoja se forman precedidas por el desarrollo de la raíz (Estadio 6). El tiempo requerido para cada uno de estos estadios varía de acuerdo a la especie de orquídea (Knudson, 1922 en Baker *et al.*, 1987).

En las semillas de orquídea, los tres primeros estadios de germinación suceden secuencialmente sólo por la presencia de agua y de sus propias reservas, pero la progresión en los estadios superiores depende de la presencia de un hongo simbiote. Sin una fuente externa de glúcidos el protocormo es incapaz de producir los azúcares necesarios para la organogénesis; el protocormo sobrevive gracias a la lenta utilización de sus reservas lipídicas y proteínicas (Arditti, 1966; Harrison, 1977; Harrison y Arditti, 1978, Arditti *et al.*, 1990, Leroux *et al.*, 1995, Stacanto *et al.*, 1998), pues hay evidencias que indican que las semillas no poseen glioxisomas, los organelos necesarios para el metabolismo de los lípidos en la obtención de carbohidratos (Harrison, 1977; Leroux *et al.*, 1995; Stacanto *et al.*, 1998). Esto explica la necesidad de las semillas de orquídea de una fuente externa de carbohidratos; por tal motivo, en su hábitat natural establecen una relación simbiótica con un hongo micorrízico (Arditti, 1966, 1979; Harrison, 1977; Harrison y Arditti, 1978, Arditti *et al.*, 1990, Leroux *et al.*, 1995, Stacanto *et al.*, 1998).

El proceso de germinación, aunque con algunas diferencias, es similar entre la mayoría de las orquídeas (Arditti, 1993). Este proceso inicia con la absorción de agua por el embrión, posteriormente esta estructura se hincha y ensancha, sus células se alargan, se vacuolan por lo que el embrión asume una forma esférica (etapa de esférula pequeña), después estas células hacen presión constante con la testa hasta romperla.

Las células del embrión inician con síntesis de clorofila, utilizan el material alimenticio almacenado de la semilla, y una vez iniciado el crecimiento, continúa con la absorción de la materia orgánica del sustrato y comienza la diferenciación de los órganos, se desarrollan rizoides a partir de la epidermis y a su vez se desarrolla el domo meristemático en la base del ápice (Shushan, 1959).

Conforme esta estructura aumenta en tamaño se forma una masa globular de células (protocormo) con una depresión en su superficie superior. El primordio foliar emerge a partir de esta depresión conforme el protocormo continúa su desarrollo. Una segunda y una tercera hoja se forman precedidas por el desarrollo de la raíz, se forma clorofila en las hojas o en otros órganos. (Fig. 3). El tiempo requerido para cada uno de estos eventos varía de acuerdo a las especies (Arditti, *et al.*, 1979; Baker *et al.*, 1987).



**Figura 3.** Estadios ontogénicos de *Laelia sp.* Según Seaton y Ramsay (2005).

## **Reproducción**

Todas las orquídeas requieren para su germinación y desarrollo una asociación con hongos micorrízicos (Otero y Bayman, 2009). La micorriza orquideoide se caracteriza porque la mayoría de los hongos que participan en la asociación son del género *Rhizoctonia*, la cual establece una asociación particular con las orquídeas, ya que la planta en su estado de semilla es totalmente dependiente de los nutrientes que le suministra el micosimbionte para lograr una exitosa germinación (Bernard, 1909; Arditti, 1992; Otero y Bayman, 2009). En las células corticales de las raíces el hongo origina una estructura denominada “pelotón” que es un enrollamiento hifal (Hadley y Williamson, 1972).

Un estudio realizado por Knudson (1946), demostró que es posible la germinación asimbiótica de embriones de orquídeas *in vitro*, sin la presencia del hongo, mediante el cultivo en un medio que contenga minerales y azúcares. La reproducción sexual de las orquídeas por los métodos convencionales de propagación presenta problemas ya que la semilla es tan pequeña que contiene muy pocas o ninguna reserva alimenticia.

## **Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una definición genérica que incluye el cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos y plantas. Estos diferentes tipos de cultivo tienen como factor común el crecimiento en condiciones asépticas, en un medio nutritivo, generalmente gelificado, y en condiciones ambientales controladas y por lo tanto óptimas (Estopa, 2005).

## **Cultivo *in vitro* de Orquídeas**

Tradicionalmente las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas. Sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Arditti y Ernst, 1993).

Diversos medios nutritivos han sido desarrollados para el cultivo *in vitro* de orquídeas, estos han sido ampliamente aplicados en varias especies de esta familia, los medios se han enriquecido, y mejorado, registrándose resultados para su propagación. Una producción masiva de orquídeas se justifica con el uso de esta técnica ya que las orquídeas tienen un alto valor biológico, ecológico y comercial, mediante este proceso se puede mantener una producción anual continua, además de que están libres de patógenos, lo cual es muy útil si se piensa en exportación y en estudios de conservación.

La propagación *in vitro* de orquídeas se ha establecido a partir de segmentos de plántulas adultas, principalmente en medios de cultivo semisólidos (George y Sherrington, 1984).

Desde que Knudson desarrolló un método de cultivo *in vitro* asimbiótico para la germinación de semillas de orquídeas, este método tuvo un papel muy importante y significativo para la propagación de especies de orquídeas y de híbridos (Yoneo, 1991).

La técnica de germinación asimbiótica ha sido utilizada en muy diversas especies de orquídeas con fines de propagación, así como para estudiar el desarrollo de las plántulas. Harrison y Arditti en 1978; Manning y Staden en 1987 y Gravel en 1989 reportaron que ésta técnica ha permitido obtener conocimientos sobre las características morfofisiológicas y ontogénicas de protocormos y plántulas de ciertos grupos durante la germinación *in vitro*.

## Medios de cultivo

En 1946, Knudson demostró que las semillas de orquídea podían germinar en ausencia del hongo micorrízico que las coloniza, cultivándolas *in vitro* en un medio de cultivo adicionado con sales minerales y azúcares. Knudson logró germinar semillas de *Cattleya*, *Epidendrum*, *Laelia* y otras orquídeas.

Sin embargo, varios autores han demostrado que no siempre es posible que una especie de orquídea determinada logre germinar y se desarrolle en un medio de cultivo dado. Por tal motivo un gran número de autores ha propuesto una serie de medios de cultivo para géneros de orquídea específicos. Dentro de los medios más importantes están: Knudson B (1922); Knudson C (1946); Murashige y Skoog (1962) entre otros (Ballard, 1987; George *et al.*, 1987; Pierik, 1990; García *et al.*, 1993).

Un medio de cultivo consta de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Existen diferentes tipos de medios de cultivo disponibles; sin embargo, algunos son específicos para ciertas especies.

El medio de cultivo utilizado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada, puesto que ya no existe la intermediación del hongo (McKendrick, 2000).

Cuando se inicia el proceso de germinación para una nueva especie es aconsejable probar con diferentes medios de cultivo a una concentración total y parcial para determinar cuál es el mejor medio para dicha especie (McKendrick, 2000).

Según Thompson (1989), el medio de cultivo puede ser preparado utilizando cada uno de los ingredientes básicos o bien con una mezcla de sales basales comerciales.

## **Medios Nutritivos**

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro*. Merino (1987), señala que el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, asepsia, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Al utilizar las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, es como ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

## **Sales inorgánicas**

La composición mineral o sales inorgánicas se definen en forma precisa en cada uno de los medios nutritivos y está dada tanto por macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular.

Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables. Cuando estas fuentes son suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la producción de metabolitos (Ertola *et al.*, 1994).

Muchas células vegetales son sensibles a los niveles de fosfatos en el medio. Habitualmente, los fosfatos son almacenados en la vacuola y adquiridos desde allí para el crecimiento, mientras que la síntesis de metabolitos comienza al agotarse el fosfato vacuolar (Ertola *et al.*, 1994).

El hierro es esencial para el crecimiento celular. Se aconseja la utilización del quelato Fe-EDTA que aumenta la solubilidad del hierro.

La naturaleza y concentración de los micronutrientes empleados en los medios de cultivo surgen principalmente de resultados empíricos al evaluar la capacidad de cada elemento que afectan en el crecimiento. Los principales micronutrientes son el boro, el manganeso, el yodo y el zinc. No hay un estudio sistemático de su influencia en el crecimiento y la productividad.

Con el fin de optimizar las necesidades nutricionales de las diferentes especies de plantas se han realizado investigaciones dando como resultado la formulación de varias mezclas salinas; como es el caso de las fórmulas de Kao & Michayluk (1975) y Mitra y colaboradores (1976), que incluyen altas concentraciones de macronutrientes, como el nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ ; a diferencia, de la fórmula de Knudson (1946) empleada principalmente para orquídeas.

## **Carbohidratos**

Los carbohidratos además de ser una fuente de carbono y energía para el embrión son el estímulo disparador para su desarrollo morfogénico durante la germinación (Luna y Barba, 1993). Es importante señalar que en general se habla de carbohidratos genéricamente sin señalar la importancia del tipo, los requerimientos temporales de los mismos (Arditti y Ernst, 1984), y la concentración de estos en el medio, estos factores pueden afectar el crecimiento heterotrófico de los cultivos, debido a que el azúcar es la única fuente de carbono y energía para el crecimiento (Kubota y Toyoki, 1991).

Los carbohidratos pueden ser empleados esterilizados por filtración, utilizando membranas a baja presión, o en autoclave (Arditti & Ernst, 1984; Juárez, 1994). La esterilización en autoclave del medio de cultivo hidroliza la sacarosa y posiblemente otros azúcares y actualmente no está claro como las semillas de orquídeas utilizan o les afectan los oligosacáridos una vez que estos son esterilizados (Ernst *et al.*, 1971).

La inexistencia de reservas lipídicas en los embriones de orquídeas, puede explicar el requerimiento de un suplemento exógeno de carbohidratos simples solubles para que la semilla germine (Harrison y Arditti, 1978). Además, la disponibilidad de diferentes fuentes exógenas de carbono, son necesarias para la germinación de las semillas de orquídeas y el temprano desarrollo de las plántulas bajo las condiciones simbióticas o asimbióticas, por lo menos hasta que las plantas comiencen a ser autótrofas. Dicho proceso no ha sido completamente investigado (Tsuitsui y Tomita, 1990).

Las semillas de diferentes especies de orquídeas tienen la capacidad de utilizar para su germinación varios carbohidratos, aunque es común que muestren alguna preferencia por algún carbohidrato en especial; en diversos estudios se ha demostrado que hay especies que germinan *in vitro* únicamente si está presente un determinado carbohidrato o cuando existe una mezcla entre algunos de ellos (Arditti, 1967).

Los carbohidratos que se utilizan comúnmente como promotores de la germinación son: fructuosa, glucosa, sacarosa, maltosa, manitol, rafinosa y melecitosa (Ernst *et al.*, 1971).

Los carbohidratos D-hexosas y sus pequeños oligosacáridos pueden ser usados para la germinación de semillas de orquídea, siendo la D-galactosa la excepción ya que es tóxica para ellas (Arditti, 1979).

Las semillas de orquídea pueden germinar y desarrollarse en un medio que contenga azúcares relativamente simples, ya que en la naturaleza las semillas son incapaces de utilizar largas moléculas sin la ayuda de un hongo que pueda romper estas moléculas y transformarlas en azúcares más simples como por ejemplo la fructosa y la glucosa (Ernst *et al.*, 1971; Bechtel *et al.*, 1986; Leroux *et al.*, 1995).

## **Carbón Activado**

El carbón activado es un agente antioxidante, que influye en todo proceso del cultivo así como en la aclimatización exitosa de las plantas. El carbón activado se caracteriza por una alta proporción de área-peso, ésto le confiere alta adsorción de sustancias. Provee aireación y adsorbe el etileno, adsorbe e inactiva el 5-hidroximetilfurfural, inhibe compuestos fenólicos y carboxílicos producidos por los cultivos (Arditti y Ernst, 1993).

## **Materiales inertes de soporte**

Merino (1987), señalan que el agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. Otros agentes gelificantes usados algunas veces en lugar del agar son la poliacrilamida y la sílica gel.

En medio líquido se usa papel filtro, como puente o plataforma así como la fibra de vidrio; se recomienda añadir carbón activado, ya que en bajas concentraciones ayuda a adsorber sustancias que se forman como desecho en los medios de cultivo.

## Género *Barkeria* (Knowles y Wetc., 1838)

Género relativamente pequeño con aproximadamente 15 especies, esencialmente mexicano, aunque un par de especies se encuentran en Centroamérica. Presenta flores atractivas por lo que ha sido buscado por los cultivadores de orquídeas. Hierbas epífitas o litófitas; tallos angostos, cubiertos por vainas; hojas deciduas, distribuidas a lo largo o en la mitad apical de los pseudobulbos, lanceoladas a ovadas; inflorescencia apical, racimosa, multiflora; ovario pedicelado; flores vistosas, rosadas a violeta-púrpura, o blancas; sépalos y pétalos similares, subiguales, los pétalos más anchos; labelo libre o unido a la columna en su porción basal, entero; disco ornamentado; columna paralela o divergente al labelo, con alas membranosas o carnosas, extendidas a cada lado del estigma; antera terminal, bilocular-polinios 4, cerosos, subiguales; cápsula elipsoide a cilíndrica (Halbinger, 1972; Thien y Dressler 1970).

### Clasificación taxonómica

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsidae

SUBCLASE: Liliidae

ORDEN: Orchidales

FAMILIA: Orchidaceae

SUBFAMILIA: Epidendroideae

GÉNERO: *Barkeria*

ESPECIE: *B. uniflora* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb.

Basónimo: *Pachyphyllum uniflorum* Lex.

Sinónimos: *Barkeria elegans* Knowles & Westc., 1838

*Epidendrum elegans* (Knowles & Westc) Rchb.f., Ann. 1872.

## **Descripción Botánica *Barkeria uniflora* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb.**

Planta herbácea cespitosa, de 12 a 2cm de alto; pseudobulbos fusiformes, delgados, de 2.5 a 5 cm de largo, de 2 a 3.5 mm de diámetro, formados por 3 ó 4 entrenudos, cubiertos por vainas escariosas, tubulares, blanquecinas, de 1 a 2 cm de largo; hojas 4, distribuidas a lo largo del pseudobulbo, deciduas, lámina lanceolada, de 3 a 7 cm de largo, de 0.5 a 1 cm de ancho, aguda.

Inflorescencia apical, racimosa, erecta, de 10 a 20 cm de largo, pedúnculo rollizo, delgado, de 3 a 7.5 cm de largo, cubierto completamente por brácteas escariosas, tubulares, agudas, brácteas florales mucho más pequeñas que el ovario, amplexicaules, oblongo-trianguulares, de 3 a 7 mm de largo, de 1.5 a 2 mm de ancho, agudas.

Flores de 3 a 5, simultáneas, resupinadas, de color violáceo claro, el labelo con la mitad apical de color magenta, la columna con manchas rojas en la parte dorsal, antera amarillenta; ovario rollizo, largo, de 15 a 30 mm de largo, de 1 a 2 mm de diámetro; sépalo dorsal extendido, elíptico, de 15 a 30 mm de largo, de (5)10 a 15 mm de ancho, obtuso, 7-nervado.

Sépalos laterales extendidos, lanceolados, de 20 a 32 mm de largo, de 6 a 12 mm de ancho, agudos, 7-nervados; pétalos extendidos, cortamente unguiculados, elípticos, de 18 a 30 mm de largo, de 10 a 17 mm de ancho, agudos, 7-nervados.

Labelo unido a la columna hasta una cuarta parte en su porción basal, entero, pandurado a obovado, de 21 a 29 mm de largo, de 13 a 23 mm de ancho, redondeado, disco 3-carinado, las carinas prolongándose más allá de la mitad de la lámina, prominentes.

Columna tubular, recta, de 13 a 15 mm de largo, de 1.5 a 2 mm de ancho, con 2 alas membranáceas, elípticas, obtusas a los lados del estigma; antera transversalmente semiorbicular; Cápsula elipsoide, 6-quillada, de 24 mm de largo, 13 mm de grosor, con un rostro de 11 mm de largo. (García-Cruz *et al.*, 2003). (Fig. 4).

## Distribución

Endémica de México, Cuenca del Rio Balsas y Llanura costera del Pacifico, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Guerrero y Oaxaca, reportada para Puebla y Morelos. (Soto Arenas *et al.*, 2008) (Fig. 5).

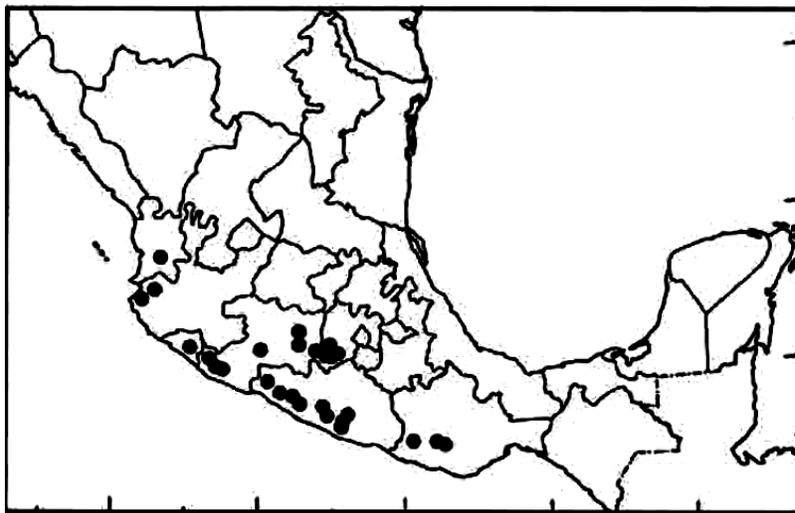


Figura 5. Distribución de *Barkeria uniflora* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb.

## Ecología

Crece en bosques tropicales caducifolios a una altitud que va de los 670 a 1300 msnm. Florece de octubre a enero con una mayor floración en noviembre. En el Estado de Michoacán se le conoce con el nombre “Corpus” y en Guerrero como “Tepalegua”. (Soto Arenas *et al.*, 2008)

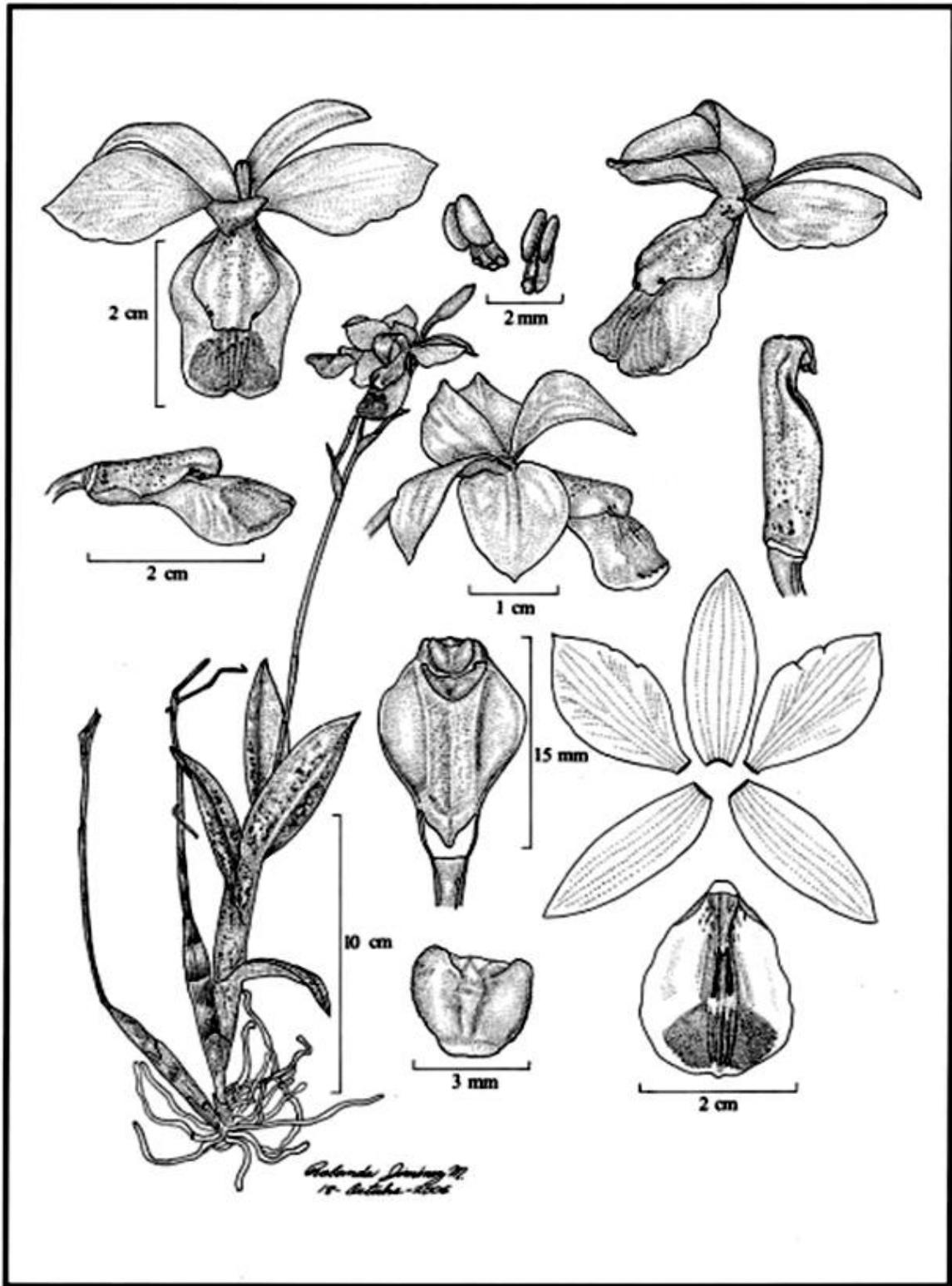


Figura 4. *Barkeria uniflora* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb (Soto Arenas *et al.*, 2008)

## Estado de Conservación

No Amenazada. Está muy extendida, forma poblaciones muy grandes y tolera la perturbación, pero se ha colectado en grandes cantidades para abastecer su demanda hortícola, siendo una orquídea de corta duración por lo que es siempre demandada. (Soto Arenas *et al.*, 2008). (Fig. 6).



**Figura 6.** *Barkeria uniflora* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb

## CULTIVO *IN VITRO* DEL GÉNERO *Barkeria*

Navarrete-Valencia y colaboradores (2011) obtuvieron la inducción de brotes y la regeneración de plantas de la especie *Barkeria uniflora* a partir de tejido de hojas de plántulas germinadas *in vitro*. Al utilizar una combinación de 10 mg.L<sup>-1</sup> de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) y 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de N 6-bencil amino purina (BAP), obteniendo un porcentaje promedio de ocho plantas con dos hojas y una raíz por cada explante cultivado.

Arenas y Aguirre (2012) reportan la germinación de *Barkeria scandens* a partir de semillas inmaduras, obteniendo un porcentaje de germinación de 45.84 % en medio KC, 45.81 % en KC con almidón de papa, 44.23 % en medio MS con aditivo orgánico y 38.16 % en MS a la mitad de su concentración.

Villafuerte (2013) cultivó *in vitro* secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartoni* y secciones de hoja y tallo de *B. scandens*, logrando la regeneración de plantas completas, mediante la inducción de embriogénesis somática. Para la germinación de las semillas de *B. whartoni* se empleó el medio de cultivo MS, obteniéndose 90% de germinación. Los explantes empleados para ambas especies, fueron cultivadas *in vitro*, en medio MS y MS 50%, adicionados con distintas concentraciones (0, 0.5, 1 mg.L<sup>-1</sup>) de (ANA) y (0, 1, 2, 2.5 mg.L<sup>-1</sup>) de (BAP); así como, con 50 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, ácido cítrico y 1 g/L de carbón activado. La inducción de los embriones somáticos se corroboró mediante el análisis estructural (histológico).

## JUSTIFICACIÓN

Las actividades humanas y asentamientos urbanos han inducido un uso indiscriminado de recursos naturales, generando efectos negativos en la biodiversidad, con la destrucción de los hábitats. El deterioro de la cubierta vegetal, ha provocado entre otros efectos la pérdida y disminución de especies vegetales (Ramamoorthy *et al.*, 1998).

México ha reconocido la urgente necesidad de proteger su flora, en particular de la Orchidaceae por la depredación general ocasionada por colectores profesionales y aficionados, esto además de la destrucción general de sus hábitats, ha causado un enorme decrecimiento en las poblaciones naturales.

La Orchidaceae es importante desde varios puntos de vista: 1) ecológica y biológicamente porque es una familia altamente especializada y 2) la belleza de sus flores, ha motivado al comercio ilegal de especies.

Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro* (Damon *et al.*, 2004; Pedroza *et al.*, 2005; Yamazaki y Kasumitsu, 2006; Pedroza y Mican, 2006; Haddix *et al.*, 2006; Steele, 2007). Sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar, por lo que hay que investigar cual es el medio de germinación adecuado para cada una de ellas.

*Barkeria uniflora* (Lex.) es una especie epífita con flores de gran belleza que se ha visto afectada por la alteración de su hábitat, propiciado por la intensa actividad humana y por la extracción de ejemplares adultos con fines de ornato o comerciales. Una alternativa potencial no sólo para mantener sino incrementar el número de individuos de ésta y otras plantas es el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), que ha demostrado obtener altas tasas de multiplicación a partir de un explante inicial.

Con base a las potencialidades de producción masiva de plantas de la técnica de cultivo *in vitro*, se plantea el presente estudio con la orquídea de la especie *Barkeria uniflora* aunado a la necesidad de generar conocimiento científico del desarrollo asimbiótico y como una estrategia de conservación con la finalidad de reducir la presión en las poblaciones silvestres de esta especie.

## HIPÓTESIS

Si las semillas cultivadas *in vitro* de diferentes especies de orquídeas, así como las de *Barkeria whartoni* y *B. scandens* germinan asimbióticamente, ésto es sin la presencia del hongo, sobre un medio de cultivo preparado con el tipo y concentración adecuados de sales inorgánicas y carbohidratos, entonces se espera que las semillas de *Barkeria uniflora* germinen al utilizar medios nutritivos con diferente composición y concentración de sales minerales adicionados con una fuente exógena de carbohidratos simples como estímulo para desarrollar plántulas completas.

## OBJETIVO GENERAL

- Establecer un protocolo para la germinación *in vitro* de *Barkeria uniflora*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el medio de cultivo más apropiado para la germinación de *Barkeria uniflora*.
- Establecer la respuesta morfológica del embrión durante su germinación asimbiótica *in vitro* con diferentes carbohidratos.
- Evaluar el porcentaje de plántulas con al menos una raíz verdadera (Estadio 8) en cada carbohidrato.
- Determinar cuál concentración de sales minerales genera mayor respuesta en la germinación de *Barkeria uniflora*.
- Determinar que carbohidrato es el mejor estímulo para inducir el desarrollo morfológico durante la germinación de *Barkeria uniflora*.

# MATERIAL Y MÉTODO

## Material Biológico

Para llevar a cabo la germinación *in vitro* se utilizaron semillas de *Barkeria uniflora* obtenidas del Banco de Semillas de la Unidad de Investigación en Biología Vegetal de las FES Zaragoza, colectadas el 15 de Diciembre de 2012, en el Municipio de Luvianos, Estado de México.

## Evaluación de Viabilidad

Para eliminar la posibilidad de utilizar semillas con baja respuesta, se determinó la viabilidad de estas, por medio del método bioquímico del TTC (cloruro de trifeniltetrazolio) (Moreno, 1984; Vujanovic *et al*, 2000; Ortiz, 2001). Se tomaron tres lotes de semillas que fueron colocados en sobres de papel filtro (2x2 cm). Los sobres fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % de cloro disponible adicionado con una gota de jabón líquido durante 10 minutos, una vez pasado el tiempo se enjuagaron con agua destilada estéril, para después colocarlos en una solución de tetrazolio al 1 % durante 24 horas en oscuridad a una temperatura de  $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ .

Una vez transcurrido el tiempo los sobres fueron retirados de la solución de tetrazolio y se enjuagaron con agua destilada estéril. Las semillas dentro de los sobres se observaron bajo el microscopio estereoscópico y se tomaron al azar dos lotes de 50 semillas, de las cuales se contaron las teñidas para posteriormente calcular el porcentaje de viabilidad de éstas mediante un rango que iba desde el color rojo, naranja y rosa (Moreno, 1984).

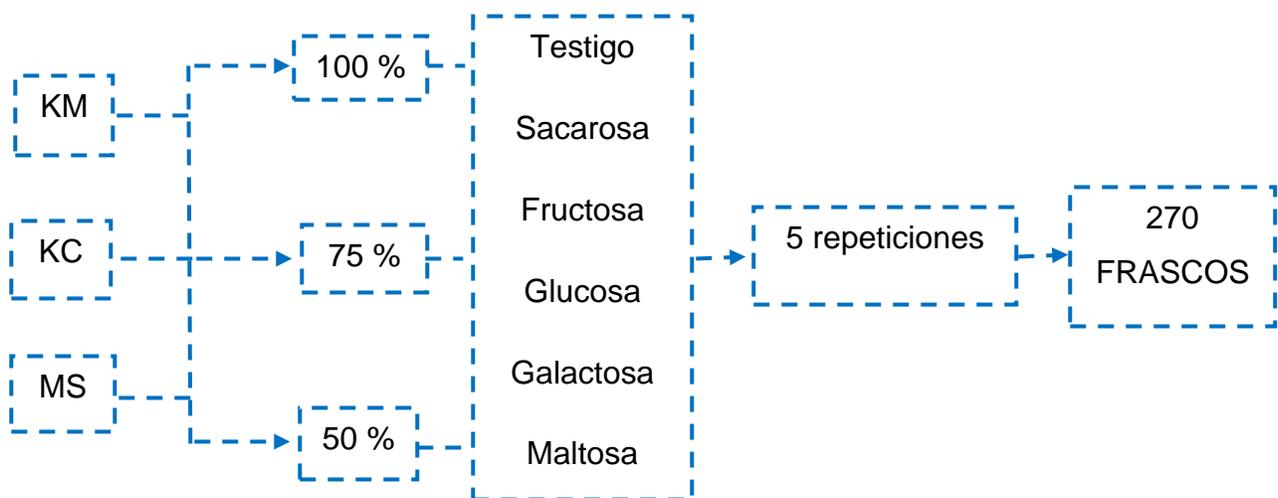
## Medios de Cultivo

Se utilizaron tres medios nutritivos con sales inorgánicas analíticas, Kao y Michayluk (KM), Murashige & Skoog (MS) y Knudson C (**Anexo 1**), en las siguientes concentraciones: 100 %, 75 % y 50 %, cada uno adicionados con vitaminas (tiamina 2 ml/L, niacina 2.5 ml/L, piridoxina 0.5 ml/L y myo-inositol 100mg/L), 5 g/L de Agar-gel como agente gelificante y carbón activado como antioxidante. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7, una vez preparado el medio se vació a los frascos de cultivo y se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120°C, a una presión de 20 lb/pulg.

## Carbohidratos Experimentales

La fuente de carbono exógena experimental para la germinación asimbiótica de las semillas de *Barkeria uniflora* fueron sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y galactosa en una concentración de 30 g/L. Las semillas se expusieron a los medios suplementados con los carbohidratos experimentales durante 98 días de cultivo, para determinar cuál o cuáles promovieron la morfogénesis de hojas y raíces en los embriones.

Se obtuvo un total de 54 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, dando un total de 270 frascos de cultivo. Se evaluaron 60 semillas por tratamiento estableciendo un cuadrante en el frasco, el cual fue el mismo durante toda la evaluación. **Cuadro 1**



## Desinfestación y siembra de semillas

Se realizaron un total de 270 sobres de papel filtro (2x2 cm), y en cada sobre se colocaron aproximadamente 200 semillas de *Barkeria uniflora* asegurando los sobres con un clip metálico. Las semillas en los sobres se desinfectaron en una solución de etanol al 70 % durante 5 minutos, para después transferirlas a una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % de cloro disponible adicionado con una gota de jabón líquido durante 10 minutos y por último se enjuagaron con agua destilada estéril.

El proceso de siembra se llevó a cabo en la sala de cultivo la cual previamente se desinfectó, al igual que todas las superficies de contacto utilizando etanol al 70 %, incluyendo la campana de flujo laminar y todo el material utilizado para la siembra.

Cada sobre con semillas se abrió y se colocó dentro del frasco, para dejar expuestas las semillas y en contacto con los medios de cultivo.

Los 270 frascos con las semillas se colocaron en la sala de incubación a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con una intensidad luminosa de 4670 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad.

## Evaluación de la Germinación

Para evaluar la germinación y el desarrollo de los diferentes estadios, en cada uno de los tratamientos, se consideró la descripción A de estadios descritos y propuestos por Batigny y colaboradores (2003), Espinosa (2004) y Shimura y Koda (2004).

ESTADIO o VALOR	INDICE DE DESARROLLO	DESCRIPCION A
1	100	Semilla sin germinar 
2	200	Semilla hinchada y verde 
3	300	Protocormo 
4	400	Protocormo con primordio foliar 
5	500	Protocormo con una hoja 
6	600	Protocormo con dos hojas 
7	700	Protocormo con tres hojas 
8	800	Plántula con raíces 

El criterio para establecer que se inició la germinación fue a partir del estadio 2 ó semilla hinchada y verde. Durante 98 días se registró semanalmente el porcentaje de estadios para cada replica, la suma de los porcentajes de cada réplica dió el total o 100 % de los individuos evaluados.

## Evaluación del Índice de Desarrollo

Los cambios ontogénicos del embrión de las semillas de *B. uniflora*, durante el proceso de la germinación, fueron registrados en cada una de las repeticiones por tratamiento cada siete días durante 98 días para establecer la ontogenia del embrión durante su germinación; así como, para calcular el índice de desarrollo o I.D. considerando ocho estadios ontogénicos.

El índice de desarrollo es un indicador que refleja el estadio ontogénico de los embriones durante el proceso de germinación de las semillas y se calcula con la sumatoria de los porcentajes obtenidos a partir del número de individuos registrados en cada estadio ontogénico ( $e_x$ ) entre el total de individuos en la muestra ( $e$ ) y multiplicado por el valor del estadio ontogénico ( $x$ ), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I D = \sum_{x=1}^{x=8} (e_x / e) (x) (100)$$

Dónde:

$x$  = Valor del estadio ontogénico

$e_x$  = Número de individuos registrados en ese estadio ontogénico

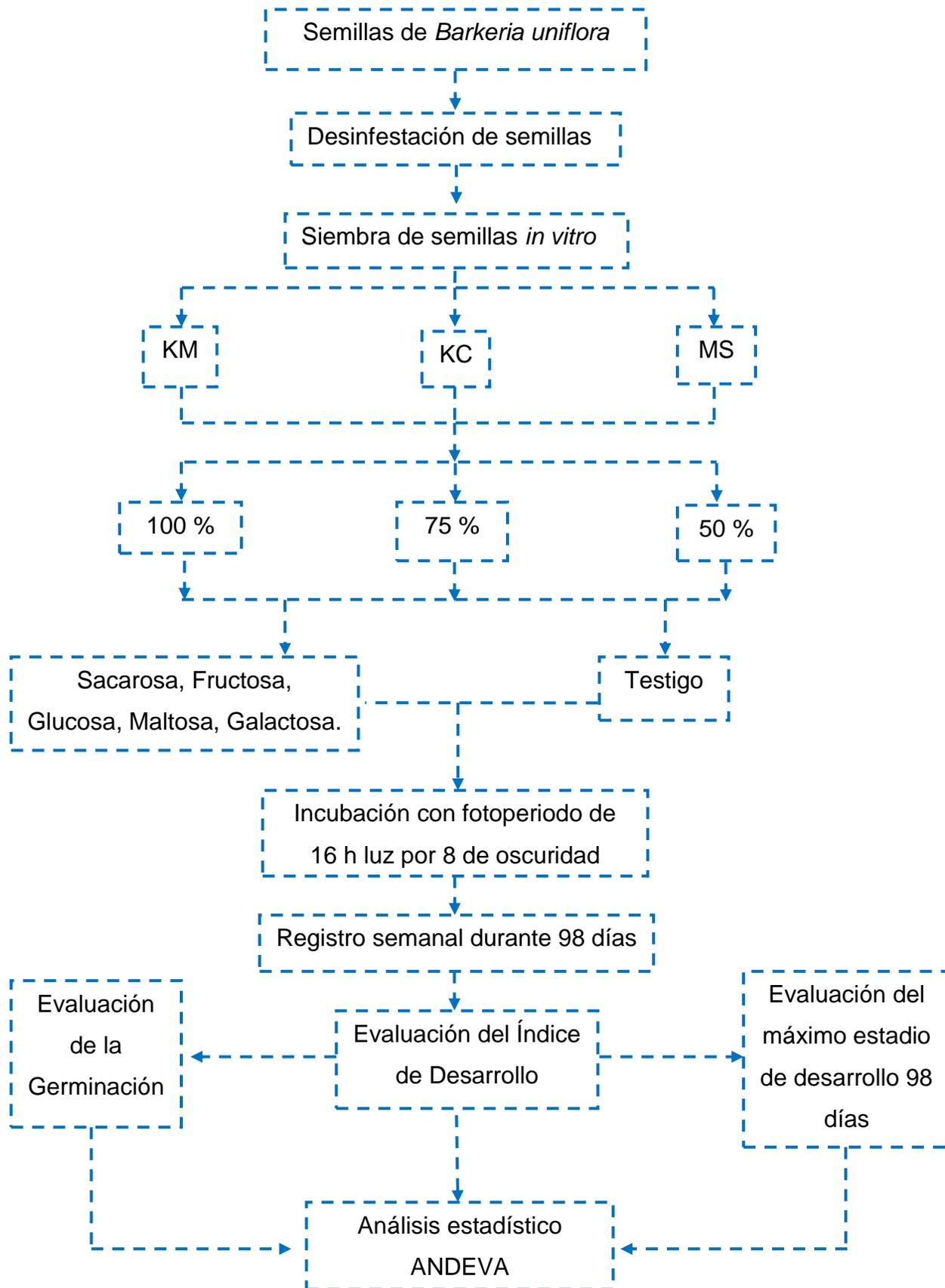
$e$  = Total de individuos de la muestra

### **Evaluación del estadio 8 a los 98 días de cultivo**

Se determinó el porcentaje de plántula con raíces (estadio 8) a los 98 días de iniciada la siembra en cada uno de las repeticiones por cada uno de los tratamientos de exposición.

### **Diseño estadístico**

A los datos obtenidos del porcentaje de germinación, del índice de desarrollo durante la germinación de semillas, del estadio de desarrollo más avanzado presentes a los 98 días se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa estadístico computarizado Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.15, para conocer si existieron diferencias significativas entre los tratamientos empleados durante el tiempo de cultivo (Cuadro 2).



Cuadro 2. Metodología General

## RESULTADOS

### Viabilidad

La evaluación de la viabilidad permitió estimar de manera rápida la condición biológica de la semilla, la prueba con TTC se basa en la reacción de ciertas enzimas de las células vivas con la sal de este reactivo, donde se da la reducción del tetrazolio formándose un compuesto rojo llamado formazán (Moreno, 1984).

El máximo porcentaje de viabilidad registrado para las semillas de *Barkeria uniflora* fue de 80 % de embriones teñidos, donde el rango de coloración varió del rojo, anaranjado y rosa. (Fig. 7).



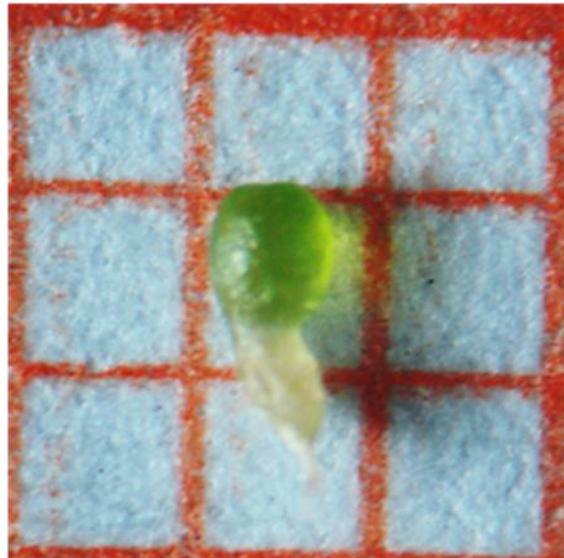
**Figura 7.** Embriones teñidos de *Barkeria uniflora*, evaluación de la viabilidad con TTC.

## Germinación de semillas de *Barkeria uniflora*

El ANDEVA del porcentaje de germinación obtenido por el efecto de los carbohidratos experimentales sobre la germinación *in vitro* de las semillas de *Barkeria uniflora*, a través del tiempo, independientemente del medio nutritivo y su concentración, demostró que existieron diferencias significativas (valor- $P < 0.0000$ ). (Anexo 2)

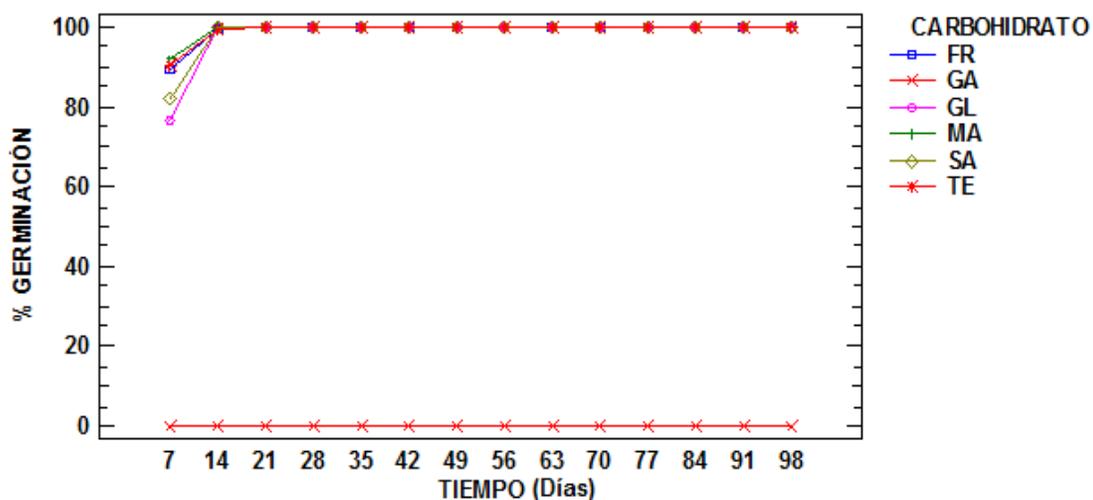
Al comparar las medias de los porcentajes de germinación obtenidos de las semillas en cada uno de los azúcares experimentales, independientemente del tiempo de cultivo, se comprobó que la galactosa fue diferente estadísticamente al resto de los tratamientos con carbohidratos y con 0 % de germinación (Anexo 2.1)

La germinación de las semillas de *B. uniflora*, considerada como el momento en que los embriones estaban hinchados con coloración verde y rompiendo la testa (estadio 2) (Fig. 8), comenzó a los 7 días posteriores del cultivo con porcentajes que iban desde el 76 % hasta el 90 %, excepto aquellas sobre galactosa.



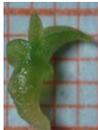
**Figura 8.** Embrión verde hinchado rompiendo la testa de *Barkeria uniflora*

A partir de los 14 días y hasta el final del cultivo se registró el mayor porcentaje de germinación, con un valor de 99 %, en aquellas semillas cultivadas en el medio de cultivo sin carbohidrato (Testigo) y con carbohidratos excepto con galactosa donde siempre fue 0 % (Fig. 9).



**Figura 9.** Germinación asimbiótica *in vitro* de *Barkeria uniflora* en los carbohidratos experimentales (Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE)), independientemente del medio nutritivo y concentración de sales.

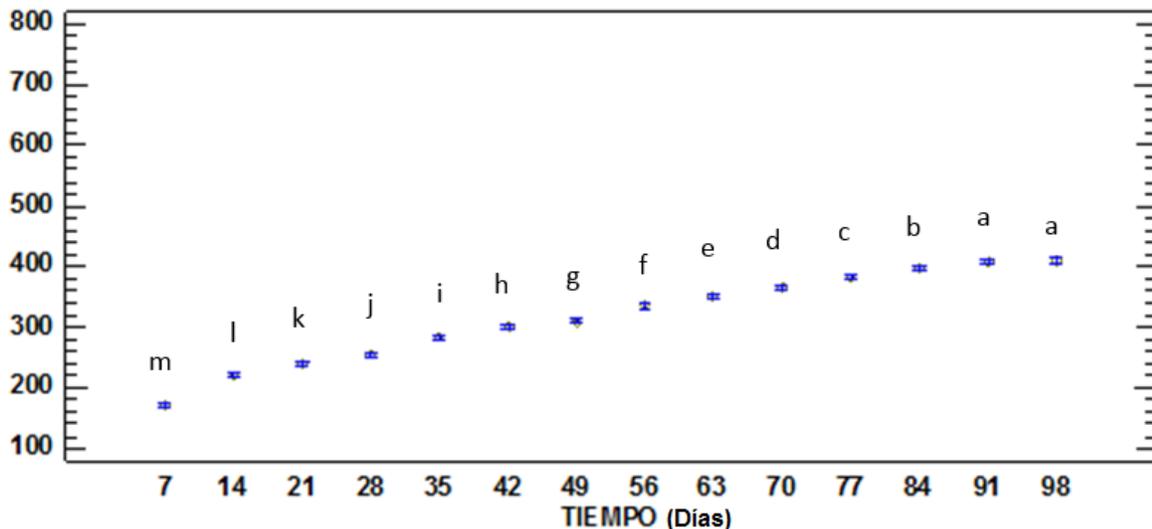
**Cuadro 3.** Estadios ontogénicos registrados durante el desarrollo de la germinación *in vitro* de semillas de *Barkeria uniflora*.

Valor del Estadio	Índice de Desarrollo	Estadio	Estadio
1	100	Semilla sin germinar	
2	200	Embrión hinchado y verde	
3	300	Protocormo	
4	400	Protocormo con primordio foliar	
5	500	Protocormo con una hoja	
6	600	Protocormo con dos hojas	
7	700	Protocormo con tres hojas	
8	800	Planta con raíces	

## Índice de Desarrollo

El ANDEVA del índice de desarrollo obtenido, durante la germinación de las semillas de *Barkeria uniflora* por el efecto del tiempo de cultivo, de los medios nutritivos, concentraciones de sales inorgánicas y los carbohidratos experimentales, mostró que existieron diferencias significativas (Valor- $P < 0.0000$ ) con un 95 % de confianza (Anexo 3).

Al comparar las medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los tiempos de cultivo, independientemente del medio nutritivo, de la concentración de sales y de los carbohidratos (Anexo 3.1), se comprobó que fueron estadísticamente diferentes entre sí, excepto los índices obtenidos a los 91 y 98 días de cultivo donde los valores fueron iguales estadísticamente entre sí, como lo muestra la figura 10.



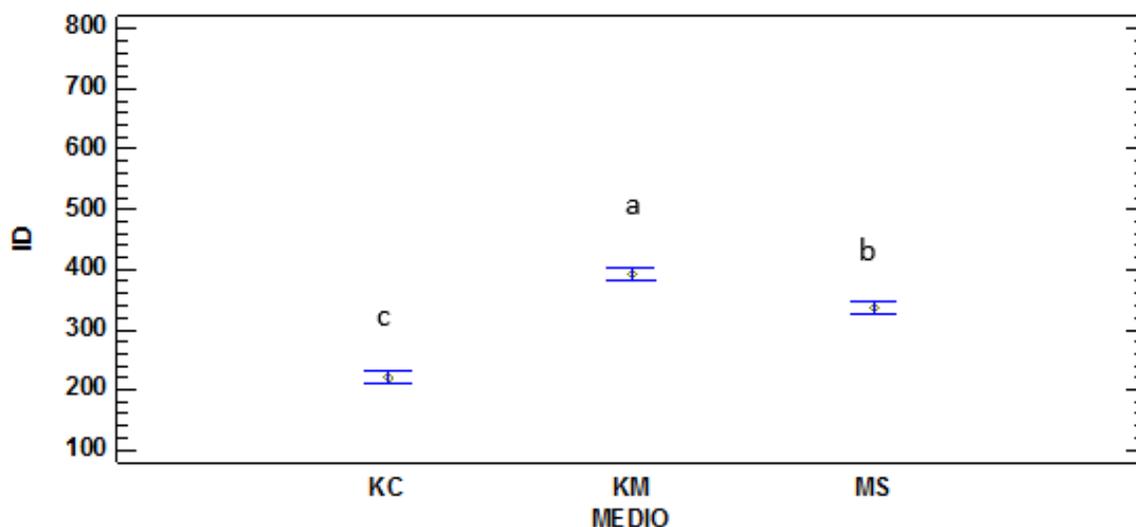
**Figura 10.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación *in vitro* a través del tiempo de cultivo.

Se observó que a los 7 días de cultivo el valor promedio del índice de desarrollo fue de 171 lo que indica que un 71 % de las semillas ya habían germinado (estadio 2) y solo un 29 % permanecían sin germinar (estadio 1). A los 14 días de cultivo el valor del índice de desarrollo fue de 220, este valor reflejó que el 80 % de los embriones se hincharon (estadio 2) y un 20 % de embriones ya se habían diferenciado en protocormos (estadio 3).

El resto de los embriones hinchados continuó su desarrollo y fue hasta los 42 días de cultivo cuando se obtuvo un valor promedio de 301 lo que evidenció que el 99 % de los embriones hinchados se habían desarrollado en protocormos o estadio 3. Finalmente, 98 días después de la siembra, el 90 % de estos protocormos desarrollaron un primordio foliar alcanzando el estadio 4 con un valor promedio del índice de desarrollo de 410; mientras que, el 10 % restante de los protocormos desarrolló una hoja (estadio 5).

Al comparar las medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los medios nutritivos, independientemente del tiempo de cultivo, de la concentración de sales y de los carbohidratos, se observó que fueron diferentes estadísticamente entre sí (Anexo 3.2) (Fig. 11).

El medio de cultivo donde se alcanzó un mayor índice de desarrollo de las semillas fue en el medio KM con un valor de 393 donde el 93 % de los protocormos desarrollaron un primordio foliar (estadio 4), seguido por el medio MS con un índice de 336 donde solo el 36 % de los protocormos desarrollaron el primordio foliar y por último en el medio KC solo el 20 % de los embriones hinchados se desarrollaron en protocormos con un índice de 220.

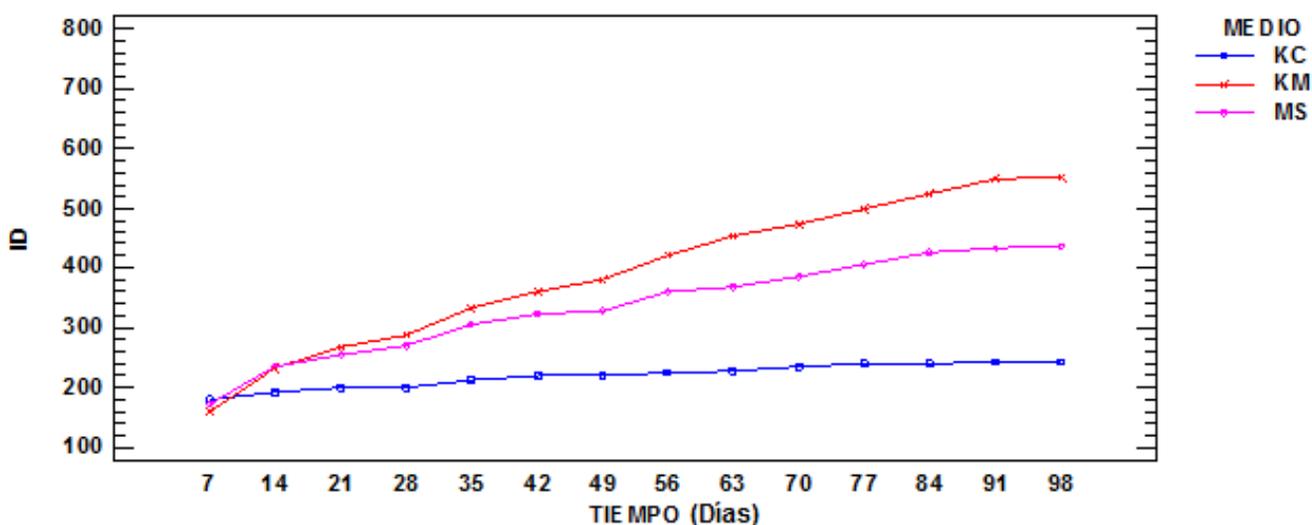


**Figura 11.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación *in vitro* en los medios nutritivos.

Al graficar las medias de los índices de desarrollo para cada uno de los medios nutritivos a través del tiempo, independientemente de la concentración de las sales y de los carbohidratos empleados, se comprobó que la respuesta del desarrollo de los embriones, durante la germinación de las semillas de *Barkeria uniflora* fue diferente para cada medio durante el cultivo, como se muestra en la Fig. 12.

De acuerdo a la figura 12, en el medio nutritivo Knudson C (KC) al final del tiempo de cultivo, 98 días, se alcanzó el valor promedio del índice de desarrollo de 242, esto indicó que el 58 % de los embriones de *Barkeria uniflora* permanecieron hinchados (estadio 2) y el 42 % alcanzó el estadio de protocormo (estadio 3).

En el medio nutritivo Murashige & Skoog (MS) el índice de desarrollo a los 14 días fue de 234, donde el 66 % de los embriones se hincharon (estadio 2) y el 34 % se diferenciaron en protocormo (estadio 3), este porcentaje del estadio 3 aumentó a los 35 días al registrar un índice de desarrollo de 305.

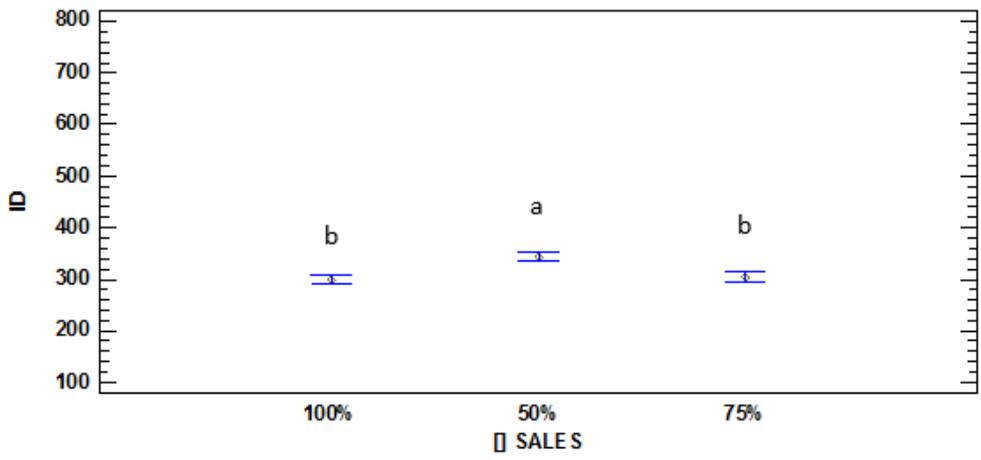


**Figura 12.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación *in vitro* en tres medios nutritivos a través del tiempo de cultivo.

Para los 77 días de cultivo estos protocormos en el medio MS ya habían generado un primordio foliar, alcanzando el estadio 4 con un índice de desarrollo de 406. A los 98 días de cultivo el valor del índice de desarrollo fue de 436, donde el 64 % de los protocormos presentaron primordio foliar, pero un 36 % ya habían desarrollado la primera hoja (estadio 5).

Como se puede observar en la figura 12, el medio nutritivo Kao y Michayluk (KM) fue el que promovió el mayor desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación, ya que para los 56 días de cultivo el 80 % de los protocormos ya presentaban un primordio foliar, con un valor del índice de desarrollo de 420 y un 20 % de los protocormos pudieron alcanzar el estadio de protocormo con una hoja, finalmente a los 98 días de cultivo el 58 % de los protocormos desarrollaron una hoja (estadio 5), con un valor del índice de desarrollo de 552, mientras que el 42 % siguió su desarrollo alcanzando el estadio de protocormo con dos hojas (estadio 6).

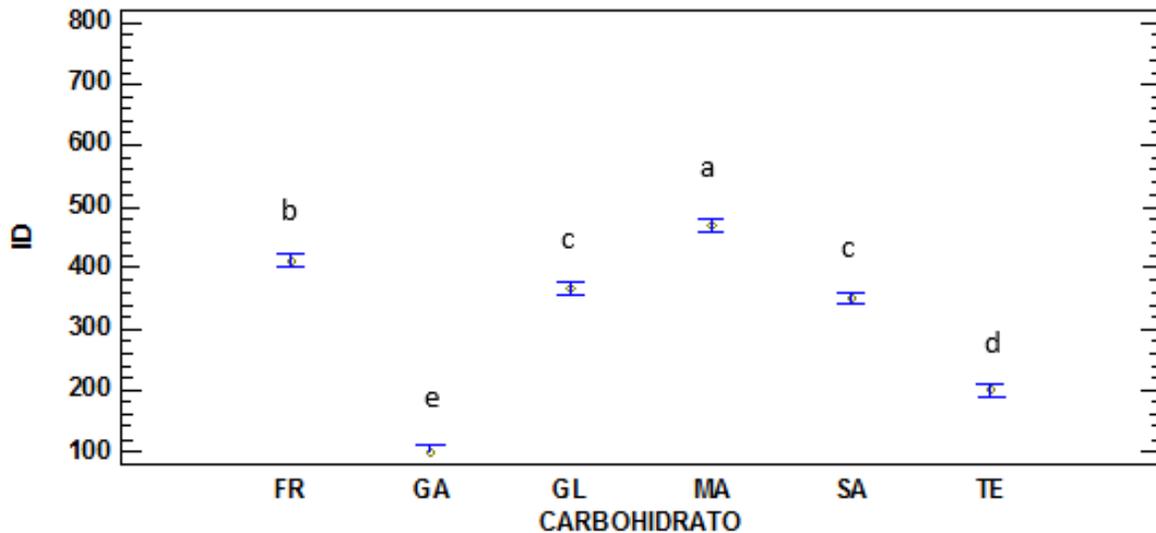
La comparación de medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada una de las diferentes concentraciones de sales nutritivas, independientemente del tiempo de cultivo, del medio nutritivo y los carbohidratos (Anexo 3.3) demuestra que al cultivar las semillas con un 50 % de la concentración de las sales el valor del índice de desarrollo de 345 fue mayor y diferente estadísticamente a los valores de las dos concentraciones restantes entre los cuales no existieron diferencias significativas (Fig. 13).



**Figura 13.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación *in vitro* en las diferentes concentraciones de sales.

En la figura 13 se aprecia que en la concentración de sales al 50 % el valor del índice de desarrollo corresponde a 345 lo que indica que el 55 % de las semillas permanecen como protocormos y el 45 % de estos han desarrollado primordio foliar; en las concentraciones 100 % y 75 %, los valores del índice de desarrollo fueron 300 y 305 respectivamente, lo que indica el desarrollo de protocormos (estadio 3) principalmente.

La comparación de medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los carbohidratos experimentales, independientemente del tiempo de cultivo, del medio nutritivo y de las concentraciones (Anexo 3.4) indica que el mayor valor del índice de desarrollo, y diferente estadísticamente, se obtuvo al utilizar la maltosa como carbohidrato experimental; mientras que con la galactosa se obtuvo el menor índice de desarrollo (Fig. 14).



**Figura 14.** Desarrollo durante la germinación *in vitro* de semillas de *Barkeria uniflora* en los carbohidratos experimentales (Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE)).

En la figura 14 se puede observar que la galactosa fue el carbohidrato experimental que inhibió el desarrollo de los embriones durante la germinación de *Barkeria uniflora*, ya que el valor del índice de desarrollo de las semillas obtenido fue de 100 e indica que el 100 % de las semillas permanecieron sin germinar o estadio 1.

Al término de los 98 días de cultivo se evaluó la viabilidad de las semillas expuestas a la Galactosa. El porcentaje de viabilidad registrado fue de 0 %, ya que los embriones observados carecían de tinción.

Se pudo observar que en el Testigo, con ausencia de carbohidratos, se obtuvo un índice de 200 donde el 100 % de los embriones se hincharon alcanzando el segundo estadio de desarrollo.

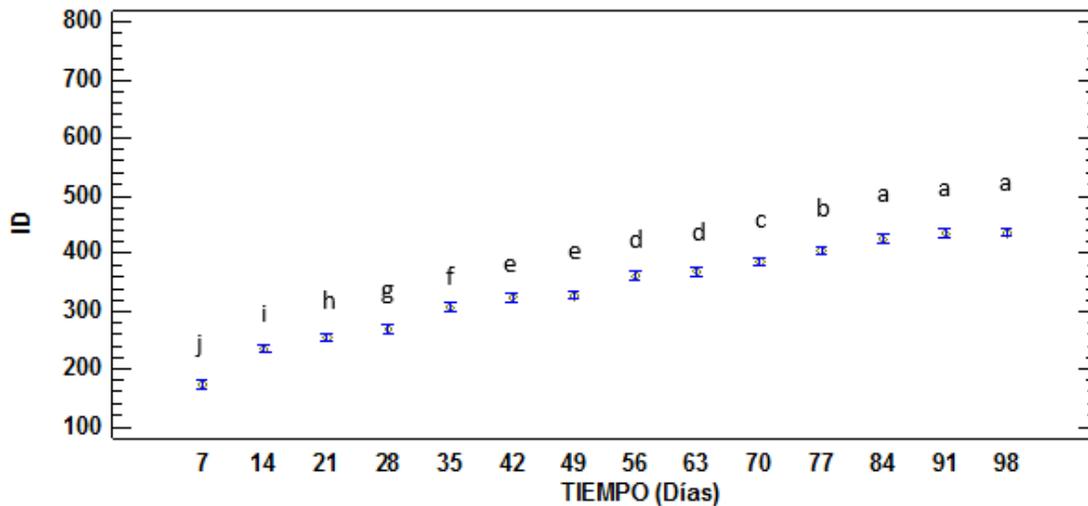
El desarrollo obtenido sobre la sacarosa y la glucosa fue igual estadísticamente, con valores de 351 y 367 respectivamente, lo que indicó que el 51 % y el 67 % de los protocormos, cultivados en sacarosa y glucosa respectivamente, presentaban ápice foliar (estadio 4).

La fructosa fue el segundo carbohidrato donde se generó una mayor respuesta morfogénica con un valor del índice de desarrollo de 411, lo que indica que el 11 % de los protocormos generaron una hoja. La Maltosa fue el carbohidrato donde se generó la mayor respuesta morfogénica, ya que el valor promedio del índice de desarrollo fue de 470, donde el 70 % de los protocormos desarrollaron una hoja y el 30 % permanecieron en estadio de protocormo con primordio foliar.

### **Índice de Desarrollo en el Medio Murashige & Skoog**

Al efectuar el ANDEVA para el índice de desarrollo obtenido, durante la germinación *in vitro* de las semillas de *Barkeria uniflora*, por efecto del medio Murashige & Skoog (MS), mostró que existieron diferencias significativas (Valor- $P < 0.0000$ ) en el tiempo de cultivo, en la concentración de sales y los carbohidratos experimentales, así como entre sus interacciones con un 95% de nivel de confianza (Anexo 3.5).

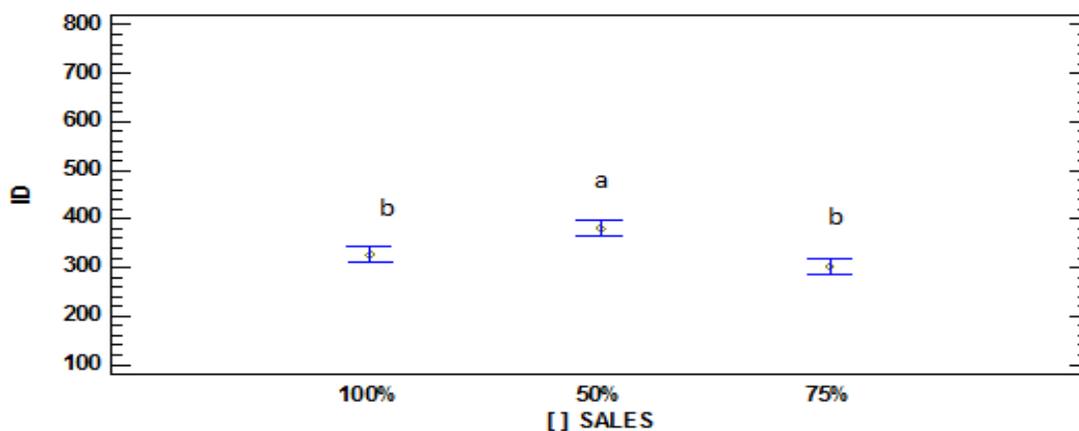
Al realizar la comparación de las medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los tiempos de cultivo con el medio MS, independientemente de la concentración de sales y de los carbohidratos (Anexo 3.6), se comprobó que fueron estadísticamente diferentes entre sí, excepto los índices obtenidos a los 42 y 49 días de cultivo que resultaron estadísticamente iguales entre sí; así mismo, los registrados a los 56 y 63 días, como a los de 84, 91 y 98 días de cultivo, como lo muestra la figura 15.



**Figura 15.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación *in vitro* en el medio Murashige & Skoog a través del tiempo de cultivo.

En la figura 15 se aprecia que el mayor índice de desarrollo se obtuvo a los 98 días de cultivo con un valor de 436, donde el 36 % de los protocormos desarrollaron una hoja (estadio 5) y el 64 % permanecieron con primordio foliar (estadio 4); sin embargo, este valor fue igual estadísticamente a los obtenidos a los 84 y 91 días de cultivo con 426 y 435 respectivamente, lo cual demuestra que a los 84 días de cultivo el 26 % de los protocormos generaron una hoja y a los 91 días el 35 %. Estos valores del índice de desarrollo obtenidos en los tres últimos días de cultivo fueron diferentes estadísticamente al resto de los valores obtenidos.

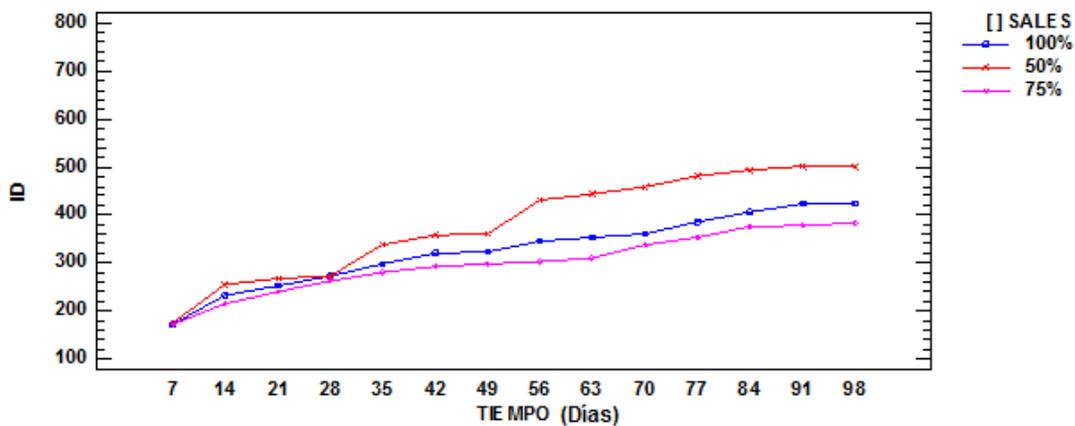
Al realizar la comparación de medias para el índice de desarrollo obtenidas en cada una de las concentraciones de sales (100 %, 75 % y 50 %) del medio nutritivo MS, independientemente del tiempo de cultivo y de los carbohidratos, se observó, que con la concentración de 50 % el valor del índice de desarrollo obtenido, 382, fue mayor y diferente a los valores de las dos concentraciones restantes los cuales resultaron iguales estadísticamente (Anexo 3.7) (Fig. 16).



**Figura 16.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante la germinación *in vitro* por el efecto de la concentración de sales del medio nutritivo Murashige & Skoog.

En la figura 16 se muestra que con 50 % de la concentración de las sales del medio MS el 82 % de los protocormos presentan primordio foliar, con el 100 % y 75 % de la concentración solo el 27 % y el 1% respectivamente generan primordio foliar.

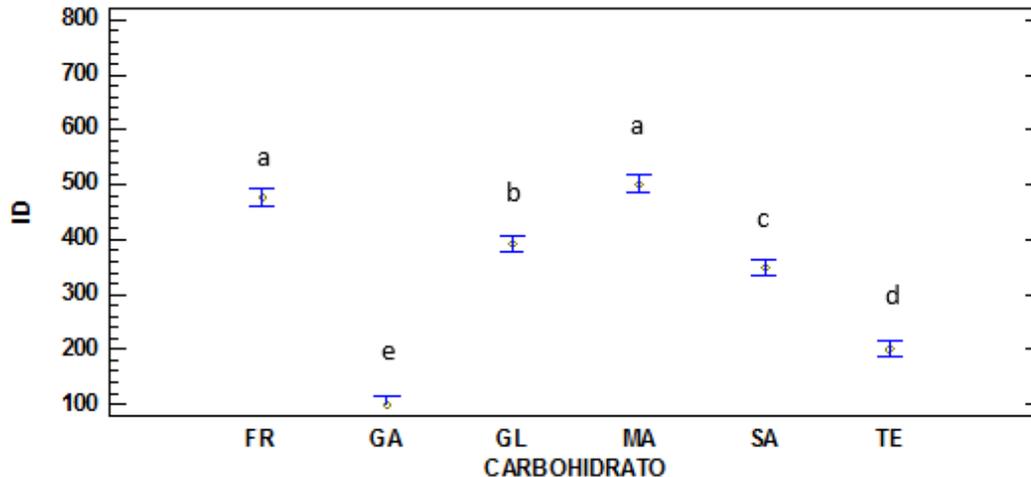
El efecto de la concentración de sales del medio nutritivo MS se aprecia en la figura 17, se observa que a los 7 días de cultivo entre el 72 % y 75 % de las semillas de *Barkeria uniflora*, en las tres concentraciones de sales, presentaron embriones verdes e hinchados (estadio 2). El valor del índice de desarrollo se incrementó a los 14 días de cultivo, lo cual reflejó que el 15 % de los embriones verdes e hinchados en la concentración al 75 % de las sales se habían desarrollado en protocormos (estadio 3); mientras que, con 100 % y 50% se desarrollaron 33 % y 54 % respectivamente.



**Figura 17.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación *in vitro* en diferentes concentraciones de sales del medio nutritivo Murashige & Skoog a través del tiempo de cultivo.

A los 35 días de cultivo solamente las semillas cultivadas en el medio MS al 50 % de la concentración de sales presentaron un 37 % de protocormos con primordio foliar (estadio 4), el valor del índice de desarrollo obtenido fue 337. A los 56 días de cultivo, el valor del índice de desarrollo, para la concentración de 50 % de sales MS se incrementó, obteniendo un valor de 432, el cual indicó que el 32 % de los protocormos presentaban una hoja (estadio 5) y el 68 % permanecía con primordio foliar (estadio 4), en las concentraciones de 100 % y 75 % el valor del índice fue de 352 y 304 respectivamente, lo cual refleja que con 100% de sales, en este tiempo, el 52 % de protocormos presentaban primordio foliar; mientras que con 75 % solo el 4 %. Al final del cultivo (98 días), en la concentración de 50 % el valor del índice fue de 502, el cual refleja que el 2 % de los protocormos desarrollaron dos hojas y el 98 % permaneció con una hoja. Como se puede observar la concentración de 50 % de sales del medio MS, se obtiene una mayor respuesta morfogénica seguida por el MS al 100 % con un índice de desarrollo de 423 y en la concentración de 75 % se mantuvo la menor respuesta morfogénica llegando a un valor de 383.

Al realizar las comparaciones múltiples de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los carbohidratos utilizados, independientemente del tiempo de cultivo y de la concentración de sales del medio MS se observa que los valores de todos los índices fueron diferentes estadísticamente. (Anexo 3.8) (Fig. 18).



**Figura 18.** Desarrollo durante la germinación *in vitro* de semillas de *Barkeria uniflora* en medio MS expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

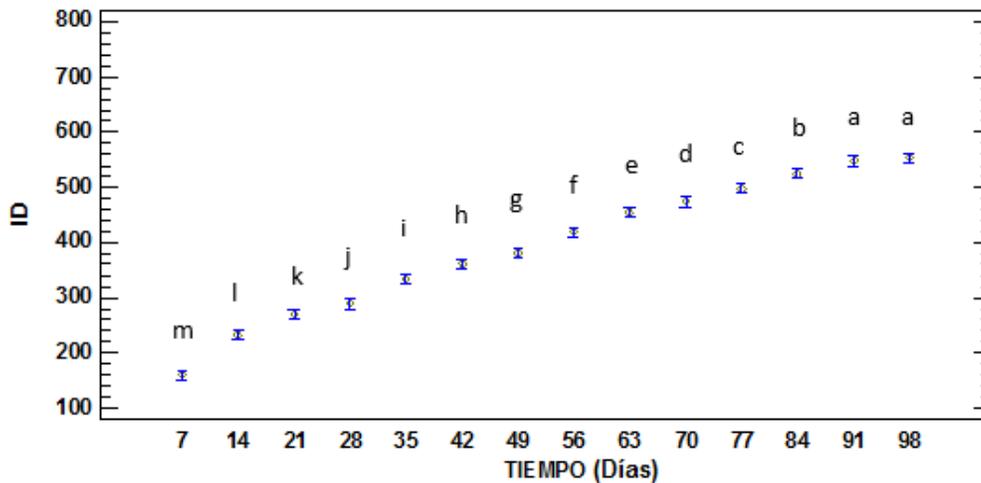
La Galactosa no induce el desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* puesto que el valor del índice fue de 100, resultando menor y diferente estadísticamente al resto. En el Testigo los embriones se hinchan logrando el segundo estadio de desarrollo.

La Sacarosa estimula el desarrollo de 52 % de protocormos (estadio 3) y un 48 % de protocormos con primordio foliar obteniendo un índice de desarrollo de 348. La Glucosa también tiene el mismo efecto estimulante en las semillas obteniendo un índice de desarrollo de 393, 7 % de protocormos (estadio 3) y 93 % de protocormos con primordio foliar (estadio 4). Se puede observar que la maltosa y fructosa tienen el mismo efecto estimulante para las semillas, considerando a estos dos carbohidratos grupos homogéneos y estadísticamente similares, ya que los protocormo de *Barkeria uniflora* desarrollan una hoja (estadio 5).

## Índice de Desarrollo en el Medio Kao y Michayluk

Al realizar el ANDEVA para el índice de desarrollo obtenido durante la germinación *in vitro* de las semillas de *Barkeria uniflora* por efecto del medio Kao y Michayluk (KM), se observó que existieron diferencias significativas (Valor-P<0.0000) en el tiempo de cultivo, en la concentración de las sales y en los carbohidratos empleados. (Anexo 3.9)

Al realizar la comparación de las medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los tiempos de cultivo con el medio KM, independientemente de la concentración de sales y de los carbohidratos, se comprobó que fueron estadísticamente diferentes entre sí (Fig. 19) (Anexo 3.10).



**Figura 19.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante la germinación *in vitro* en el medio KM.

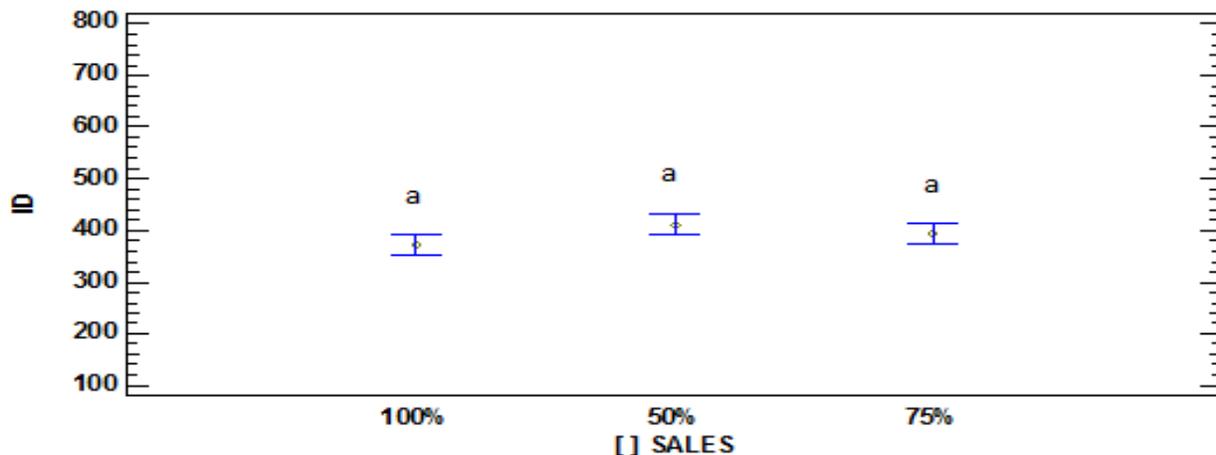
Se aprecia en la figura 19 el índice de desarrollo promedio obtenido en las semillas de *Barkeria uniflora* sembradas en el medio de cultivo KM, a los 7 días del cultivo el valor del índice de desarrollo fue de 159 esto indicó que el 59 % de las semillas ya habían comenzado el proceso de germinación encontrándose en el estadio 2.

Para los 14 días del cultivo 67 % de los embriones permanecieron hinchados y verdes, (estadio 2); mientras que, el 33 % de los embriones se desarrollaron en protocormos (estadio 3), el valor del índice de desarrollo fue de 233.

A partir de los 35 días el índice de desarrollo fue de 333, el 67 % permaneció como protocormos (estadio 3) y un 33 % de protocormos que generaron su primordio foliar (estadio 4). A los 56 días de cultivo el 80 % de los protocormos tenían un primordio foliar (estadio 4), mientras que el 20 % generaron la primera hoja (estadio 5), el valor del índice de desarrollo fue de 420

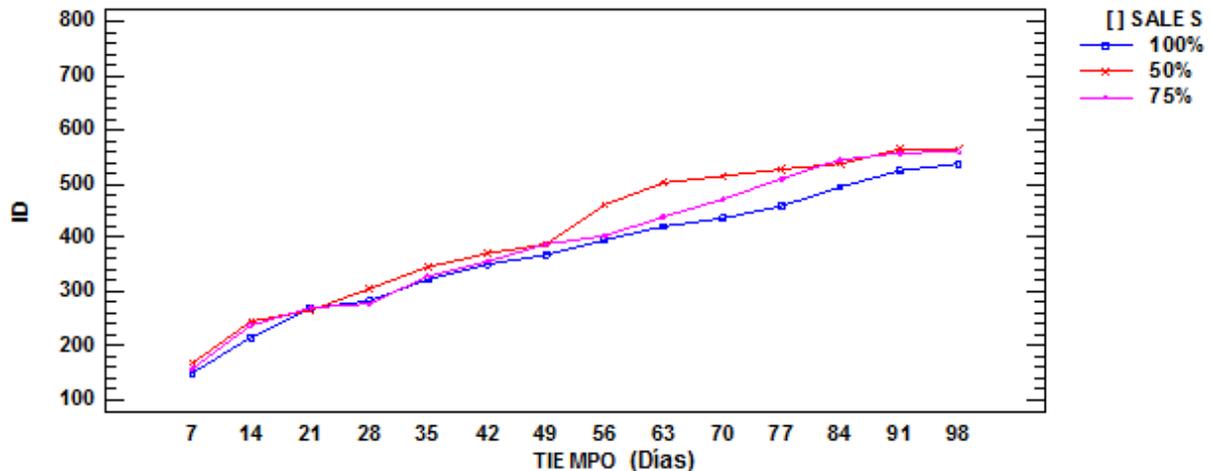
El índice de desarrollo se incrementó para los 84 días de cultivo, llegando a un valor de 525, donde se observó el desarrollo de la primera hoja en los protocormos (75 % de ellos), para estos días de cultivo el 25 % de los protocormo habían desarrollado la segunda hoja. Para los 98 días solo incrementó el valor del índice de desarrollo hasta llegar a 552. Obteniendo un 52 % de protocormos con dos hojas.

Al realizar la comparación de medias para el índice de desarrollo obtenido en las semillas sembradas en el medio KM en concentraciones de 100 %, 75 % y 50 %, se pudo observar que no existieron diferencias significativas entre las concentraciones de las sales inorgánicas (Fig. 20). (Anexo 3.11).



**Figura 20.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación en las diferentes concentraciones de sales del medio KM.

Como se puede observar en la figura 20, las tres concentraciones de sales del medio KM tienen el mismo efecto estimulante para el desarrollo morfogénico de las semillas de *B. uniflora* puesto que el valor del índice oscila 374 y 412, resultando estadísticamente iguales, con los cuales se induce el desarrollo de protocormos con ápice foliar principalmente y protocormos con una hoja.



**Figura 21.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación en las diferentes concentraciones de sales del medio KM, a través del tiempo.

En la figura 21 se aprecia a los 7 días de cultivo que las semillas comienzan con el proceso de germinación ya que para las tres concentraciones se observó más del 50 % de los protocormos hinchados. A los 14 días, para las tres concentraciones ya se había establecido por completo el estadio 2; sin embargo, se observó el desarrollo del estadio 3 o protocormo en los siguientes porcentajes 100 % (16 %), 75 % (38%) y 50 % (45 %).

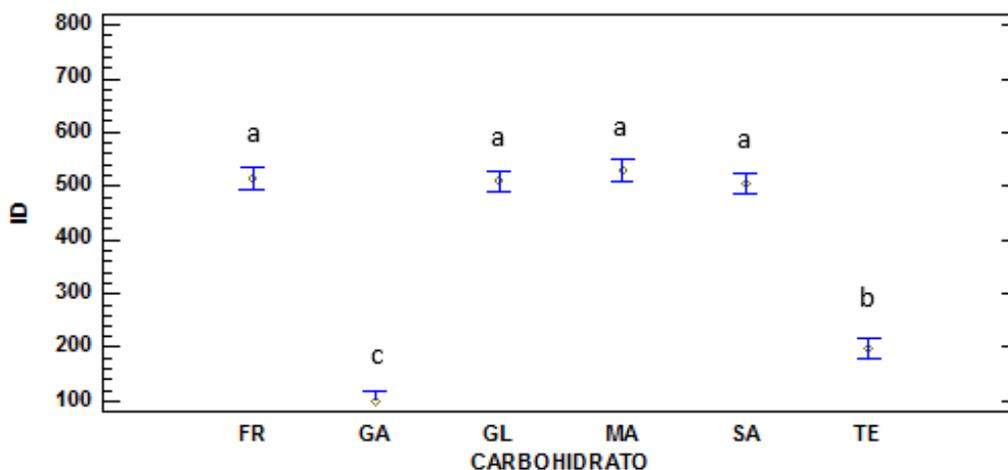
A los 28 días de cultivo en las sales diluidas a la mitad de su concentración, el estadio 3 se estableció por completo, para las concentraciones de 100 y 75 % siguió aumentando el número de protocormos pero sin llegar al 100 %.

Para los 56 días de cultivo el porcentaje de protocormos con primordio foliar para el KM al 50 % fue de 39 %, el 61 % se encontraba en el estadio 5, para el 75 % el valor del índice era de 403 (estadio 4). Para el KM al 100 % se observó un 95 % de protocormos con un primordio foliar.

El valor del índice de desarrollo se incrementó para los 63 días, en el KM al 50% se alcanzó el estadio 5 o protocormos con una hoja, el valor del índice de desarrollo fue de 502. Mientras que en el KM al 75 % el 61 % de los protocormos estaban en el estadio 4 y el 39 % ya habían alcanzado el estadio 5. Para el KM al 100 % solo el 20 % de los protocormos habían desarrollado una hoja.

A los 98 días de cultivo el estadio 5 se estableció por completo pero se pudo observar el desarrollo de la segunda hoja en los protocormos y este porcentaje vario para cada concentración. En el caso del KM al 100 % se generó un 35 %, para el 75 % un 57 % y para el KM al 50 % un 64 %, siendo esta concentración la que generó el mayor porcentaje de protocormos con dos hojas.

La comparación de medias para el índice de desarrollo obtenido con respecto a los carbohidratos utilizados independientemente de la concentración de sales del medio KM y del tiempo, refleja que el valor del índice para la sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa es mayor y diferente al resto (Fig. 22) (Anexo 3.12).



**Figura 22.** Desarrollo durante la germinación *in vitro* de semillas de *Barkeria uniflora* en medio KM expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

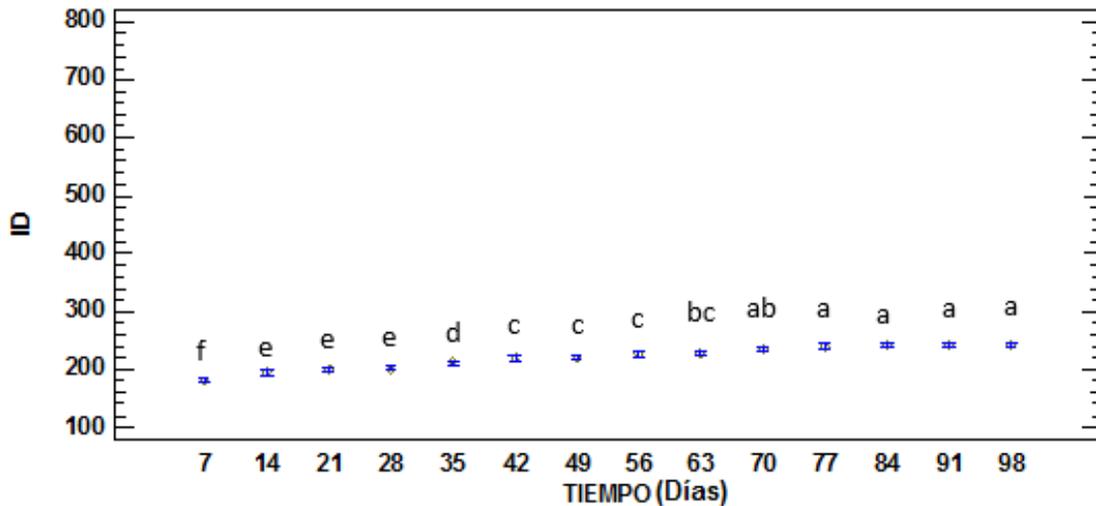
Como se observa en la figura 22 no hubo diferencias significativas entre cuatro azúcares (maltosa, fructosa, glucosa y sacarosa), ya que las cuatro tuvieron el mismo efecto estimulador para el desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora*, los estadios alcanzados por las semillas para los cuatro carbohidratos fue el de protocormo con una hoja (estadio 5) y protocormo con dos hojas (estadio 6).

Sin embargo, para el Testigo se observa que los embriones únicamente se hinchan y toman una coloración verde, (estadio 2). La galactosa no induce el desarrollo morfológico de las semillas de *Barkeria uniflora* ya que posteriormente de los 98 días de cultivo las semillas permanecen en el estadio 1.

### **Índice de Desarrollo en el Medio Knudson C**

Al realizar el ANDEVA para el índice de desarrollo en la germinación de las semillas de *Barkeria uniflora* sembradas en el medio de cultivo Knudson C, se observó que existieron diferencias significativas (Valor- $P < 0.0000$ ) entre el tiempo de cultivo, la concentración de las sales y los carbohidratos empleados. (Anexo 3.13).

Al realizar la comparación de las medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los tiempos de cultivo, independientemente de la concentración de sales y de los carbohidratos (Anexo 3.14), se comprobó que fueron estadísticamente diferentes entre sí (Fig. 23)

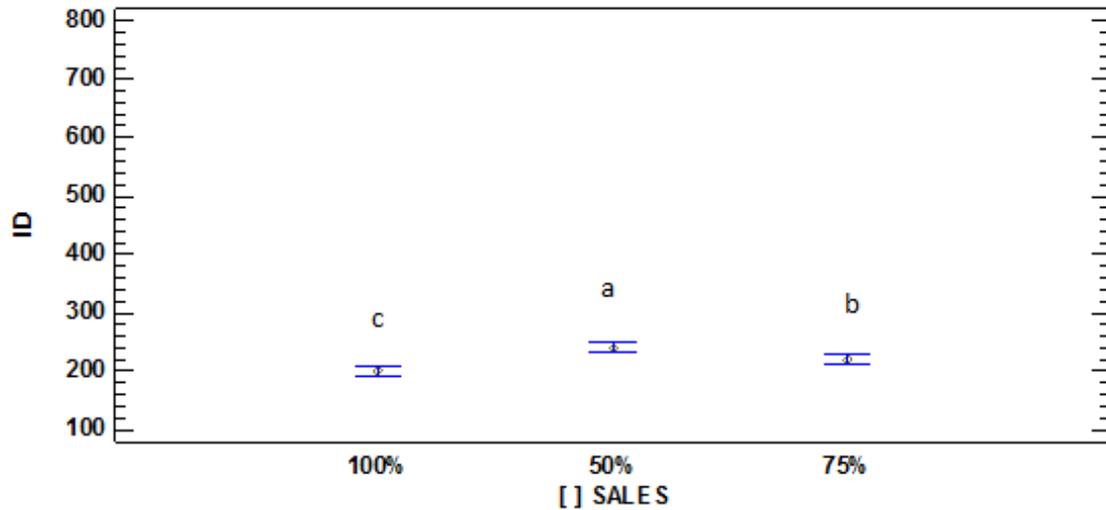


**Figura 23.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación en medio KC a través del tiempo de cultivo.

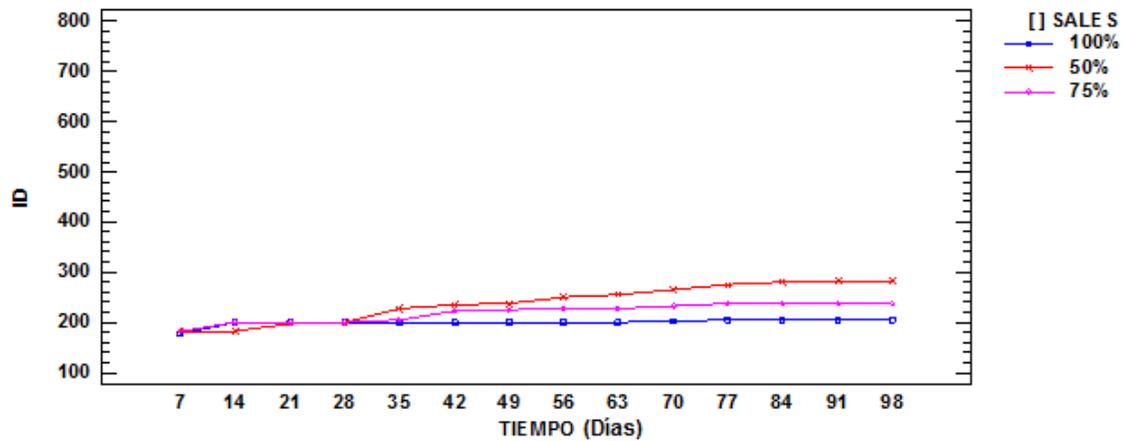
Se aprecia en la figura 23 el índice de desarrollo promedio obtenido en las semillas de *Barkeria uniflora* sembradas en el medio de cultivo KC, a los 7 días del cultivo el valor del índice de desarrollo fue de 181 el 81 % de las semillas comenzaron el proceso de germinación al hincharse y tornarse de color verde, estadio 2. Para los 28 días, se alcanzó el 100 % de embriones hinchados y verdes. El valor del índice de desarrollo fue de 201.

Los embriones siguieron su desarrollo hasta los 98 días de cultivo, donde se observó el incremento del índice de desarrollo hasta alcanzar un valor de 242, para este tiempo el 58 % de los embriones aún se encontraban en el estadio 2 y el 42 % de los embriones desarrollaron protocormos.

Se observa en la figura 24 que al realizar la comparación de medias para el índice de desarrollo obtenido en las semillas sembradas en el medio KC en las concentraciones de 100 %, 75 % y 50 %, (Anexo 3.15). El medio nutritivo KC a la mitad de su concentración es el que genera mayor respuesta morfogénica en las semillas de *B. uniflora*, puesto que el valor del índice fue de 240, resultando mayor y estadísticamente diferente al resto de las concentraciones.



**Figura 24.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación en las diferentes concentraciones de sales del medio KC.



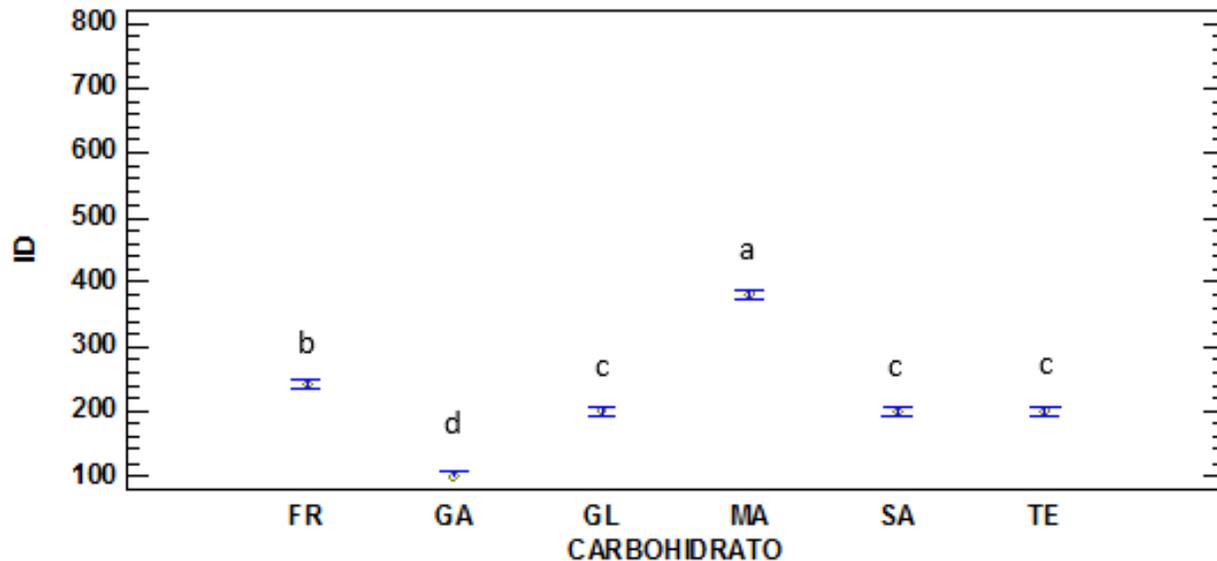
**Figura 25.** Desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* durante su germinación en las diferentes concentraciones de sales del medio KC, a través del tiempo.

El efecto de la concentración de sales del medio KC a través del tiempo, independientemente de los carbohidratos experimentales se aprecia en la figura 25, donde a los 7 días de cultivo las semillas ya habían comenzado el proceso de germinación ya que en las tres concentraciones se observó que más del 50 % de los embriones se hincharon y tomaron una coloración verde. (Fig. 25).

Para los 14 días de cultivo se alcanzó el 100 % de embriones hinchados y verdes, (estadio 2), en las concentraciones de 100 y 75% con un índice de desarrollo de 200 y 201 respectivamente. Mientras que en el medio KC al 50 %, el 82 % de los embriones habían alcanzado este estadio.

El valor del índice de desarrollo siguió aumentando y para los 28 días en las tres concentraciones se pudo observar el estadio 2. El estadio máximo alcanzado por las semillas después de los 98 días de cultivo fue en el medio KC a una concentración de 50% donde el 88 % de los embriones se desarrollaron en protocormo, seguido por el medio KC al 75 % de concentración de sales con un porcentaje de protocormos de 38 % y al 100 % con un 6 %.

La comparación de medias para el índice de desarrollo con respecto a los carbohidratos utilizados independientemente de la concentración del medio KC y del tiempo, muestra que se generaron diferencias, excepto en el valor del índice de las semillas sin exposición a un azúcar y para las expuestas a glucosa y sacarosa, cuyos valores son iguales entre sí. (Fig. 26) (Anexo 3.16).



**Figura 26.** Desarrollo durante la germinación *in vitro* de semillas de *Barkeria uniflora* en medio KC expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

La maltosa es el carbohidrato que genera mayor estímulo en el desarrollo de las semillas de *Barkeria uniflora* ya que al estar expuestas a este carbohidrato el 80 % alcanzó el estadio de protocormo con primordio foliar con un índice de desarrollo de 380. Seguido por la Fructosa con la cual se el 68 % de los protocormos formaron un primordio foliar.

La sacarosa, glucosa y el testigo tuvieron el mismo efecto estimulador para el desarrollo morfogénico, ya que en los tres los embriones se hincharon y se pusieron verdes, se obtuvo un índice de desarrollo de 200. Posteriormente de los 98 días de cultivo, las semillas que se encontraban expuestas a la galactosa no se desarrollaron, pues que estas permanecieron en el estadio 1.

## Respuesta Morfogénica en los diferentes Carbohidratos

### Medio MS al 100 %

La respuesta morfogénica de las semillas de *B. uniflora* durante el cultivo en los tratamientos con el medio nutritivo MS al 100 % de su concentración adicionado con cada uno de los carbohidratos experimentales se pudo observar (Fig. 27) que el mayor índice de desarrollo se obtuvo a partir de los 91 días en aquellas semillas expuestas a maltosa donde se desarrollaron un 46 % de plántulas competas (estadio 8). Seguido por la fructosa en la cual se generaron un 93 % de plántulas con tres hojas (estadio 7). Las semillas expuestas a glucosa y sacarosa llegaron al estadio 4 (protocormo con primordio foliar), las semillas expuestas al medio MS sin ningún azúcar se hincharon pero no siguieron su desarrollo, y las sembradas en galactosa después de los 98 días no tuvieron respuesta alguna (estadio 1).

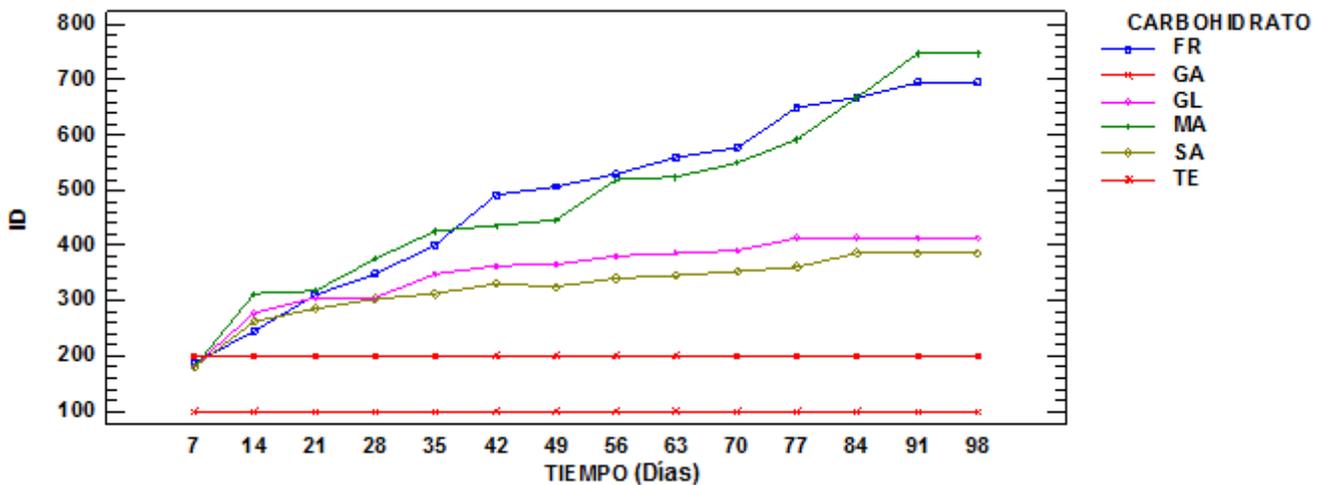


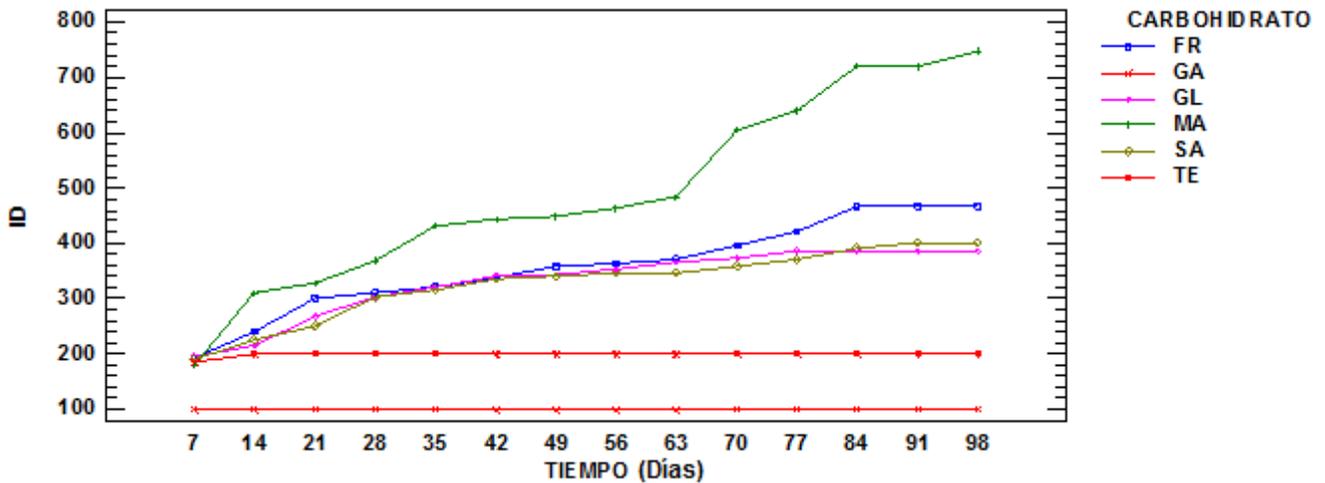
Figura 27. Respuesta morfogénica de *Barkeria uniflora* en MS al 100 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

## Medio MS al 75 %

Para el caso de las semillas sembradas en el medio MS al 75% se observa que existieron diferencias significativas entre los carbohidratos utilizados, como lo muestra la figura 26. El valor del índice de desarrollo más alto fue de 746 obtenido en la maltosa donde se observaron plántulas completas (estado 8). (Fig. 28)

Las semillas expuestas a la fructosa lograron después de los 98 días de cultivo un porcentaje de 66 % de protocormos con primordio con una hoja (estado 5), mientras que el 34 % continuó en el estadio 4.

El estímulo logrado por la sacarosa permitió que los protocormos desarrollaran un primordio foliar (estado 4), el valor alcanzado fue de 400. Mientras que en la glucosa el 86 % de las semillas alcanzó el estadio de protocormo con primordio foliar. El índice de desarrollo obtenido en el testigo fue de 200, semillas hinchadas y en la galactosa no se induce respuesta morfogénica.

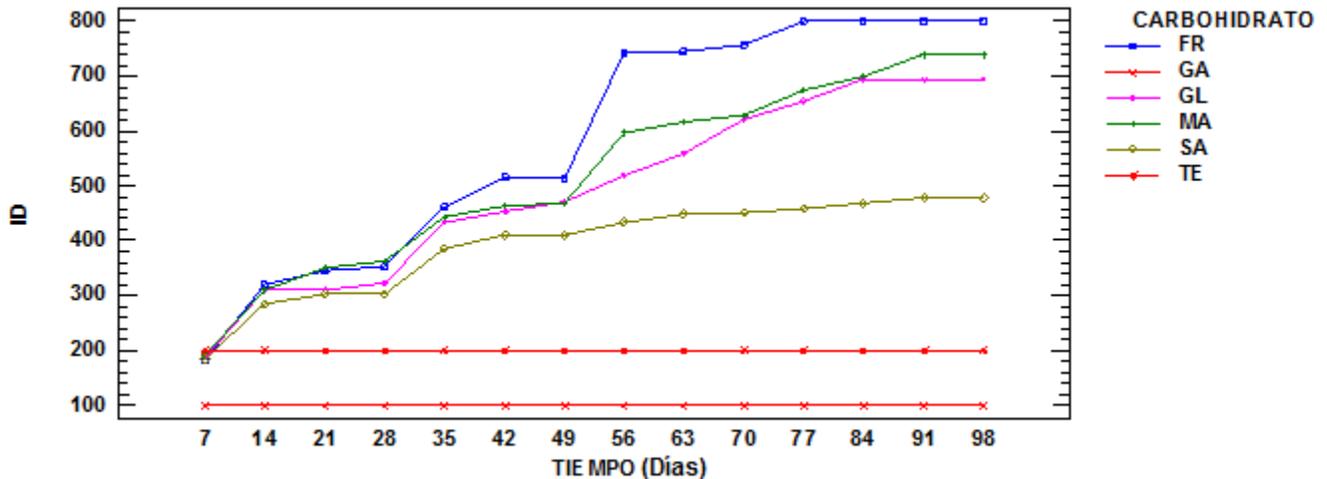


**Figura 28.** Respuesta morfogénica de *Barkeria uniflora* en MS al 75 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

## Medio MS al 50 %

En la figura 29 se puede observar que las semillas expuestas a fructosa desde los 77 días completaron su desarrollo obteniéndose plantas completas (estadio 8). En la maltosa se obtienen un valor del índice de desarrollo de 740, logrando un 40 % de plantas completas (estadio 8). Las semillas sembradas en glucosa también muestran buen desarrollo logrando alcanzar el estadio 7 (planta con tres hojas).

La respuesta morfológica de las semillas expuestas a la sacarosa fue de 480, donde el 80 % alcanzaron el estadio de protocormo con una hoja (estadio 5), el estadio 2 prevaleció en el testigo y la galactosa no induce respuesta morfológica.

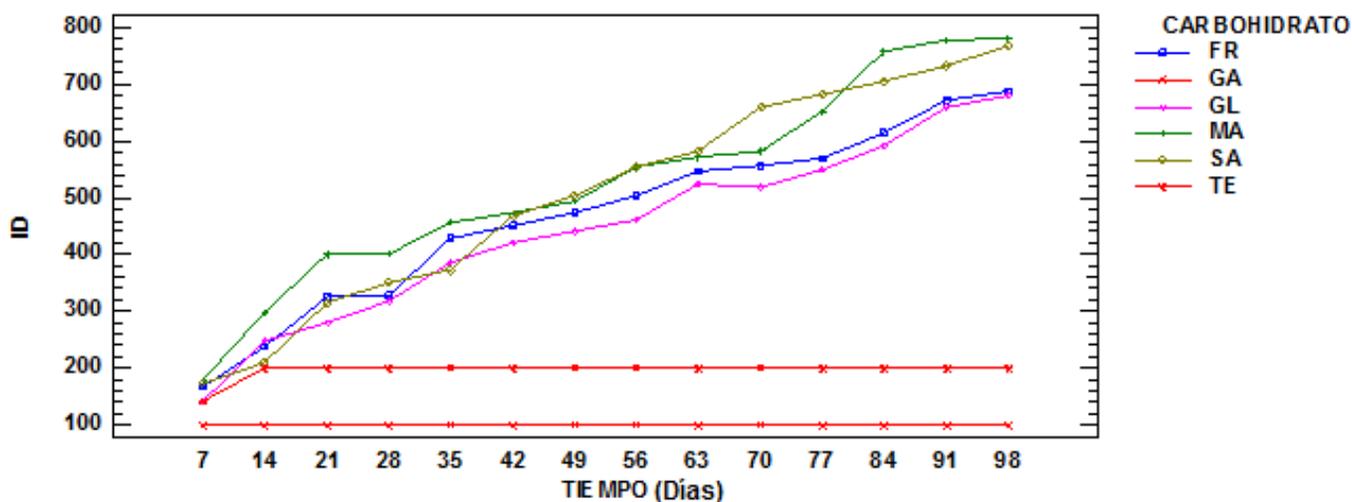


**Figura 29.** Respuesta morfológica de *Barkeria uniflora* en MS al 50 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

## Medio KM al 100 %

La respuesta morfológica obtenida en la maltosa y sacarosa fue la misma ambas promueven la formación de plantas con tres hojas (estadio 7) y plantas completas (estadio 8), el valor del índice de desarrollo fue de 780 y 766 respectivamente. (Fig. 30)

La fructosa y la glucosa tienen el mismo efecto inductor de la respuesta morfológica y del desarrollo, ya que al final de los días de cultivo ambas alcanzaron un 80 % de planta con tres hojas (estadio 7).



**Figura 30.** Respuesta morfológica de *Barkeria uniflora* en KM al 100 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

### Medio KM al 75 %

A los 98 días de cultivo se aprecia que las semillas expuestas a la fructosa, glucosa y maltosa, terminan su desarrollo generándose plantas completas (estadio 8). El valor del índice de desarrollo alcanzado en las semillas sembradas en el medio adicionado con sacarosa fue de 666, donde se observó un 66 % de plantas con tres hojas (estadio 7). (Fig. 31)

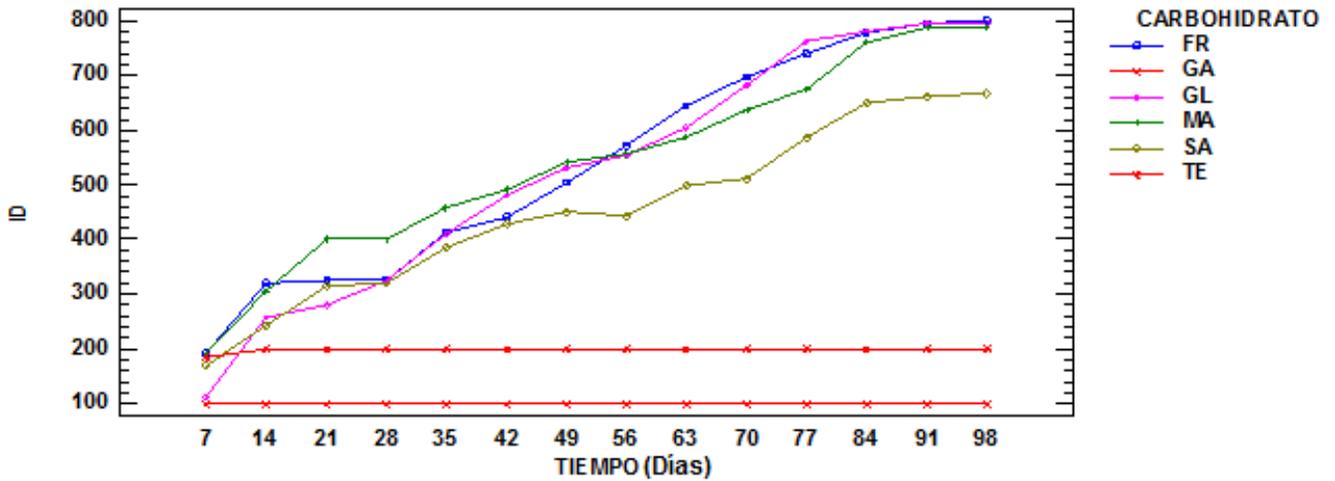


Figura 31. Respuesta morfológica de *Barkeria uniflora* en KM al 75 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

### Medio KM al 50 %

En la figura 32 se observa que desde los 91 días de cultivo las semillas expuestas a la fructosa y glucosa finalizan su desarrollo ya que se generaron plantas completas (estadio 8). Las semillas sembradas en sacarosa y maltosa también alcanzaron el último estadio pero en un menor porcentaje el cual fue de 40 %. La galactosa no induce la respuesta morfológica de las semillas de *Barkeria uniflora* ya que las semillas permanecen en el estadio 1 hasta el final del cultivo.

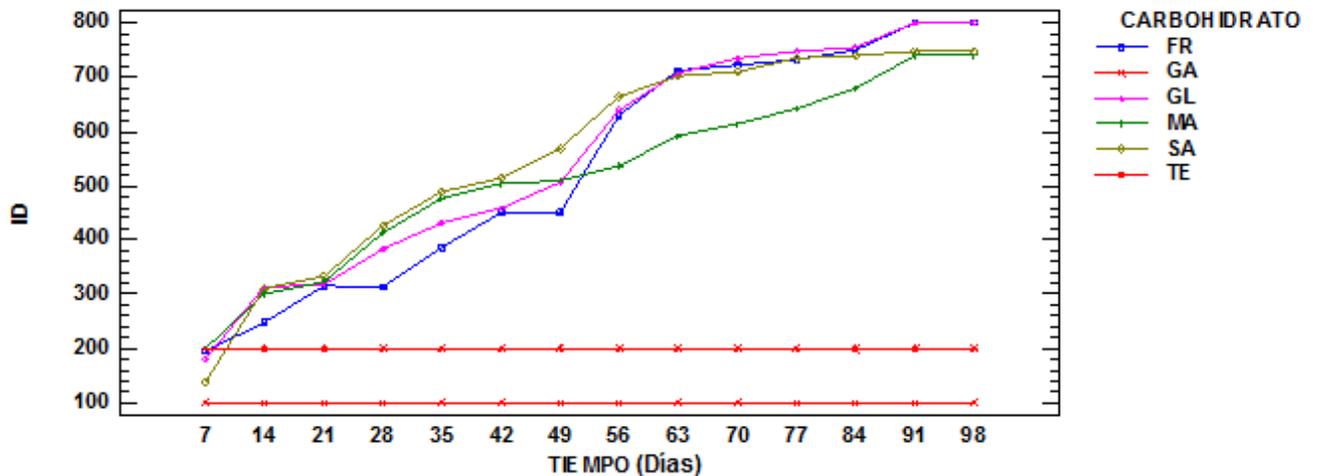
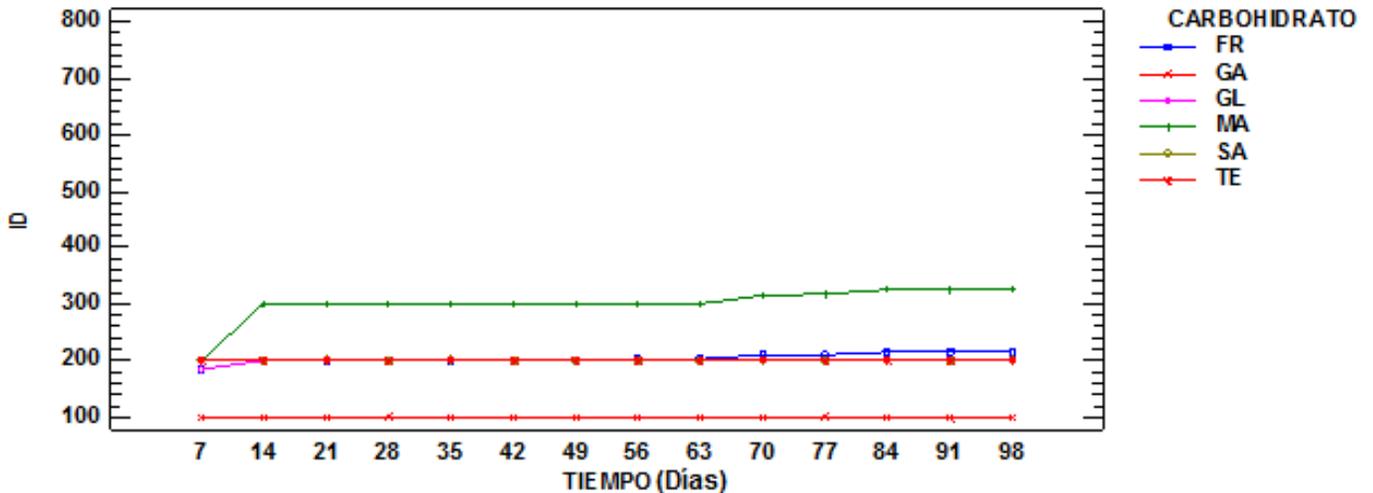


Figura 32. Respuesta morfológica de *Barkeria uniflora* en KM al 50 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

### Medio KC al 100 %

Se aprecia en la figura 33 que el estadio más alto que se pudo alcanzar fue el de protocormo con un valor del índice de desarrollo de 326, en las semillas sembradas en el medio adicionado con Maltosa. En la fructosa, glucosa, sacarosa y el testigo los embriones se hinchan y se ponen verdes pero no siguen con su desarrollo. Mientras que la galactosa tiene un efecto negativo en las semillas de *Barkeria uniflora*.



**Figura 33.** Respuesta morfogénica de *Barkeria uniflora* en KC al 100 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

### Medio KC al 75 %

El máximo estadio morfogénico alcanzado se obtiene en el medio KC adicionado con maltosa donde se observaron protocormos con una hoja (estadio 5), con un índice de desarrollo de 464. (Fig. 34).

En la fructosa, glucosa, sacarosa y el testigo los embriones se hinchan y se ponen verdes pero no siguen con su desarrollo.

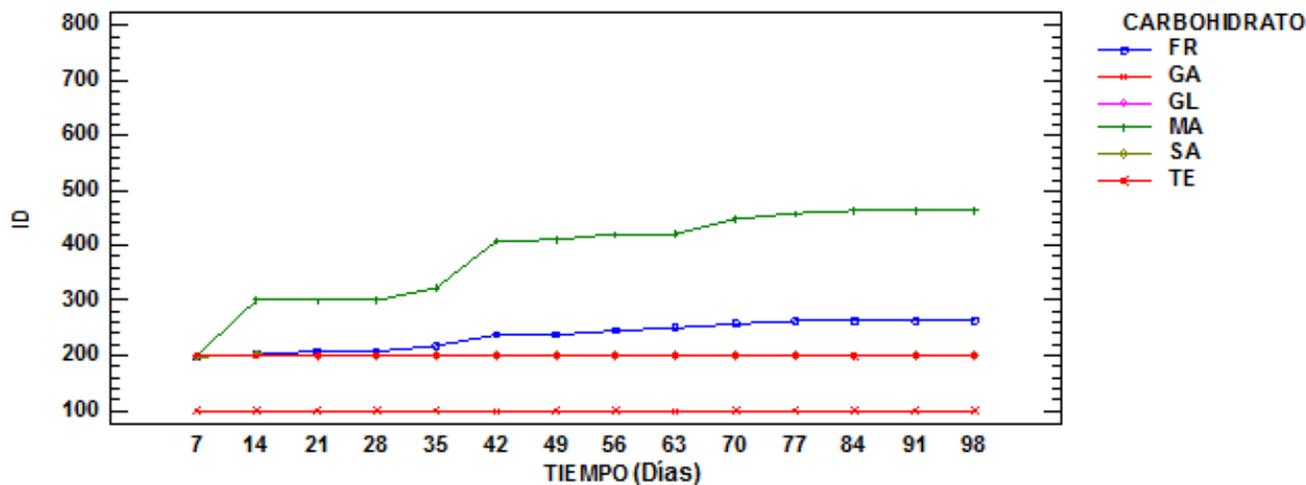


Figura 34. Respuesta morfológica de *Barkeria uniflora* en KC al 75 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

### Medio KC al 50 %

Para el caso de las semillas sembradas en el medio KC al 50 % se observa que existieron diferencias significativas entre los carbohidratos utilizados, como lo muestra la figura 35. El valor del índice de desarrollo más alto fue de 666 obtenido en la maltosa donde se observó un 66 % de plántulas con tres hojas (estadio 7). El estímulo logrado por la fructosa permitió que las semillas alcanzaran un 26 % de protocormos con primordio foliar y un 74 % de protocormos al final del cultivo.

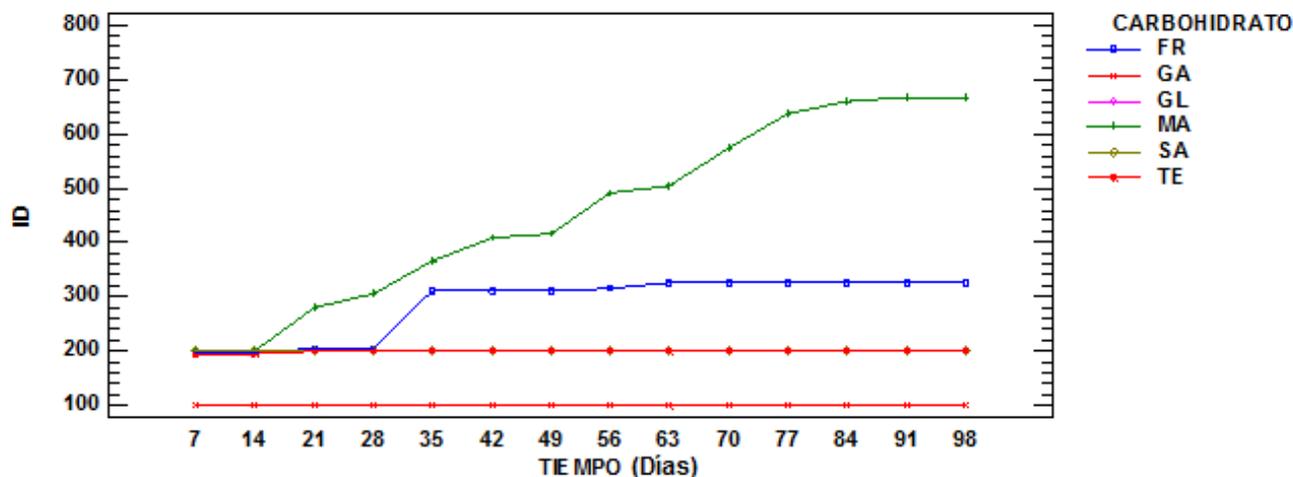


Figura 35. Respuesta morfológica de *Barkeria uniflora* en KC al 50 %, expuestas a Fructosa (FR), Galactosa (GA), Glucosa (GL), Maltosa (MA), Sacarosa (SA) y Testigo (TE).

## Plantas Completas a los 98 días de cultivo

El análisis de varianza demostró que existieron diferencias significativas (Valor- $P < 0.0000$ ) entre el tipo de medio de cultivo utilizado y el carbohidrato al que estuvieron expuestas las semillas, estos factores tuvieron un efecto estadísticamente significativos sobre el porcentaje de plantas completas con un 95 % de confianza. (Anexo 3.1.7).

Al comparar las medias de los porcentajes de plantas completas demostró que existieron diferencias significativas entre el tipo de medio de cultivo utilizado y el carbohidrato al que estuvieron expuestas las semillas. El medio de cultivo donde se alcanzó el porcentaje de plantas completas (estadio 8) (Fig. 40) más alto fue en el KM con un valor de 54 %, seguido por el medio MS donde se obtuvo un 35 % y el menor porcentaje se aprecia en el medio KC con un 5% de plantas completas. (Fig. 36) (Anexo 3.18).

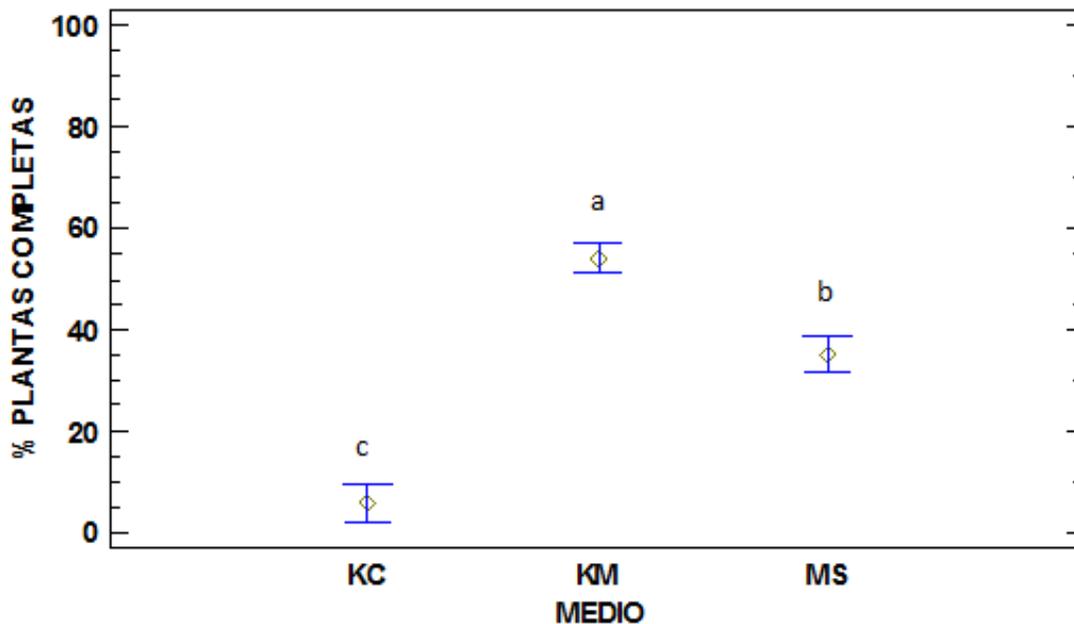
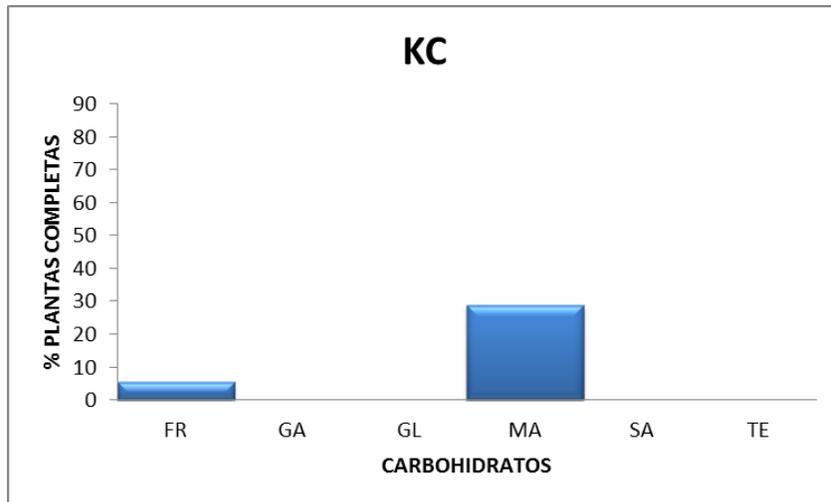


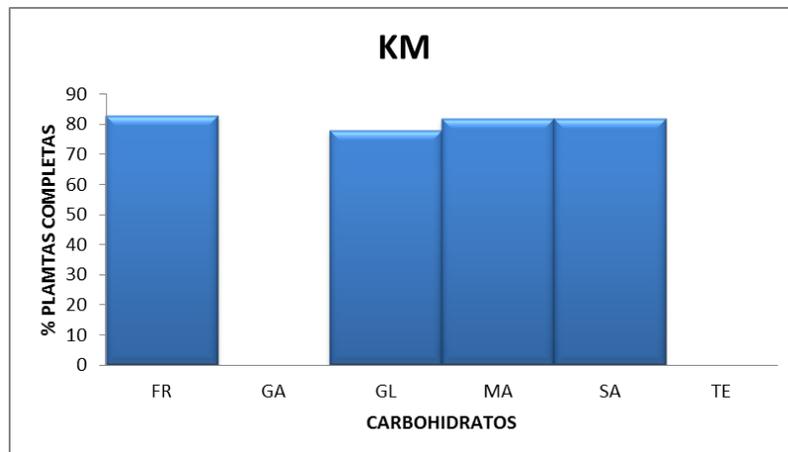
Figura 36. Desarrollo de plantas completas de *Barkeria uniflora* en los diferentes medios nutritivos.

En el medio nutritivo KC se observó, que la adición de maltosa es la que genera el mayor porcentaje de plantas completas con un valor de 29 %, seguido por la fructosa con un 6 %, los demás azúcares no generan plantas completas. (Fig. 37)



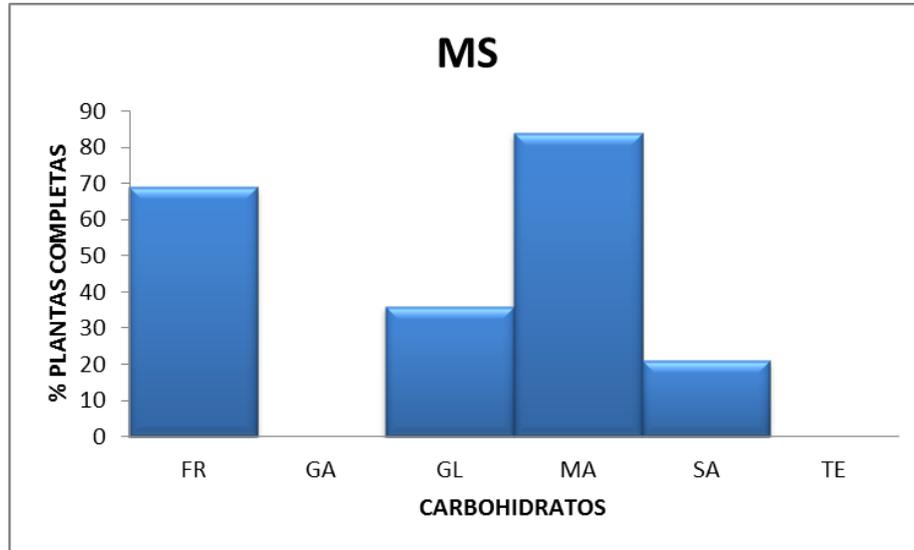
**Figura 37.** Porcentaje de plantas completas de *Barkeria uniflora* en el medio KC y en los carbohidratos expuestos.

La interacción del medio KM con los diferentes carbohidratos, demuestra que la fructosa, maltosa y sacarosa tienen el mismo efecto estimulante en la formación de plantas completas, ya que al adicionar estos carbohidratos al medio se obtiene un porcentaje de 83 %. Seguido por la glucosa con un 78 % y el testigo y la galactosa no generan plantas completas. (Fig. 38)



**Figura 38.** Porcentaje de plantas completas de *Barkeria uniflora* en el medio KM y en los carbohidratos expuestos.

En el medio nutritivo MS se observó, que la adición de maltosa es la que genera el porcentaje más alto de plantas completas el valor alcanzado fue de 84 %, seguido por la fructosa donde su generaron un 69 % de plantas completas, mientras que con la adición de glucosa se alcanzó un 36 % y con sacarosa un 21 %. (Fig. 39)



**Figura 39.** Porcentaje de plantas completas de *Barkeria uniflora* en el medio MS y en los carbohidratos expuestos.



**Fig. 40** Planta con raíces de *Barkeria uniflora*.

## DISCUSIÓN

La prueba de viabilidad con tetrazolio permitió determinar la condición fisiológica de los embriones de las semillas de *Barkeria uniflora*, esta prueba se basa en la respiración de las semillas viables, al momento de respirar liberan enzimas deshidrogenasas, el hidrogeno liberado por la reacción de la deshidrogenasa en los tejidos vivos se combina con la sal del tetrazolio que es incolora para formar un pigmento rojo (formazán) tiñendo a los embriones vivos de las semillas de *Barkeria uniflora*. Es claro que los embriones no coloreados indican poca actividad de las células embrionarias o muerte (Moreno 1984; Ortiz, 2001).

La viabilidad de las semillas expuestas a galactosa fue nula, Ernst y colaboradores (1971) reportan que la galactosa es tóxica para la germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas de orquídea, provocando la inhibición de éstas.

De acuerdo con Arditti y Ernst (1993), los porcentajes de germinación de orquídeas epifitas alcanzados sobre un medio asimbiótico son mayores al 50%; Santos y colaboradores (2005), reportan un porcentaje de germinación de 70 a 90% para *Laelia albida* utilizando el medio de Knudson C, suplementado con extracto de papa. Schneiders y colaboradores (2012) reportaron 45% de germinación para *Cattleya forbessii* en el medio MS y 90% para *Cattleya harrisoniana* en MS adicionado con 2.5 gL<sup>-1</sup> de carbón activado, a los 30 días de cultivo.

Resultados obtenidos con orquídeas del estado de Tabasco: *Trichocentrum ascendens*, *Trichocentrum carthagenense*, *Oncidium sphacelatum* y *Trichocentrum lindenii*, han obtenido resultados aceptables con promedios de germinación de semillas de un 70 a 90% (Mayo *et al.*, 2008).

Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde bajo condiciones *in vitro* se obtuvo un porcentaje de germinación de 99%. Villafuerte (2013), reportó que al utilizar el medio MS, se obtenía un alto porcentaje de germinación mayor al 90% en las semillas de *Barkeria whartonia* y *B. scandens*.

Lee y Lee (1991) reportaron que la germinación en semillas de orquídeas ocurre entre los 30 y 60 días de cultivo. De acuerdo con Cortes, 2006; Neyra y Rosas, 1998 reportan que para *Laelia speciosa* el proceso de germinación inicia a los siete días de cultivo. Esto concuerda con los resultados obtenidos para este estudio en semillas de *Barkeria uniflora* donde se pudo observar que a los 7 días ya se ha alcanzado un 80% de germinación y para los 14 días de cultivo se logra el mayor porcentaje de germinación 99%. Resultados similares se obtuvieron para *Barkeria scandens* donde se logró la germinación de semillas a los 15 días posteriores de la siembra, (Arenas y Aguirre, 2012).

Como se puede observar en la Figura 5 la germinación se lleva a cabo en casi todos los carbohidratos a los que se expusieron las semillas de *Barkeria uniflora*, también se pudo observar que en el Testigo donde no se encuentra la adición exógena de un azúcar también se logra la germinación. Estos resultados nos indican que el estímulo de un carbohidrato no es fundamental para el inicio del proceso germinación (Harrison y Arditti, 1978; Ernst y Rodríguez, 1984; Leroux *et al.*, 1995; Neyra y Rosas, 1998; Cortes, 2006). Esto nos hace inferir que es indistinto el hecho de que haya carbohidrato o no para que se dispare el proceso de germinación, ya que las semillas sólo necesitan humedad para iniciar dicho proceso.

Ernst y colaboradores (1971) reportaron que la adición de galactosa al medio de cultivo llega a inhibir el crecimiento de las orquídeas, lo cual concuerda con los resultados de este estudio ya que las semillas de *Barkeria uniflora* expuestas a galactosa no germinan. Nambiar *et al.*, 2012, observaron que la galactosa no promueve la formación de cuerpos parecidos a protocormos en el híbrido de *Dendrobium*.

No existe comparación alguna entre la germinación *in vitro* y la germinación en condiciones naturales, ya que en condiciones naturales sólo germinan una de 5 000 a una de 20 000 semillas, dependiendo del sitio (Hágsater *et al* 2005), por lo que se puede decir que en la germinación *in vitro* existe una mayor ventaja en la germinación, ya que todos los factores ambientales que inciden en la germinación *ex vitro*, se pueden controlar en el laboratorio.

Al realizar la comparación de las medias de los valores del índice de desarrollo se obtuvo que existieron diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados independientemente de la concentración de las sales y los carbohidratos a los que se expusieron las semillas de *Barkeria uniflora*.

Álvarez (2012), reporta que el medio KM adicionado con carbón activado incrementa el desarrollo de plántulas a partir de protocormos con una hoja en *Trichocentrum pachyphyllum*. Rodríguez (2013), observó que el medio de cultivo KM adicionado con carbón activado favorece el desarrollo ontogénico de las plántulas de *Epidendrum radicans*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio donde se demuestra que la germinación y desarrollo de *Barkeria uniflora* se ve favorecido en el medio de cultivo KM.

López-Roberts y colaboradores (2007) obtuvieron en *Epidendrum* sp. después de 42 días de cultivo, el estadio de protocormo con primordio foliar en los medios de cultivo MS. Arenas y Aguirre (2008), reportan que para *Barkeria scandens* las semillas alcanzan el estadio de protocormo con primordio foliar a los 50 días en medio MS. Sin embargo, en el presente estudio con *B. uniflora* el desarrollo de protocormos con primordio foliar en el medio MS invirtió 40 días más ya que se alcanza este estadio hasta los 98 días de cultivo.

Aparentemente, la necesidad elevada de nutrimentos en el cultivo *in vitro* responde al hecho de que la plántula no es capaz de asimilar eficientemente los nutrimentos disponibles en el medio de cultivo (Romero-Tirado, 2007), ya que necesita una micorriza para su adecuada asimilación de nutrientes.

Al utilizar las sales basales, de los medios nutritivos, diluidas a la mitad de su concentración fueron las que generaron una mayor respuesta para la germinación *in vitro* de *B. uniflora* independientemente del medio de cultivo usado, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Massaro y colaboradores, (2012) en *Epidendrum secundum* sembradas en medio MS a la mitad de su concentración.

En diferentes especies de orquídeas de Tabasco se han obtenido resultados aceptables con promedios de germinación de 90 % empleando el medio MS al 50 % de su concentración. (Mayo *et al.*, 2008).

Estos resultados se deben a que las orquídeas epífitas como es el caso de *Barkeria uniflora* están acostumbradas a recibir nutrientes diluidos en pequeñas cantidades pero de forma constante. (Menchaca y Moreno 2011).

Al exponer las semillas de *B. uniflora* a diferentes fuentes exógenas de carbohidratos se pudo observar que la maltosa tiene un efecto positivo en la germinación y en el desarrollo de las semillas de esta especie, lo cual concuerda con George *et al.*, 2008, quien reporta que la maltosa sirve como una fuente de carbono y como un agente osmótico superando a la sacarosa.

Existen pocos reportes sobre el uso de la maltosa como fuente exógena de azúcar, Abu y colaboradores 2005, reportan el uso de este carbohidrato en la generación de cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) a partir de callo en *Doritaenopsis*.

Comparando a la maltosa con la sacarosa, la hidrólisis de sacarosa se produce a un ritmo más rápido en comparación con la tasa de absorción de los azúcares en el tejido de la planta, mientras que la maltosa se hidroliza más lentamente, lo que ayuda a la absorción de este azúcar en las plantas ( Yu *et al.*, 2000).

La fructosa es una fuente de carbono y energía para el embrión, siendo el estímulo disparador para su desarrollo morfogénico durante su germinación (Luna y Barba, 1993), esto concuerda con los resultados obtenidos ya que las semillas de *Barkeria uniflora* alcanzan el estadio de protocormo con primordio foliar al ser expuestas a este azúcar.

Murdad *et al.*, 2010, reportaron en *Phalaenopsis gigantea* un índice de desarrollo de 537, para las semillas expuestas al estímulo de fructosa seguido por la glucosa (495) y sacarosa (493), resultados muy similares con los obtenidos en este trabajo.

Como se observa en la Figura 10, las semillas que se exponen a la galactosa no germinan, esto concuerda con lo reportado por Ernst y colaboradores (1971), expone que la D-galactosa llega a ser toxica para las semillas de orquídea, ya que retrasa el crecimiento de las plantas, rompe el tonoplasto de las células y se invagina la envoltura nuclear, lo que sugiere que este azúcar altera los factores responsables del mantenimiento de la permeabilidad de la membrana.

Las semillas de *Barkeria uniflora* que fueron sembradas en medio MS registran un mayor desarrollo y crecimiento a una concentración del 50 % de las sales inorgánicas, seguidas por las sembradas al 100 %. Y el desarrollo ontogénico se ve favorecido por la maltosa y la fructosa, (Figura 11 y 12). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Aguilar-Morales y López-Escamilla (2013), donde el medio MS al 50 % favoreció la germinación de *Laelia speciosa* en un tiempo de 10 días y en MS al 100 % este proceso comienza a los 16 días.

Romero-Tirado (2007), reportan que en *Laelia anceps* género muy cercano a *Barkeria*, el medio MS al 100 % y MS al 50 % favorece el desarrollo de plántulas vigorosas, con dos o más raíces y mayor biomasa para la germinación.

Estos resultados se deben a que el Medio MS es rico en sales minerales, lo que favorece el desarrollo de plántulas de *Barkeria uniflora*, incluso cuando se utilizó a la mitad de su concentración.

Álvarez (2012), observó el desarrollo de características morfológicas favorables, como vigor, pigmentación y tamaño, en las plántulas de *T. pachyphyllum* cultivadas en el medio KM. Rodríguez (2013), indica que el medio KM, adicionado con carbón activado, favorece el desarrollo ontogénico de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Lo que concuerda con los resultados obtenidos en las semillas sembradas en el medio KM, donde la germinación y desarrollo se favorece en la concentración de 50 y al 75 % de las sales del medio. El estímulo de la maltosa, fructosa, glucosa y sacarosa fue similar ya que todas inducen el desarrollo de *Barkeria uniflora* (Figura 15 y 16).

Romero-Tirado, 2007. Reporta que para *Laelia anceps* se genera solo un 5 % de plantas en medio KC al 100 y 50 %. Estos resultados coinciden con los reportados en el presente estudio, donde se observó que el medio KC indujo la germinación pero genera poca respuesta morfogénica en las semillas de *Barkeria uniflora*, esto se debe a que el medio KC esta formulado especialmente para la germinación de orquídeas (Arditti & Ernst 1993), pero este medio es muy pobre en sales minerales, lo que no favorece el desarrollo de las orquídeas en este.

Los resultados obtenidos en la respuesta morfogénica durante la siembra de las semillas de *Barkeria uniflora*, expuestas a diferentes fuentes exógenas de carbohidratos. Demostraron que la maltosa y la fructosa inducen una mejor respuesta morfogénica en los embriones de esta especie, llegando a formar plantas completas al término de los 98 días de cultivo, sin embargo los demás carbohidratos también son una buena fuente de energía y de inducción de la morfogénesis.

Lo que concuerda con lo reportado por Neyra y Rosas (1998), para *Laelia speciosa*, donde la fructosa y la glucosa inducen el desarrollo morfogénico del embrión.

Así mismo, Buentello y Sánchez (1998), reportan que la sacarosa promueve el desarrollo del embrión y de plántulas con raíces en *Laelia speciosa*. Cortes, 2006, menciona que la Fructosa como fuente exógena de carbón y de energía induce el desarrollo morfológico del embrión en las semillas de *Laelia speciosa*.

Nambiar y colaboradores (2012), obtienen un mayor peso fresco de cuerpos parecidos a protocormos PLB's de *Dendrobium*, en medios adicionados con Fructosa seguida de Glucosa y Sacarosa.

Esto se debe a que los azúcares, especialmente glucosa y sacarosa estimulan el crecimiento de las células. Tanto la glucosa y la sacarosa juegan un papel esencial en la aceleración del proceso de la división celular mediante la mejora específicamente la expansión celular y el fomento de la acumulación de reservas en los embriones de las plantas Borisjuk *et al.*, 2003.

Al final de los días de cultivo de *Barkeria uniflora* se pudieron observar plantas completas (estadio 8), éstas se encontraron en casi todos los tratamientos y en los diferentes carbohidratos a las que se expusieron, siendo en el testigo y la galactosa en donde no se formaron.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Arena y Aguirre (2012), donde pudieron observar plantas completas de *Barkeria scandens* a los 97 días de cultivo. Cortes, 2006, obtiene mayor número de plantas completas en medios adicionados con fructosa.

Villafuerte (2013) obtuvo plantas completas de *Barkeria whartonianana* a partir del cultivo *in vitro* de secciones longitudinales de protocormos en medio MS y MS al 50 % a los 180 días de cultivo y de *B. scandens* mediante el cultivo *in vitro* de secciones de diferentes tipos de explante (tallo y hoja) en medio MS y MS al 50 % después de 180 días.

Neyra y Rosas, 1998 reportan que en el medio donde se mantiene constante el estímulo de fructosa y glucosa se obtiene un mayor porcentaje de plantas completa. Álvarez, 2012, reporta la generación de plantas completas de *Trichocentrum pachyphyllum* a los 90 días en medio KM y Peters.

## CONCLUSIONES

- El proceso de germinación de las semillas de *Barkeria uniflora* inicia a los 7 días y alcanza su máximo porcentaje a los 14 días.
- Los medios de cultivo que inducen el máximo porcentaje de germinación de *Barkeria uniflora* son aquellos suplementados con Maltosa, Fructosa, Glucosa y Sacarosa.
- El medio de cultivo donde se induce en menor tiempo el proceso de germinación y el desarrollo de plántulas de *B. uniflora* es el Kao y Michayluk (KM), seguido por el Murashige & Skoog (MS) y por último el Knudson C (KC).
- Al utilizar cualquiera de las sales basales de los medios nutritivos diluidas a la mitad de su concentración se promueve el mayor desarrollo durante la germinación de las semillas de *B. uniflora*.
- El máximo porcentaje de plantas completas se desarrollan en el medio KM con el estímulo de Fructosa, Maltosa y Sacarosa y en MS con Maltosa.
- El proceso de germinación de *B. uniflora* se inhibe al adicionar Galactosa en el medio de cultivo e induce la pérdida de viabilidad.
- La Maltosa y Fructosa, como fuente exógena de carbono y de energía, son el mejor estímulo disparador para el desarrollo morfogénico de plántulas con hojas y raíces de *Barkeria uniflora*.
- Se estableció un protocolo para la germinación *in vitro* de *Barkeria uniflora*, con el cual se logró un 99 % de germinación y un 84 % de plantas completas.

## BIBLIOGRAFÍA

Abu Reza Md., Rahman M., Obaidul M., Azad-ud-doula A. y Ichihashi S. 2005. Effects of Carbohydrates on Callus Growth and Callus Derived Plantlet Regeneration in *Doritaenopsis* Orchid. *Biotechnology* 4(2): 126-131.

Aguilar-Morales M. y López-Escamilla A. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa*, una herramienta para su conservación *ex situ*. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas. Editores Griselda Pulido-Flores y Scott Monks. Volumen II.

Álvarez Juárez C. A. 2012. Estudio del Efecto Hormonal y de Compuestos Orgánicos en el cultivo *in vitro* de la orquídea *Trichocentrum pachyphyllum* (hook.) R. Jiménez & Carnevali. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza. México. 88 pp.

Arditti, J. 1966. Orchids. *Scientific American*. 204(1). 70-78 pp.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review*. 33 (1): 1-83.

Arditti, J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. *Adv. Bot. Res.* 7: 422-665.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley y sons, Inc. USA. 691pp.

Arditti, J. 1993. *Micropropagation of orchids*. Ed. John Wiley and sons. New York. 949 pp.

Arditti, J. y Ernst, R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. USA. 37-38, 55-57, 949 pp.

Arditti, J., R. Ernst, T. W. Yam y C. Glabe. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana*, 5(4): 249-255.

Arditti, J., y R Ernst. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. En *Orchid Biology III*. J. Arditti (ed). Comstock Publishing Associates. U.S.A.: 177-222.

Arenas Abreo E. B. y Aguirre León E. 2012. Micropropagación aplicada a la conservación de *Barkeria scandens* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb. (Orchidaceae) mediante el empleo de semillas inmaduras. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. En: Conservación de Orquídeas en México. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco (compiladora y editora). UNAM. México, D.F. 88-93.

Baker, K., Mathes, M. & Wallace, B. 1987. Germination of *Ponthieva* and *Cattleya* seeds and development of *Phalaenopsis* protocorms. *Lindleyana* 2 (2): 77-124.

Ballard, W.W. 1987. Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds. *American Orchid Society*. 56(9): 935-946.

Batygina, T. B., Bragna, E. A., y Vasilyeva V. E. (2003). The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biológica Cracoviensia. Series Botánica* 45 (2):2134.

Bell, A. D., y A. Bryan. 1991. *Plant from- An illustrated Guide to Flowering Plant Morphology*. Oxford University Press, Orford.

Bernard, N. 1909. L'évolution dans la symbiose. *Annales des Sciences Naturelles Botanique*, Paris 9: 1-196.

Betchel, H., P. Cribb y E. Launert. 1986. *The manual of cultivated orchid species*. The MIT Press. Cambridge, Massachussets. 444 pp.

Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U, Weber H. 2003. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into sedes. En: *J Exp Bot* 54(382): 503-512

Buentello V. B. y Sanchez S. 1998. Efecto del estímulo por Sacarosa y Manitol al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa* H.B.K.) Schltr. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 60 pp.

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

CONABIO. 2000. Estrategia Nacional sobre Biodiversidad de México. SEMARNAP/CONABIO, México, D.F. 103 pp.

Cortes Sanchez C. 2006. Efecto del estímulo por Fructosa durante el proceso de germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 73 pp.

Damon, A., Aguilar-Guerrero, E., Rivera, L. y Nikolaeva, V. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 10(2): 195- 203.

De la Cruz, R. 2006. Micropropagación y adaptación a condiciones ambientales de: *Prosthechea vitellina* (Lindl) W. E. Higgins (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 21-32.

Dressler, R. L. 1981. The Orchids: Natural history and classification. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Ernst R. y Rodríguez E. 1984. Carbohydrates of the Orchidaceae in Orchid Biology. Reviews and Perspectives. III. J. Arditti (ed.). Comstock Publishing Associates. USA. 223- 260.

Ernst, R., J. Arditti y P. L. Healey. 1971. Carbohydrate physiology of orchid seedlings II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. En: *American Journal of Botany*, 58(9): 827-835 pp

Ertola, R., Yantorno, O. y Mignone, C. 1994. Crecimiento microbiano. En Microbiología Industrial. (ed. OEA. Prog. Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico), Washington, DC, USA 43-54 pp.

Espejo S. A.; J. García C.; A. R. López F.; R. Jiménez M.; L. Sánchez S. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D. F.406 pp.

Espejo, S. A.; A. R. López-Ferrari. 1998. Las monocotiledóneas mexicanas una sinopsis florística 1. Lista de referencia Parte VII. Orchidaceae I. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF. 90 pp.

Espinosa, G. A. M. (2004). Proliferación de *Rhynchostele bictoniens* (Orchidaceae) a partir de semillas y explante material cultivado *in vitro*. FES Iztacala. México.

Estopa B. 2005. El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Revista Extra. pp. 50-57. Universidad de la Rioja España.

Francisco, Nava. 2008. Propagación *in vitro* y establecimiento en invernadero de las orquídeas *T. carthagenense* y *Laelia eyermaniana* para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. IPN. México.

García, J.A., Valerín A.T. y Salazar R. 1993. Utilización de tres medios orgánicos para la germinación *in vitro* de semillas de Guaria Morada *Cattleya skinneri* (Bateman). *Uniciencia*. 10: 79-83

García-Cruz J., L. M. Sanchez Saldaña; R. Jiménez Machorro; R. Solano Gómez. 2003. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes, Orchidaceae, Tribu Epidendreae. Herbario AMO. México D. F. 178 pp.

George E. F., Hall M. A. y Geert- Jan De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. pp. 115–173.

George, E. F. y Sherrington, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics. ITD. Basingstoke. 709 pp.

George, E.F., Puttock D.J. y George H.J. 1987. Plant culture media, Vol 1: Formulation and uses. England, Bristish Library Cataloguing in Publication Data. 567 pp.

Gravel, H. 1989. Étude de la germination et des premières étapes de la morphogenese du *Cypripedium reginae* Walt. (Orchidaceae). Memoire de maitrise, Université de Montréal, Montréal.

Haddix, M., G.M. Kamp y C. Raczkowski (2006). *In vitro* Shoot and leaf proliferation of *Encyclia tampensis* (Lind.) Orchidaceae. Abstracts of the ASHS Southern Region 66th Annual Meeting. *HortScience* Vol. 40(3).

Hadley, G. y Williamson, B. 1972. Features of mycorrhizal infection in some Malayan Orchids. *New Phytol.* 71:1111-1118.

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

Halbinger, F. 1972. Historia y estudios preliminares sobre el género *Barkeria*. *Orquídea* (Mexico city). 2 (7): 177-190.

Harrison, C. R. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 138(1): 41-45.

Harrison, C. R., y J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 139(2): 180-189.

Juárez, S. R. 1994. Respuesta organogénica *in vitro* de orquídea (*Laelia autumnalis* (Lindl.)) y violeta africana (*Saintpaulia ionantha* (Wendl.)) al adicionamiento de vitaminas al medio de cultivo. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.

Judd, W., C. Campbell, E. Kellogg, P. Stevens y M. Donoghue. 2008. Plant Systematics. Sinauer. Massachusetts.

Kao K.N., and Michailuk M.R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cell and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*. 126:105-110.

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

Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*.73:1-25.

Kubota C. y Toyoki K. 1991. Effects of initial amount of sugar in the médium on the growth of *Cymbidium* PLB *in vitro*. *Hortscience*, 26 (69).

Lallana, V., Billard, C. y Klug, L. (2010). Germinación y desarrollo de plántulas “*in vitro*” de *Oncidium bifolium* Sims var. *bifolium* (Orchidaceae). Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER. pp. 354.

Lee, J. y Lee H. 1991. Micropropagación de orquídeas a partir de semillas. Boletín informativo de FIRA XXIV 2:15-30.

Leroux, G., D. Berabé y J. Vieth. 1995. Morphogenése comparée de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) Cultives *in vitro* avec ou sans sucre. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1391-1406 pp.

López-Roberts, C., Villegas-Alvarado, G., Mamani-Sánchez, B., BermejoFranco, J., Aguilar-Llanos, M., and Quezada-Portugal, J. 2007. Orchids’ micropropagation for to the sustainable management of native species from Parque Nacional y Área Natural de manejo integrado Cotapata (PN-ANMI COTAPATA), La Paz Bolivia. Universidad de Costa Rica. *Lankesteriana* 7:1-2

Luna Rosales B., Barba Álvarez A., Romero Tirado R., Pérez Toledano E., Perea Morales O., Padrón Hernández S., Sierra Jiménez H., Rosa de la Cruz y Jardón Sánchez D. 2007. “Diversidad de Orquídeas en el “Parque Nacional Iztaccihuatl-Popocatépetl” (México) y sus áreas de influencia “. En: *Lankesteriana* 7(1-2): 56-59.

Luna, R. B. y A. Barba. 1993. Estudio morfogénico de la semilla de *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR durante su germinación asimbiótica *in vitro*. En V encuentro Latinoamericano de Orquideología. Octubre, 19-25; 24-25 pp.

Manning, J.C., and Van Standen, J, 1987. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. *Australian Journal Botanical*. 35: 343353.

- Massaro, R., Cordeiro, G., Souza-Leal, T., Pedroso-de-Morales, C. 2012. Desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. em meios de cultivo simplificados. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*. 5(2):337-3351.
- Mayo Mosqueda A., Cázares C.J.G., De la Cruz L. E., Flores H. A. 2008, Conservación y Propagación de Orquídeas de Tabasco. SAGARPA-CONACYT.
- McKendrick, S., 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Menchaca Garcia y Moreno M. D. 2011. Manual para la Propagación de Orquídeas. Comisión Nacional Forestal. México. 51 pp.
- Merino, M.E. 1987 (REIMP. 2000). Medio de Cultivo. En: Cultivo de Tejidos Vegetales. D. Hurtado M. y M.E. Merino M. ed. Trillas: 87-95.
- Mitra, G.C, Prasad RN, and Roychowdary A. 1976. Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed-callus of an orchid and correlated changes in its free amino acid content. *Indian Journal of Experimental Biology*. 14:350351.
- Moreno, M. E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM. México D. F.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. En: *Physiologia Plantarum*. 15:473-47.
- Murdad R., Latip M., Abdul Z. y Ripin R. 2010. Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*. Vol. 18 (1): 199-202
- Nambiar N., Tee C.S. y Maziah M. 2012. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm like bodies in *Dendrobium* Alya Pink. En: *Plant Omics Journal*. 5(1):10-18.

Navarrete-Valencia A. L.; Ramírez-Guerrero L. G.; Arrieta-Ramos B. G. 2011. Micropropagación de *Barkeria uniflora* (Lex.) por cultivo de hojas. Universidad Autónoma de Nayarit.

Neyra M. C. y Rosas H. 1998. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 43 pp.

Ortiz, M. V. 2001. Viabilidad de las semillas de 3 especies de orquídeas del Valle de Tehuacán, Puebla, bajo condiciones de almacenamiento. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza. México. 43 pp.

Otero, J. T. y Bayman, P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*. 58(4):270-276.

Pedroza, M.J. y Mican, G.Y. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.F. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42: 543-547.

Pedroza, M.J., L.Ch. Fernández y S.A. Suarez (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcate* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 38-843.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editorial. Mundi Prensa. Madrid.

Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (1998). *Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología UNAM. México. 21 pp.

Rodríguez Farfán A. B. 2013. Inducción de la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 68 pp.

Romero-Tirado, R. 2007. Fertilizantes comerciales como sustitutos en el cultivo *in vitro* de *Laelia anceps* Subsp *anceps* (Orchidaceae). Especie mexicana. Unidad de investigación en Biología Vegetal. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.

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

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

Schneiders, D., Pescador, R., Raitz-Booz, M., Mamoru-Suzuki, R. 2012. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya spp.*, Orchidaceae).

Seaton, P. and M. Ramsay. 2005. Growing orchids from seeds. Royal Botanical Garden, Kew. London, England.

Shimura, H. y Koda, Y. 2004. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocormo-like bodies derived from mature seeds. *Plant cell tissue and organ culture*. 78:273-276.

Shushan, S. (1959). Developmental anatomy of an orchid, *Cattleya x Trimos*. In: The Orchids. Withner, L. (Ed.) Ronal Press Co. USA.: 45-72 pp.

Soto Arenas, M. A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea* (Méx.) 11: 233-277.

Soto Arenas, M. A., E. Hágsater, R. Jiménez, G.A. Salazar, R. Solano, R. Flores E I. Contreras. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.

Soto Arenas, M. A.; Solano Gómez R.; Hágsater, E.; R. Jiménez Machorro; Sosa V.; Salazar Chavez G. 2008. Icones Orchidacearum, Fascículo 10, Orquídeas de México parte 4. Herbario AMO México D. F. 1008-1009 pp.

Stancato, G. C., E. P. Chagas y P. Mazzafera. 1998. Development and germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). *Lindleyana* 13(2): 97-100.

Steele, W.K. (2007). Propagation protocol for ram's head lady's slipper (*Cypripedium arietinum*). *Native Plants Journal* 8: 58-64.

Thien, L. B. y Dressler, R. L. 1970. Taxonomy of *Barkeria* (Orchidaceae). *Brittonia*. 22 (4): 289-302.

Thompson, P A. 1989. Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens New Wakehurst place.

Tsutsuit, K. y M. Tomita. 1990. Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling growth of two orchid species. *Lindleyana*, 5(2): 134-139 pp.

Villafuerte S. A. 2013. Micropropagación de *Barkeria whartoni* y *Barkeria scandens* (Orchidaceae), especies mexicanas en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 151 pp.

Villaseñor, J. L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28: 160-167

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

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

Yoneo, S., 1991. Clonal propagation of orchids. Plant Tissue Culture Manual C1 Kluwer Academic Publishers, Netherlands 1-7 pp.

Yu WC, Joyce PJ, Cameron DC, McCown BH 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Rep* 19: 407-413 pp

## ANEXOS

**Anexo 1.** Composición de las sales inorgánicas analíticas de los medios nutritivos.

<b>Compuestos mg l<sup>-1</sup></b>	<b>Murashige &amp; Skoog (MS)</b>	<b>Kao y Michayluk (KM)</b>	<b>Knudson C (KC)</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>1650</b>	<b>600</b>	<b>-</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	<b>1900</b>	<b>1900</b>	<b>-</b>
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	<b>332.2</b>	<b>453</b>	<b>-</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<b>370</b>	<b>146.55</b>	<b>250</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>170</b>	<b>170</b>	<b>250</b>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>500</b>
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1000</b>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>6.2</b>	<b>3</b>	<b>-</b>
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	<b>22.3</b>	<b>10</b>	<b>5.682</b>
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>8.6</b>	<b>2</b>	<b>-</b>
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>-</b>
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>-</b>
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>-</b>
<b>KI</b>	<b>0.83</b>	<b>0.75</b>	<b>-</b>
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>27.85</b>	<b>27.8</b>	<b>25</b>
<b>Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O</b>	<b>37.27</b>	<b>37.3</b>	<b>-</b>
<b>KCl</b>	<b>-</b>	<b>300</b>	<b>-</b>

## Anexo 2 Resultados

Análisis de varianza para el porcentaje de Germinación.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	20400,7	13	1569,28	58,16	0,0000
B:CARBOHIDRATO	3,08703E6	5	617406,	22882,64	0,0000
INTERACCIONES					
AB	8245,2	65	126,849	4,70	0,0000
RESIDUOS	58927,4	2184	26,9814		
TOTAL (CORREGIDO)	3,1746E6	2267			

## Anexo 3 Análisis de varianza para ID por todos los tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	1.18391E7	13	910697.	675.80	0.0000
B:MEDIO	1.1662E7	2	5.83098E6	4326.96	0.0000
C:[] SALES	897119.	2	448559.	332.86	0.0000
D:CARBOHIDRATO	3.66459E7	5	7.32918E6	5438.72	0.0000
INTERACCIONES					
AB	3.85781E6	26	148377.	110.11	0.0000
AC	365690.	26	14065.0	10.44	0.0000
AD	6.70277E6	65	103120.	76.52	0.0000
BC	339768.	4	84942.1	63.03	0.0000
BD	7.38154E6	10	738154.	547.76	0.0000
CD	653856.	10	65385.6	48.52	0.0000
ABC	176622.	52	3396.58	2.52	0.0000
ABD	2.67445E6	130	20572.7	15.27	0.0000
ACD	399344.	130	3071.88	2.28	0.0000
BCD	1.29029E6	20	64514.4	47.87	0.0000
ABCD	912209.	260	3508.5	2.60	0.0000
RESIDUOS	2.03756E6	1512	1347.59		
TOTAL (CORREGIDO)	8.78359E7	2267			

### Anexo 3.1 Pruebas de Rangos Múltiples para ID por Tiempo.

TIEMPO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	162	171.679	2.88418	x
14	162	220.735	2.88418	x
21	162	241.037	2.88418	x
28	162	253.605	2.88418	x
35	162	283.599	2.88418	x
42	162	301.321	2.88418	x
49	162	310.136	2.88418	x
56	162	335.802	2.88418	x
63	162	350.519	2.88418	x
70	162	365.235	2.88418	x
77	162	381.352	2.88418	x
84	162	397.556	2.88418	x
91	162	408.321	2.88418	x
98	162	410.42	2.88418	x

### Anexo 3.2 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Medio nutritivo.

MEDIO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
KC	756	220.439	x
MS	756	336.476	x
KM	756	392.652	x

### Anexo 3.3. Prueba de Rangos Múltiples para ID por Concentración de Sales.

[ ] SALES	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100%	756	300.259	x
75%	756	304.78	x
50%	756	344.528	x

### Anexo 3.4 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos.

CARBOHIDRATO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
GA	378	100.0	x
TE	378	199.27	x
SA	378	351.423	x
GL	378	367.177	x
FR	378	411.254	x
MA	378	470.011	x

### Anexo 3.5 Análisis de varianza para el ID por Medio MS.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	4.62787E6	13	355990.	243.51	0.0000
B:[ ] SALES	857752.	2	428876.	293.36	0.0000
C:CARBOHIDRATO	1.56934E7	5	3.13867E6	2146.94	0.0000
INTERACCIONES					
AB	302518.	26	11635.3	7.96	0.0000
AC	3.18814E6	65	49048.2	33.55	0.0000
BC	1.01782E6	10	101782.	69.62	0.0000
ABC	546499.	130	4203.84	2.88	0.0000
RESIDUOS	736812.	504	1461.93		
TOTAL (CORREGIDO)	2.69708E7	755			

### Anexo 3.6 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Tiempo (MS).

TIEMPO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	54	173.926	5.20315	X
14	54	234.648	5.20315	X
21	54	254.667	5.20315	X
28	54	270.37	5.20315	X
35	54	305.685	5.20315	X
42	54	323.741	5.20315	X
49	54	327.704	5.20315	X
56	54	360.593	5.20315	X
63	54	369.481	5.20315	X
70	54	386.815	5.20315	X
77	54	406.37	5.20315	X
84	54	425.556	5.20315	X
91	54	434.815	5.20315	X
98	54	436.296	5.20315	X

### Anexo 3.7 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Concentración de Sales (MS).

[ ] SALES	Casos	Media	Grupos Homogéneos
75%	252	301.095	X
100%	252	326.544	X
50%	252	381.79	X

### Anexo 3.8 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos (MS).

CARBOHIDRATO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
GA	126	100.0	X
TE	126	199.683	X
SA	126	348.778	X
GL	126	393.325	X
FR	126	476.5	X
MA	126	500.571	X

### Anexo 3.9 Análisis de varianza para el ID por Medio KM.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	1.07883E7	13	829868.	392.19	0.0000
B:[ ] SALES	182461.	2	91230.5	43.12	0.0000
C:CARBOHIDRATO	2.3062E7	5	4.61239E6	2179.81	0.0000
INTERACCIONES					
AB	112889.	26	4341.87	2.05	0.0018
AC	5.3954E6	65	83006.2	39.23	0.0000
BC	477649.	10	47764.9	22.57	0.0000
ABC	370587.	130	2850.67	1.35	0.0129
RESIDUOS	1.06644E6	504	2115.96		
TOTAL (CORREGIDO)	4.14557E7	755			

### Anexo 3.10 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Tiempo (KM).

TIEMPO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	54	159.852	6.25975	X
14	54	233.111	6.25975	X
21	54	268.815	6.25975	X
28	54	289.259	6.25975	X
35	54	333.037	6.25975	X
42	54	359.926	6.25975	X
49	54	381.815	6.25975	X
56	54	420.222	6.25975	X
63	54	454.0	6.25975	X
70	54	473.63	6.25975	X
77	54	497.981	6.25975	X
84	54	525.111	6.25975	X
91	54	547.778	6.25975	X
98	54	552.593	6.25975	X

### Anexo 3.11 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Concentración de Sales (KM).

[ ] SALES	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100%	252	373.504	X
75%	252	392.897	X
50%	252	411.556	X

### Anexo 3.12 Prueba de Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos (KM).

CARBOHIDRATO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
GA	126	100.0	X
TE	126	198.317	X
SA	126	505.492	X
GL	126	508.524	X
FR	126	514.437	X
MA	126	529.143	X

### Anexo 3.13 Análisis de varianza para el ID por Medio KC.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	280718.	13	21593.7	46.45	0.0000
B:[ ] SALES	196674.	2	98336.8	211.53	0.0000
C:CARBOHIDRATO	5.27209E6	5	1.05442E6	2268.11	0.0000
INTERACCIONES					
AB	126906.	26	4881.01	10.50	0.0000
AC	793683.	65	12210.5	26.27	0.0000
BC	448677.	10	44867.7	96.51	0.0000
ABC	394467.	130	3034.36	6.53	0.0000
RESIDUOS	234304.	504	464.889		
TOTAL (CORREGIDO)	7.74752E6	755			

**Anexo 3.14** Prueba de Rangos Múltiples para ID por Tiempo (KC).

TIEMPO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	54	181.259	2.93412	X
14	54	194.444	2.93412	X
21	54	199.63	2.93412	X
28	54	201.185	2.93412	X
35	54	212.074	2.93412	X
42	54	220.296	2.93412	X
49	54	220.889	2.93412	X
56	54	226.593	2.93412	X
63	54	228.074	2.93412	XX
70	54	235.259	2.93412	XX
77	54	239.704	2.93412	X
84	54	242.0	2.93412	X
98	54	242.37	2.93412	X
91	54	242.37	2.93412	X

**Anexo 3.15** Prueba de Rangos Múltiples para ID por Concentración de Sales (KC).

[ ] SALES	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100%	252	200.73	X
75%	252	220.349	X
50%	252	240.238	X

**Anexo 3.16** Prueba de Rangos Múltiples para ID por Carbohidratos (KC).

CARBOHIDRATO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
GA	126	100.0	X
GL	126	199.683	X
TE	126	199.81	X
SA	126	200.0	X
FR	126	242.825	X
MA	126	380.317	X

**Anexo 3.17** Análisis de varianza para el porcentaje de plantas completas a los 98 días de cultivo.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:MEDIO	72142,9	2	36071,5	108,31	0,0000
B:CARBOHIDRATO	106570,	5	21314,0	64,00	0,0000
INTERACCIONES					
AB	49439,9	10	4943,99	14,85	0,0000
RESIDUOS	53951,6	162	333,034		
TOTAL (CORREGIDO)	294160,	179			

**Anexo 3.18** Prueba de Rangos Múltiples para el porcentaje de plantas completas a los 98 días de cultivo.

MEDIO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
KC	54	5,85185	2,48341	X
MS	54	35,1852	2,48341	X
KM	72	54,1667	2,15069	X