



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

Inducción de la germinación *in vitro* de
Epidendrum radicans Pav. ex Lindl

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
ANA BELÉN RODRÍGUEZ FARFÁN

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES

MÉXICO D. F.

NOVIEMBRE 2013

**Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la
Maestra en Ciencias Barbara 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.**

DEDICATORIAS

Dedico ésta tesis a mis padres y a mi hermana, personas extraordinarias de las que me siento orgullosa, quienes siempre han confiado en mí, a quienes agradezco también todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, el amor que siempre me han manifestado y su ayuda incondicional.

A David por apoyarme, ayudarme y motivarme a llegar al final de mi meta, eres una de las personas más importantes de mi vida y tu apoyo es parte importante de mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales por dirigir esta tesis y por permitirme trabajar en su laboratorio. No hay palabras para agradecerle todo su apoyo y ayuda incondicional, porque además de sus enseñanzas, encontré en usted comprensión, amistad y paciencia.

Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez[†], gracias por todo su apoyo, su amabilidad y confianza, por sus amenas pláticas, sus conocimientos, por haberme orientado acertadamente un gran número de veces.

Agradezco también a mis sinodales, por el tiempo y disposición dedicados al mejoramiento de este trabajo con sus comentarios acertados y conocimientos, por su trato siempre amable, sus consejos, por las valiosas aportaciones y por su apoyo y comprensión.

A todos mis maestros quienes me forjaron durante la carrera compartiendo sus conocimientos y vivencias.

A todos mis amigos, pues tuve la suerte de convivir **con** ellos, gracias por aceptarme como parte de su grupo me ayudaron, me apoyaron, acompañaron y brindaron su amistad, los estimo profundamente, gracias por **compartir** tristezas, alegrías sinsabores, hambre, dolor y cansancio y muchas satisfacciones, para mí son como una familia, quiero que sepan que los recuerdo y estimo a todos: Laura, César, Miguel, Natalie, Nandi, Ricardo, Fabian, Eliseo, Berenice, Bernardo, entre otros, a todos con todo mi cariño gracias.

Y gracias también a quienes no se encuentran escritos aquí, pero que con una palabra de aliento, un consejo, un abrazo sincero, me animaron e impulsaron a seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
Semillas de orquídeas	4
Germinación.....	5
Germinación <i>in vitro</i>	6
Germinación simbiótica <i>in vitro</i>	6
Germinación asimbiótica <i>in vitro</i>	7
Medios de cultivo.....	8
Medios nutritivos	9
Sales inorgánicas.....	9
Suplementos orgánicos	10
Complejos naturales.....	12
Materiales inertes de soporte	12
Fertilizantes orgánicos comerciales	13
Humus de lombriz.....	14
Genero <i>Epidendrum</i>	15
Descripción de <i>Epidendrum radicans</i> Pav. ex Lindl	17
Taxonomía.....	19
Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> del género <i>Epidendrum</i>	19
Justificación.....	21
Hipótesis	21
Objetivos	21

Objetivos generales	21
Objetivos particulares	21
Materiales y métodos	22
Material biológico.....	22
Medios de cultivo.....	22
Desinfestación y Siembra de semillas <i>in vitro</i>	23
Evaluación de la germinación.....	24
Evaluación del Índice de Desarrollo.....	24
Evaluación de estadíos a los 120 días de cultivo.....	25
Diseño estadístico	25
Resultados	27
Germinación de semillas de <i>Epidendrum radicans</i>	27
Desarrollo ontogénico	31
Índice de Desarrollo.....	40
Estadíos a los 120 días de cultivo	39
Discusión	46
Conclusiones	51
Recomendaciones	52
Bibliografía.....	53
Anexo 1.....	61
Medios nutritivos.....	61
Anexo 2 Resultados	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Hábitos de crecimiento de las orquídeas.	3
Figura 2.- Estadíos ontogénicos de <i>Laelia</i> sp.	5
Figura 3.- Distribución del género <i>Epidendrum</i>	16
Figura 4.- Flor de <i>Epidendrum radicans</i> Pav. ex Lindl.	17
Figura 5.- <i>Epidendrum radicans</i>	18
Figura 6.- Metodología general.	26
Figura 7.- Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de semillas de <i>Epidendrum radicans</i> en los doce tratamientos independientemente de los días de cultivo.	27
Figura 8.- Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de semillas de <i>Epidendrum radicans</i> en los días de cultivo independientemente de los doce tratamientos.	28
Figura 9.- Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de semillas de <i>Epidendrum radicans</i> en los 12 tratamientos.	30
Figura 10.- Semillas de <i>Epidendrum radicans</i> con embrión verde e hinchado.	32
Figura 11.- Embrión de <i>Epidendrum. radicans</i> rompiendo y emergiendo de la testa.	32
Figura 12a.- Embrión en forma de esférula de <i>Epidendrum radicans</i>	33
Figura 12b.- Protocormo con protuberancia apical.	33
Figura 13.- Protocormo de <i>Epidendrum radicans</i> con rizoides.	33
Figura 14.- Protocormo con primordio foliar de <i>Epidendrum radicans</i>	34
Figura 15.- Plántula con hojas de <i>Epidendrum radicans</i>	34
Figura 16.- Plántula con hojas y primera raíz de <i>Epidendrum radicans</i>	35
Figura 17.- Índice de desarrollo de <i>Epidendrum radicans</i> en los 12 medios de cultivo independientemente a los días de cultivo.	36
Figura 18.- Índice de desarrollo de <i>Epidendrum radicans</i> en los días de cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.	37

Figura 19.- Comportamiento del índice de desarrollo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Epidendrum radicans</i> en los doce medios de cultivo.	39
Figura 20.- Máximo estadio de desarrollo alcanzado en cada tratamiento utilizado para inducir la germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum radicans</i> después de 120 días de cultivo.	41
Figura 21.- Altura media de embriones hinchados o estadio 1 por tratamiento a los 120 días de cultivo de <i>Epidendrum radicans</i>	42
Figura 22.- Altura media de embriones rompiendo la testa o estadio 2 por tratamiento a los 120 días de cultivo de <i>Epidendrum radicans</i>	43
Figura 23.- Altura media de los protocormos o estadio 3 por tratamiento a los 120 días de cultivo de <i>Epidendrum radicans</i>	43
Figura 24.- Altura media de los protocormos con primordio foliar o estadio 4 por tratamiento a los 120 días de cultivo de <i>Epidendrum radicans</i>	44
Figura 25.- Altura media de las plántulas con hojas o estadio 5 por tratamiento a los 120 días de cultivo de <i>Epidendrum radicans</i>	44
Figura 26.- Altura media de las plántulas con hojas y raíz o estadio 6 por tratamiento a los 120 días de cultivo de <i>Epidendrum radicans</i>	45
 Cuadro 1.- Constituyentes orgánicos adicionados a los medios nutritivos para la germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum radicans</i>	22
Cuadro 2.- Tratamientos para la inducción de la germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum radicans</i>	23
Cuadro 3.- Porcentaje promedio de germinación de las semillas de <i>Epidendrum radicans</i> hasta los 35 días de cultivo	29
Cuadro 4.- Estadios ontogénicos registrados durante la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Epidendrum radicans</i>	31

RESUMEN

Epidendrum radicans es una orquídea nativa de México que ha sido poco estudiada en relación a su biología básica y en particular al proceso del desarrollo ontogénico del embrión durante la geminación hasta su formación en plántula. En el presente estudio se indujo la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de esta especie y durante 120 días de cultivo se describió la ontogenia del embrión durante su proceso de germinación. Asimismo se estableció su índice de desarrollo y se determinó al término del cultivo el máximo estadio ontogénico alcanzado. Se compararon 12 tratamientos, los cuales consistieron en la variación del medio nutritivo y la presencia de carbón activado (Ca) y peptona (P). Los medios nutritivos utilizados fueron dos con sales inorgánicas analíticas, Kao & Michayluk (KM) y Mitra (M), y dos con fertilizantes orgánicos comerciales, Superthrive® (S) y XIBANI® (H). Las semillas germinaron a partir de los catorce días de iniciado el cultivo en todos los tratamientos. El máximo porcentaje de germinación fue de 96% en el medio de cultivo S, con fertilizantes orgánicos. Durante el proceso de germinación se describieron seis estadios ontogénicos: 1. embrión hinchado de color verde y dentro de la testa, a los siete días, 2. embrión hinchado rompiendo la testa, a los 14 días de cultivo, ambos estadios presentes en todos los tratamientos, 3. protocormo, a los 14 días, en los tratamientos M+Ca, KM+Ca y KM+Ca+P, 4. protocormo con primordio foliar, a los 28 días, en los tratamientos KM+Ca y KM+Ca+P, 5. plántula con hoja, a los 42 días y 6. plántula con hojas y raíz, a los 56 días, ambos estadios en el tratamiento KM+Ca+P. El índice de desarrollo reflejó que más del 50% de las semillas, a los 7 días de cultivo, presentaron el estadio 1; más del 25%, a los 14 días, el estadio 2; sin embargo, a los 35 días de cultivo este estadio se estableció por completo; 98% de los embriones, a los 84 días, se diferenciaron en el estadio 3; al final del cultivo, el 80% de los protocormos desarrollados se diferenciaron en el estadio 4. El máximo estadio ontogénico alcanzado, al final del cultivo, fue el de plántula con hojas y raíz en la mayoría de los tratamientos, excepto en S, H y H+Ca; mientras que, en los tratamientos KM+Ca y H+Ca+P se diferenciaron más del 87% de plántulas. Se estableció así un protocolo de germinación asimbiótica *in vitro* para las semillas de *Epidendrum radicans*.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas están entre las plantas más especializadas del reino vegetal, ocupan un amplio rango de los hábitats ecológicos. Debido a que han desarrollado en sus estructuras reproductivas una alta totipotencialidad de sus células. Estos sistemas reproductivos difieren en gran medida en diferentes zonas de temperatura, clima, etc., las cuales permiten adaptarse y determinan su estrategia de supervivencia, lo cual explica su amplia área de distribución (Rasmussen, 1985, Dressler, 1993, Batygina *et al.* 2003).

La Orchidaceae es una de las más abundantes del mundo y la belleza de sus flores representa un gran potencial para la industria ornamental. La mayor diversidad de estas especies se encuentran en los bosques de neblina del trópico y subtrópico, siendo indicadoras de estabilidad de los ecosistemas (Rivera-Dueñas, 2002). Es una de las familias más numerosas entre las Monocotiledóneas, pertenece al orden Asparagales, y engloba 25 000 especies, divididas en 850 géneros e híbridos (Judd *et al.* 1999, Chase *et al.* 2003). Constituyen la tercera familia taxonómicamente más diversa en México, con cerca de 1 300 especies de las cuales el 40% son endémicas del país (Gernandt, 2007), y que se encuentran incluidas en 164 géneros (Hágsater *et al.* 2005).

La colecta de flores y plantas en la naturaleza debe ser detenida para mantener las poblaciones saludables y preservar estas plantas para el futuro (Halbinger & Soto, 1997). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) ubica 260 especies de orquídeas mexicanas en la lista de especies en riesgo de extinción (Soto y Hágsater, 1990). De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, 188 especies están catalogadas en algún estado de conservación, 15 están en peligro de extinción, 62 amenazadas, 110 sujetas a protección especial y una se encuentra extinta en la naturaleza (NOM-059-ECOL-2010).

La mayor diversidad de orquídeas mexicanas se encuentran entre los ambientes más amenazados por las actividades humanas (Gernandt, 2007). La deforestación ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas epífitas, las cuales, al ser tan especializadas en su ecología, se ven seriamente afectadas.

Las orquídeas además de crecer en los árboles, también crecen sobre el suelo (terrestres), sobre rocas (litofíticas), o humus (humidícolas) (Fig. 1).



Figura 1.- Hábitos de crecimiento de las orquídeas:
(a) litofíticas, (b) epífitas, (c) terrestres, (d) humidícolas o saprófitas (tomado de Romero-Tirado, 2008).

En México, todas las regiones situadas al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y las del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3 500 m sobre el nivel del mar en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas albergan la mayor riqueza de orquídeas, aunque todos los estados cuentan por lo menos con una especie (Sánchez-Saldaña, 2007).

Aunque el número de especies mexicanas es menor que el de otros países de América tropical (Colombia, Ecuador, Perú, Brasil), México cuenta con un conocimiento taxonómico más avanzado de sus especies. Soto (2005), señaló que existen 444 especies o subespecies endémicas, las cuales corresponden a 40% del total registrado en el país. Esta característica convierte a la orquideoflora mexicana, en una de las más ricas en endemismos entre los principales países de América tropical, quizá sólo superada por Brasil.

Soto (1993) asegura que las orquídeas se concentran generalmente en áreas muy específicas, que son importantes por la riqueza y diversidad de sus poblaciones o por sus endemismos. Se estima que en México existen seis áreas muy diversas, con menos de 100 000 ha cada una, localizadas en diferentes regiones florísticas del país, las cuales poseen el 50% del total de orquídeas registrado y que representan tan sólo 0.003% del territorio mexicano. Es importante identificar y conocer dichos centros y enfocar hacia ellos los planes de conservación.

Por otra parte, es necesario impulsar la propagación y el cultivo, especialmente de las especies que por ser de gran interés hortícola en la actualidad cuentan con escasas poblaciones, debido a la colecta inmoderada.

MARCO TEÓRICO

Semillas de orquídeas

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas, llegan a medir de 0.07 a 0.4 mm de ancho y 0.11 a 1.97 mm de largo incluyendo la testa (Rasmussen, 1995), son muy ligeras. Los frutos (cápsula) producen de 1 300 hasta cuatro millones de semillas (Pierik, 1990). La semilla consiste de un embrión suspendido de una estructura reticulada (la testa) y rodeado de un gran volumen de aire, lo que permite flotar por periodos largos.

En las orquídeas el embrión no está diferenciado como en la gran mayoría de los embriones vegetales (Dressler, 1981). Su forma es elipsoidal y en la epidermis y parénquima contiene reservas de lípidos y proteínas, sin embargo carece de almidón aunque se pueden encontrar algunas trazas (Arditti, 1992; Richardson *et al*, 1992; Barba *et al*, 2002). La germinación, en la naturaleza, solamente ocurre cuando la semilla se encuentra en un ambiente bajo condiciones favorables. Debe ser infectado por una micorriza, misma que abastece a las plántulas jóvenes con azúcares y nutrientes que requieren hasta que sean autótrofas (McKendrick, 2000).

Las orquídeas pueden presentar poliembrionía (dos o más embriones sexuales por semilla) o apomixis en algunas especies de forma natural (Arditti, 1992).

Cañas (1991), menciona que bajo condiciones naturales, las semillas de orquídeas son liberadas de sus cápsulas cuando éstas maduran y son llevadas por el viento, pudiendo germinar y crecer si eventualmente caen en un medio adecuado para la germinación. Sin embargo, dichas semillas tienen pocas posibilidades de sobrevivir, debido a que muchas de las especies de orquídeas sólo son capaces de germinar en presencia de un hongo simbiótico. Las semillas de orquídeas pueden germinar sobre troncos de árboles establecidos; no obstante, el porcentaje de germinación de las orquídeas en la naturaleza es del 10% y solo el 4% de este llega a ser adulto.

Germinación

La germinación de las orquídeas se define como los estadios secuenciales del proceso de desarrollo del protocormo, terminando cuando se forman las hojas y raíces (fig. 2). Para que ocurra la germinación, las semillas absorben agua (imbibición) a través de la testa lo que conlleva a un aumento de volumen del embrión, seguido por la división celular en la región anterior, provocando la ruptura de la testa, dando lugar a una estructura cónica o esférica llamada protocormo, en el cual se forma en la región apical una protuberancia llamada primordio foliar. Este es seguido por la formación de rizoides alrededor de la parte inferior del protocormo. A partir del primordio foliar se desarrollan las hojas fotosintéticas y en la parte basal del protocormo se forman las raíces, formando así una planta completa (Barba *et al.*, 2002).

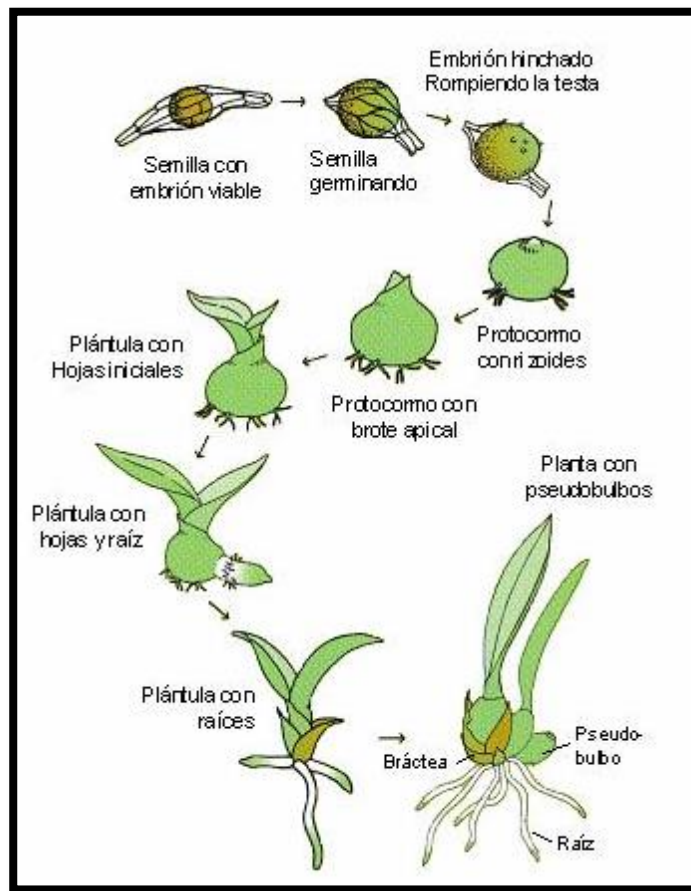


Figura 2.- Estadios ontogénicos de *Laelia* sp. según Seaton y Ramsay (2005)

Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie, hasta que alcance la edad apropiada para producir una planta completa. En el caso de orquídeas terrestres es de vital importancia que la relación orquídea-

hongo se conserve durante los estadios tempranos del ciclo de vida de la planta, ya que el protocormo enterrado no puede fabricar alimento por sí mismo. Por otro lado, los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento (McKendrick, 2000).

Germinación *in vitro*

Mediante la germinación *in vitro*, se colocan semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio nutritivo agarizado que contiene azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y se desarrollen en plantas (McKendrick, 2000).

Las semillas cuando son cultivadas *in vitro* pasan por los mismos estadios, pero necesitan de una adecuada fuente externa de carbohidratos para que puedan continuar su desarrollo, pues las reservas que poseen no son suficientes (Harrison & Arditti, 1978). La incapacidad de la semilla para utilizar sus reservas lipídicas y convertirlas en carbohidratos explica porque requiere de esta provisión exógena de carbohidratos durante la germinación.

Se ha encontrado que el rango de germinación *in vitro* de las orquídeas está entre siete y 235 días después de haberlas colocado en un medio de cultivo y la obtención de plántulas tarda entre los 50 y 724 días (Arditti, 1992).

Los dos tipos básicos de germinación *in vitro* son el simbiótico y asimbiótico (McKendrick, 2000).

Germinación simbiótica *in vitro*

Las semillas de las orquídeas al no poseer reservas, establecen una relación simbiótica con un hongo, la simbiosis es de tipo endofítico. La finalidad de la simbiosis es que el hongo proporcione los azúcares necesarios para la germinación, principalmente durante el desarrollo del protocormo que es el estado intermedio entre el embrión indiferenciado y la plántula (Withner y Krieger, 1985; Richardson *et al*, 1992).

En zonas tropicales predominan las orquídeas fotosintéticas, las cuales son micoheterotróficas durante los primeros estadios de desarrollo y algunas podrían ser mixotróficas en estado adulto, ya que parte del carbono que requieren lo suplen de sus hongos micorrízicos (Dearnaley, 2007).

La micorriza orquidioide se caracteriza porque la mayoría de los hongos que participan en esta asociación son miembros del género-forma *Rhizoctonia*. En las células corticales de las raíces el hongo origina una estructura denominada

‘pelotón’ que es un enrollamiento hifal, el cual es degradado por la planta para obtener nutrientes (Hadley y Williamson, 1972). En muchos casos las orquídeas llegan a formar una relación tan dependiente del hongo que se considera que la planta parasita al hongo; sin embargo, el costo energético de esta interacción puede ser poco importante para el hongo (McKendrick, 2000; Sanders, 2003).

En la germinación simbiótica *in vitro* las semillas se siembran con una pequeña porción de la micorriza apropiada. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que éste produzca hojas y se vuelva autotrófico. Esta técnica tiene la ventaja de usar un medio simple (uno de los más comúnmente usados consiste en avena en polvo con una pequeña cantidad de extracto de levadura) y como resultado las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente. Sin embargo, la desventaja es que, se necesita seleccionar el tipo de micorriza adecuado para que se origine la simbiosis y prevenir el parasitismo y la consecuente muerte de las semillas. (McKendrick, 2000).

La germinación está directamente relacionada con la simbiosis orquídea-micorriza; sin embargo, la simbiosis del hongo micorrízico con las orquídeas no ha sido completamente estudiada. En Costa Rica se estudió la actividad micorrízica con semillas de 24 especies de orquídeas epífitas y terrestres nativas, encontrando que todos los individuos de las especies terrestres fueron micorrizados y que sólo algunos de los individuos de las plantas epífitas tenían micorriza (Rivas *et al*, 1998).

Yoder y colaboradores (2000) enfatizaron la importancia de la micorriza, ya que, se encarga de transportar agua además de tener la función de nutrir al embrión.

Germinación asimbiótica *in vitro*

Lewis Knudson (1922) estableció un método, completamente controlado, estandarizado y simple, para la germinación de semillas de orquídea, el cultivo asimbiótico; demostró que, a través del cultivo asimbiótico *in vitro* de las orquídeas de los géneros *Cattleya*, *Laelia* y *Epidendrum*, germinaban fácilmente en ausencia del hongo al ser cultivadas sobre el medio de cultivo Pfeffer modificado (solución B) que después se le conocería con el nombre de Knudson “B”; posteriormente, realiza modificaciones al medio Knudson “B”, adicionando nuevos componentes y manteniendo la sacarosa como carbohidrato. A este medio de cultivo modificado le llamó Knudson “C” y en la actualidad es ampliamente utilizado de forma

generalizada para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas *in vitro* (Arditti, 1972).

La germinación asimbiótica es usualmente utilizada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes en zonas templadas.

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar la germinación. Esta metodología se ha utilizado principalmente para especies e híbridos de interés comercial. Una de las ventajas de la germinación asimbiótica *in vitro*, es la de reproducir miles de plantas en un medio artificial controlado, el cual se puede modificar de acuerdo a las necesidades particulares de cada especie.

La utilización de semillas para la propagación masiva de orquídeas es conveniente debido a varios factores; ya que, generalmente son escasas las fuentes de inóculos somáticos de orquídeas para su cultivo *in vitro*, más aún en aquellas en peligro de extinción; también, la gran variabilidad genética que nos proporciona la reproducción sexual es de suma importancia para recuperar poblaciones y no individuos idénticos como con la clonación (De la Cruz-Rodríguez, 2006).

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

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 de 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. 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 metabólicos (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 iodo 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 *et al* (1976), que incluyen altas concentraciones de macronutrientes, como el nitrógeno en forma de NH_4 , NO_3 y KNO_3 ; a diferencia, de la fórmula de Knudson C (1946) empleada principalmente para orquídeas.

Suplementos orgánicos

Hurtado y Merino (1988) menciona que se pueden clasificar los suplementos orgánicos en tres grupos: vitaminas, carbohidratos y reguladores del crecimiento vegetal.

Miller y Erston (2010), señalan que las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, equiparando a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo.

Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario adicionar al medio de cultivo algunas vitaminas hasta que los cultivos prosperen. Las vitaminas que favorecen el desarrollo de cultivos *in vitro* y que se adicionan rutinariamente a mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico (B3) (Krikorian, 1991). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico (B5), biotina (B8), riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico (B9).

Miller y Erston (2010) mencionan que la tiamina (B1), es un componente esencial en la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Por eso, sin esta vitamina las células vivas no pueden realizar sus funciones vitales. En las plantas las hojas son las responsables de la producción de tiamina.

La piridoxina también conocida como vitamina B6, es importante para el metabolismo de los aminoácidos, desarrolla una función como antioxidante.

La niacina o ácido nicotínico (B3) actúa directo en la fisiología de los tallos, ya que es un componente de las coenzimas NAD y NADP (portadoras de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación) donde aparece como niacinamida. Durante la germinación de embriones de orquídeas y el desarrollo de plántulas jóvenes se obtienen respuestas favorables con el suministro exógeno de la niacina.

La biotina (B8) está asociada con los ácidos grasos del metabolismo, siendo sintetizada por las plántulas, hojas y varios tipos de tejidos en la planta. La biotina es transportada por las hojas a las raíces donde ahí es excretada. La biotina ha sido empleada en cultivo de semillas con varios resultados.

La riboflavina (B2), es necesaria para el crecimiento de las raíces y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radicular. Una gran cantidad de auxina inhibe el crecimiento de la raíz. Como todas las otras vitaminas B hidrosolubles, la riboflavina es sintetizada por las plantas, sobre todo en la germinación. En el cultivo de plántulas de orquídeas la riboflavina parece no estimular la germinación. Sin embargo, potencializa la diferenciación de las plantas ya en un estadio con hojas y puede promover el crecimiento embrionario.

El ácido fólico está ampliamente distribuido en las plantas. Algunos embriones pierden el ácido fólico con la maduración y lo sintetizan cuando ya han germinado, otros pueden perderlo durante la germinación. Cuando se usa en el cultivo de plántulas de orquídeas, el ácido fólico, en su mayoría no ha tenido efecto, sin embargo, en algunos casos se ha encontrado que estimula la germinación.

El ácido ascórbico (vitamina C), interviene en los sistemas de oxidación-reducción. Como la mayoría de las vitaminas, se ha comprobado su capacidad para mejorar la germinación de semillas de orquídeas y desarrollo de la plántula. En plantas, el ácido ascórbico es sintetizado por la glucosa o galactosa.

Debido a que las células cultivadas *in vitro* son generalmente heterotróficas respecto de la fuente de carbono, se deben agregar azúcares al medio de cultivo. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. La sacarosa, constituye la fuente más utilizada. Otros azúcares capaces de sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos son glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa. Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledoneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies.

Varios investigadores (Ertola *et al.*, 1994) han estudiado la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento y la producción, y han observado que el nivel de azúcar puede influenciar a ambos pero no siempre es previsible su efecto. En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos.

Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean otros aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos (Hurtado y Merino, 1988).

Miller y Erston (2010) manifiestan que entre los hexitoles, el inositol tiene un efecto estimulante muy significativo, está involucrado en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas. El inositol ha sido clasificado como un factor de crecimiento, hormona y vitamina. También es conocido como myo-inositol, meso-inositol o i-inositol. El papel del inositol en el cultivo de orquídeas es poco conocido; ha sido usado como un suplemento en el cultivo de plántulas de orquídeas y se ha reportado que no tiene efectos en cultivos de *Cattleya*, *Epidendrum tampense* y *Goodyera repens*, aunque ha sido reportado como estimulador en la germinación de semillas de *Cattleya* (Hicks, 2000).

Complejos naturales

Además de los compuestos anteriores, se utilizan también suplementos orgánicos que principalmente son ricos en carbohidratos, entre otros. Los principales son: el hidrolizado protéico de caseína, lactoalbúmina, peptona y triptona que se emplean principalmente como fuente de aminoácidos. El jugo de naranja contribuye con el ácido cítrico, así como con otros estimulantes del crecimiento, no identificados. La pulpa de plátano y la emulsión de pescado se usan principalmente en los medios para cultivo de orquídeas, mientras que el endospermo de coco, extracto de malta y extracto de levadura, jugo de tomate tienen un uso más general. La pulpa de plátano puede aumentar el crecimiento de las plántulas de orquídeas. Dependiendo del medio, el homogenizado puede ser de frutos verdes, maduros o intermedios (Muñoz-Barrionuevo, 2011).

Materiales inertes de soporte

Hurtado y Merino (1988), 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.

Fertilizantes orgánicos comerciales

Los elementos esenciales para el desarrollo y metabolismo de las plantas son aquellos necesarios para que la planta pueda completar su ciclo de vida por ser constituyentes de alguna sustancia esencial o por participar en funciones vitales para la planta. Estos elementos se pueden clasificar en macro y microelementos de acuerdo a las cantidades necesarias para las plantas de cada uno de ellos (Domínguez, 1989).

Dentro de los macroelementos se tienen al carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) que son absorbidos por las plantas a través dióxido de carbono (CO_2) del aire o bien del agua (H_2O); y al nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca) y magnesio (Mg) (Domínguez, 1989). En los microelementos se incluyen al hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), boro (Bo) y cloro (Cl).

Con el fin de imitar la asimilación de nutrimentos en la naturaleza por parte de las orquídeas, al cultivarlas es necesaria la utilización de una fuente nutritiva artificial, como es el caso de los fertilizantes (Romero-Tirado, 2008).

Los fertilizantes pueden ser orgánicos (derivados de plantas y animales), o inorgánicos (derivados de minerales) (Mc Donald, 1999). Los fertilizantes orgánicos permiten aprovechar los residuos orgánicos, así como recuperar la materia orgánica del suelo y permiten la fijación de carbono, también mejoran la capacidad de absorber el agua. Los fertilizantes inorgánicos pueden contener al menos uno de los tres elementos principales o macroelementos (N, P, K), pudiendo contener además otros elementos como Mg, Bo, Zn, Fe. Los que contienen solo uno de los elementos se clasifican como simples y los que tienen dos o más, como compuestos (García y Cuevas, 2000).

El contenido nutrimental de los fertilizantes comerciales indica los porcentajes de N, P y K, de igual forma en caso de estar presentes en el fertilizante, se indican las cantidades de micronutrimentos, que también son necesarios para un crecimiento saludable y floración, pero la planta los asimila en mucho menor proporción (Mc Donald, 1999).

Los fertilizantes pueden encontrarse en presentaciones sólidas, líquidas y gaseosas (García & Cuevas, 2000).

En la naturaleza las orquídeas obtienen sus nutrimentos de forma muy diluida, por lo cual resulta conveniente llevar a cabo su fertilización una vez por semana con la mitad de la concentración del fertilizante recomendada para otro

tipo de cultivos (Mc Donald, 1999). Cabe mencionar que la aplicación del fertilizante depende de la especie y del estado de desarrollo del ejemplar (Espinosa, 1997). La aparición de un nuevo brote o el desarrollo de sus estructuras, señala usualmente la capacidad de absorber humedad y nutrientes disueltos a través del sistema radical, con un aumento de la asimilación de éstos conforme la planta crece. El período de máxima asimilación se da cuando el nuevo crecimiento está aparentemente cercano a la madurez. En esta etapa se puede incrementar hasta en 33% el tamaño del nuevo brote y se determina el número y calidad de flores (Rentoul, 1987)

El balance nutrimental que se elija dependerá del sustrato en que estén sembradas. Las que crecen en corteza necesitan más nitrógeno que fósforo y potasio, porque la corteza es descompuesta por bacterias, las cuales asimilan una gran cantidad de nitrógeno durante el proceso y dejan muy poco disponible para las orquídeas. Para plantas que crecen sobre materiales relativamente estables como la fibra de helecho arborescente es conveniente utilizar un balance nutrimental equilibrado (Espinosa, 1997; Mc Donald, 1999).

El balance nitrógeno-potasio es importante, así altas concentraciones de N y bajas de K favorece el crecimiento vegetativo; bajos niveles de N y altos de K promueve el crecimiento reproductivo (Baker & Baker, 1998). Para estimular la floración cuando las plantas completan su crecimiento vegetativo, muchos cultivadores utilizan fertilizantes bajos en nitrógeno y altos en fósforo (Mc Donald, 1999).

Sessler (1978) recomendó utilizar para los géneros *Cattleya*, *Epidendrum* y *Laelia* balances de 20-10-10, 20-20-20 (N-P-K), y 10-30-20 para la inducción de yemas florales y floración, mientras que para plantas que crecen sobre corteza es ideal el balance alto en nitrógeno 30-10-10.

Humus de lombriz

El humus es materia orgánica, de consistencia sólida, elaborada a partir de los residuos o deyecciones de micro o macroorganismos, y es una parte fundamental del suelo (Casco & Iglesias, 2005).

El lixiviado de humus de lombriz es el producto resultante de la transformación digestiva en forma de excretas de este anélido sobre la materia orgánica que consume. Aunque como abono orgánico puede decirse que tiene un excelente valor en macro nutrientes, también habría que mencionar la gama de compuestos orgánicos presentes en él, su disponibilidad en el consumo por las plantas, su resistencia a la fijación y al lavado (Casco & Iglesias, 2005).

Para obtener el lixiviado de humus de lombriz se utiliza como base estiércol de rumiantes, celulosa, frutas en descomposición y agua, lo que permite que el sustrato pueda ser asimilado por las lombrices y decante los nutrientes en una suspensión. El humus actúa como potenciador de la asimilación. El lixiviado obtenido de estiércol de ovinos utilizado como alimento para las lombrices ha demostrado ser una excelente fuente de potasio y nitrógeno conteniendo además hierro, manganeso, cobre y zinc (Casco & Iglesias, 2005).

Además, los fertilizantes líquidos elaborados con extracto de humus de lombriz de tierra aportan ácidos húmicos y fúlvicos, microorganismos vivos propios para la nitrificación y solubilización de minerales del suelo. Aplicado al suelo o a la planta hace asimilables en todo su espectro a los macro y micronutrientes y evitan la concentración de sales. Crea además un medio ideal para la proliferación de organismos benéficos, bacterias, hongos, etc., que impiden el desarrollo de patógenos, reduciendo sensiblemente el riesgo en el desarrollo de enfermedades. Además, estimula la humificación propia del suelo ya que incorpora y descompone los residuos vegetales presentes en el suelo (Casco & Iglesias, 2005).

Género *Epidendrum*

El nombre *Epidendrum* proviene del griego *epi* (sobre) y *dendron* (árbol), en referencia al hábito epífita de las primeras especies descritas (Pridgeon *et al*, 2006).

Epidendrum es uno de los géneros que tienen mayor número de especies dentro de la Orchidaceae (Sánchez-Saldaña, 2007).

Con una distribución Neotropical el género (Fig. 2) cuenta con 1 500 especies; distribuidas desde el Sureste de Estados Unidos (Carolina del Norte) hasta el Norte de Argentina (Pridgeon *et al*, 2006).

El mayor número de especies del género *Epidendrum* se localiza en Sudamérica y en especial en los Andes. Algunos de los grupos más claramente distinguibles se presentan en Centroamérica y especialmente en Costa Rica y Panamá. Se distribuye desde los páramos de alta montaña, pasando por todos los tipos de vegetación, es decir desde los 0 hasta los 4 000 m, pero la mayor diversidad de especies se encuentra en los bosques de neblina y mesófilo de montaña entre los 1 000 y 3 000 m de altitud (García-Cruz y Sánchez, 1999).

En la República Mexicana este género se distribuye principalmente en los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Michoacán. En el norte se localiza en Durango, Sinaloa, San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas; en la zona centro se encuentra en Morelos, Puebla, Querétaro, Hidalgo, y México, al sur

en Tabasco, y en la Península de Yucatán. Se estima que existen actualmente alrededor de 120 especies reportadas para México (Sánchez-Saldaña, 2007).



Figura 3.- Distribución del género *Epidendrum* (Pridgeon *et al*, 2006).

Las especies de *Epidendrum* se ubican en los bosques de América tropical, algunas son encontradas en áreas donde no hay árboles tal como en dunas de arena, matorrales y páramos.

Muchas especies de *Epidendrum* son enteramente terrestres, encontradas en vegetación abierta en los páramos Andinos y en vegetación tepui, a veces sobre tierra plana o postradas en arbustos.

Varias especies del complejo de *Epidendrum secundum* tienen hábito rastrero (maleza) ocupando áreas abiertas como orillas de lagos, laderas empinadas sin vegetación después de deslizamientos de tierra, cortes de carretera, y dunas de arena, *Epidendrum radicans* es común en las carreteras de América Central como maleza.

La mayoría de especies de *Epidendrum* son epífitas y litofíticas, y se han adaptado a casi todos los biotopos de bosques Neotropicales. Muchas especies epífitas de *Epidendrum* se encuentran en el humus de ramas y hojas su biomasa frecuentemente se concentra en el sistema radical, y en ocasiones los tallos pueden requerir hasta tres años para alcanzar la madurez y producir flores (Pridgeon *et al*, 2006).

En contraste, algunas especies son encontradas en contrafuertes de madera en ambientes oscuros y húmedos del sotobosque. Estas especies son generalmente pequeñas, epífitas de corteza con tejidos para el almacenamiento de agua. Sus raíces tienen una fuerte orientación plagiotrópica, y su floración es lentamente sucesiva, usualmente con una flor en antesis a la vez. El racimo cesa

el desarrollo si la flor es polinizada, probablemente como respuesta para la maximización de recursos, como una adaptación a condiciones de oscuridad. (Pridgeon *et al*, 2006).

Descripción de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl.



Figura 4.- Flor de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl.
Foto tomada por: Luna-Rosales. B.

Epidendrum radicans es una planta herbácea terrestre, generalmente litofítica, llega a medir hasta 1.5 m de largo. Es de tallo cilíndrico, recto de 19 a 125 cm de largo y 3.5 a 8 mm de diámetro. Ramas erectas a trepadoras. Hojas alternas, ovado-elípticas, cortamente mucronadas en el ápice, de 2 a 9 cm de largo y 1.2 a 2.5 cm de ancho, gruesas, coriáceas, base abrazadora, a veces algo purpúreas. Inflorescencia en racimos de hasta 60 cm de largo, a veces ramificados, sobre largos pedúnculos. Flores con brácteas pequeñas, triangulares, caducas en la base, grandes y vistosas. Pétalos de color rojo-anaranjado con la punta algo amarillenta. Sépalos parecidos a los pétalos, el labelo modificado, con la parte basal angosta y unida a la columna, el ápice del labelo ensanchado abruptamente formando 3 lóbulos con el margen desgarrado la columna algo encorvada y dilatada hacia el ápice. Las cápsulas son elipsoides, acostilladas, de 4.2 a 4.4 cm de largo y 15 a 21 mm de diámetro. Las raíces son largas y carnosas, aéreas que salen de los tallos (Fig. 4)

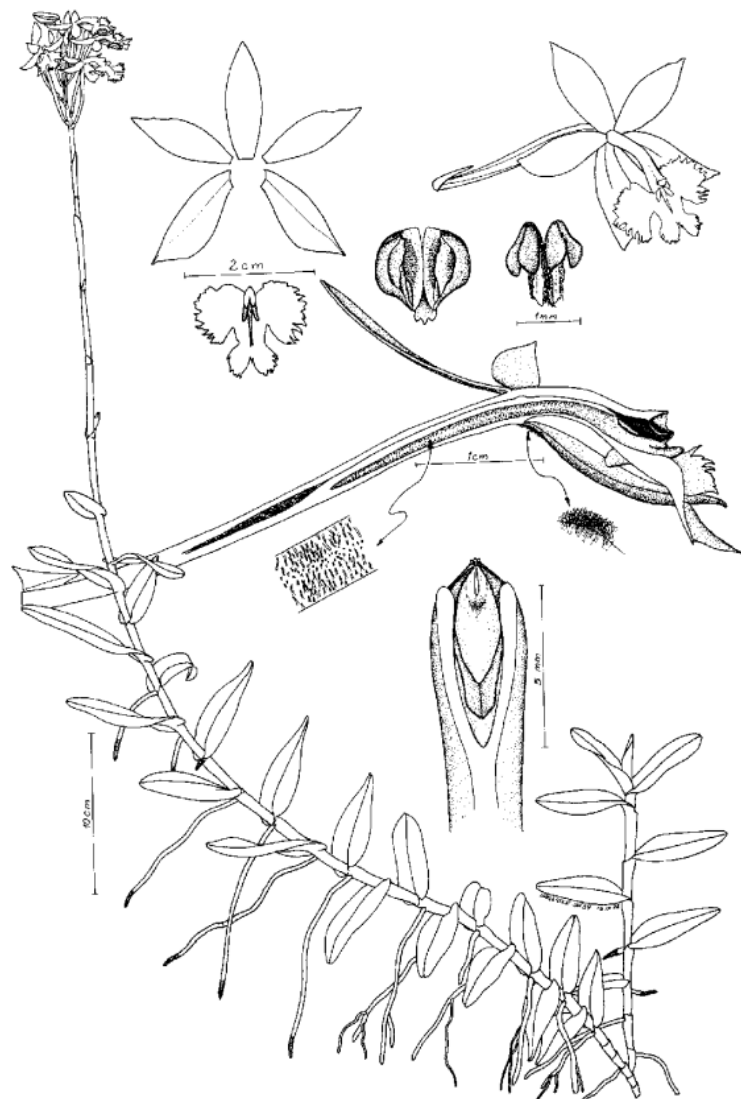


Figura 5.- *Epidendrum radicans* (tomado de E. Hágsater en ICONES ORCHIDACEARUM, ORCHIDS OF MEXICO, lámina 040).

Esta especie es nativa de México por lo que se distribuye en los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Tabasco, en Centroamérica hasta Panamá, crece en los bosques mesófilos de montaña, bosques de encino, selva subperennifolia, vegetación riparia y matorral perennifolio (García-Cruz y Sánchez, 1999). Su distribución altitudinal es de los 900 a los 1880 m (Solano, 1999). Se le encuentra floreciendo en los meses de septiembre a febrero y la fructificación se prolonga hasta junio (Solano, 1999).

Taxonomía

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae I

Subtribu: Laeliinae

Género: *Epidendrum*

Especie: *Epidendrum radicans* Pav.ex Lindl.

Sinónimos: *Epidendrum rhizophorum* Bateman

Epidendrum pratense Rchb. F.

Germinación asimbiótica *in vitro* del género *Epidendrum*

Potisek y colaboradores (1994) observaron el comportamiento de la germinación de semillas inmaduras *in vitro* de *Epidendrum stamfordianum* en el medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con 40 gL⁻¹ de sacarosa y 10 gL⁻¹ de agar. El primer estadio de germinación o semilla hinchada sucedió a los 27 días después de la siembra. Se obtuvo 100% de germinación.

Pedroza-Manrique (2009) realizó la germinación de semillas de cápsulas maduras de *Epidendrum elongatum* en el medio de cultivo MS enriquecido con 3% de sacarosa, 0.1 gL⁻¹ de myo-inositol, 10 gL⁻¹ de fécula de maíz y 3 gL⁻¹ de agar obteniendo protocormos de 2.5 mm de diámetro a las 30 semanas después de la siembra y al ser subcultivados al medio MS adicionado con 0.5% ó 1% de carbón activado más 0.5 mgL⁻¹ de AIA se obtuvo la mayor tasa de desarrollo de las plantas.

Hossain (2008) realizó la germinación *in vitro* y el desarrollo de plántulas de *Epidendrum ibaguense* Kunth, utilizando los medios de cultivo: MS, Phytamax (PM), Mitra (M) y Knudson C (KC) y evaluó la geminación de semillas y el desarrollo de los protocormos. Por otra parte, estudió también el efecto de la peptona, carbón activado y reguladores del crecimiento vegetal (BAP, 2,4-D). Obtuvo el 90% de germinación en el medio M (en la 6ª y 7ª semana) y en el medio PM (en la 7ª y 8ª semana), ambos adicionados con 2 gL⁻¹ de peptona.

Muñoz-Barrionuevo (2011) logró acelerar la germinación de *Epidendrum jameisonic* utilizando semillas de cápsulas maduras en el medio de cultivo MS al 100% y adicionado con 8 gL⁻¹ de carbón activado y 150 gL⁻¹ de pulpa de plátano, obteniendo 29% de la presencia de protocormos a los 90 días, 34% a los 120 días y 64% a los 150 días.

JUSTIFICACIÓN

Una de las familias vegetales más numerosa y de gran relevancia en México es la Orchidaceae, a pesar de ser un grupo importante desde el punto de vista biológico, ecológico, económico, entre otros, el estudio en relación a su biología básica y al proceso de germinación asimbiótico *in vitro* de muchas especies es escaso. Tal es el caso del género *Epidendrum* y en particular de la especie *radicans*, nativa de México. Por lo anterior, este estudio pretendió generar conocimiento acerca del proceso de germinación asimbiótica *in vitro* de *E. radicans* al comparar diferentes medios de cultivo, así como establecer el desarrollo ontogénico durante este proceso y establecer el máximo estadio de desarrollo alcanzado a lo largo de 120 días de cultivo.

HIPÓTESIS

Las semillas de *Epidendrum stamfordianum*, *E. elongatum*, *E. ibaguense* y *E. jameisonic* invierten desde 27 hasta 150 días dependiendo del medio de cultivo utilizado, bajo condiciones *in vitro*, para alcanzar el estadio de embrión hinchado durante el proceso de germinación, por lo que se espera que las semillas de *E. radicans* germinen en un rango de tiempo menor o similar empleando medios de cultivo con sales basales analíticas o con fertilizantes orgánicos comerciales.

OBJETIVO GENERAL

- Inducir la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Epidendrum radicans*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de los medios nutritivos con sales inorgánicas analíticas y con fertilizantes orgánicos comerciales sobre la germinación *in vitro* de *E. radicans*.
- Comparar el efecto del carbón activado y peptona como constituyentes orgánicos en los medios de cultivo para promover la germinación asimbiótica de *Epidendrum radicans*.
- Establecer el medio de cultivo más adecuado para la germinación de *Epidendrum radicans*.
- Describir la ontogenia del embrión de las semillas durante la germinación de *Epidendrum radicans*.
- Establecer el máximo estadio de desarrollo alcanzado en los diferentes medios de cultivo empleados para inducir la germinación asimbiótica a los 120 días de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

El material biológico consistió de semillas obtenidas a partir de cápsulas maduras cerradas de *Epidendrum radicans*.

Medios de cultivo

Se utilizaron cuatro medios nutritivos, dos con las sales inorgánicas analíticas del medio Kao & Mychayluk (KM) y del medio Mitra (M), y dos con fertilizantes orgánicos comerciales, uno fue el Superthrive® (S) y el otro el XIBANI® un Ácido Húmico y Fúlvico (lombrihumus) (H) (Anexo 1a).

Cada uno de estos medios nutritivos fueron adicionados con vitaminas, a excepción del Superthrive®, con myo-inositol y sacarosa como constituyentes orgánicos (cuadro 1).

Cuadro 1.- Constituyentes orgánicos adicionados a los medios nutritivos para la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

	KM	M	S	H
Constituyentes Orgánicos	mgL⁻¹			
Vitaminas				
Tiamina HCl (B1)	0.4	0.3	-	0.4
Niacina	0.5	1.25	-	0.5
Riboflavina	-	0.05	-	-
Biotina	-	0.05	-	-
Piridoxina HCl (B6)	0.1	0.3	-	0.1
Myo-Inositol	100	100	100	100
Sacarosa	30 000	20 000	30 000	30 000

Se adicionó carbón activado (Ca) y peptona (P), como constituyentes orgánicos, en algunos de los medios, para establecer un total de 12 medios de cultivo como tratamientos (Cuadro 2) con 10 repeticiones cada uno.

Cuadro 2.- Tratamientos para la inducción de la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

Tratamiento	Medios de cultivo
T1	S
T2	S + Ca
T3	S + Ca + P
T4	M
T5	M + Ca
T6	M + Ca + P
T7	KM
T8	KM + Ca
T9	KM + Ca + P
T10	H
T11	H + Ca
T12	H + Ca + P

(S= Superthrive[®], M=Mitra, H=Humus, Ca=carbón activado; P=peptona)

Los tratamientos con Ca y P fueron adicionados con 2 gL⁻¹. Todos los medios de cultivo fueron semisólidos, se utilizó agar gel como agente gelificante (5 gL⁻¹). El pH se ajustó a 5.7 y fueron esterilizados en autoclave a 1.5 atm de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Desinfestación y Siembra de semillas *in vitro*.

Las semillas se extrajeron de la cápsula madura bajo condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar; previo a esto se lavó la cápsula cepillándola con jabón y enjuagándola al chorro de agua corriente, posteriormente se colocó dentro de un vaso de precipitados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% de cloro disponible y adicionado con una gota de jabón líquido, colocándolo dentro la campana de flujo laminar. Se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos, posteriormente se decantó la solución de cloro y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos de la solución; a continuación se sumergió en etanol al 70% y con ayuda de una pinza se retiró y se incendió hasta que se consumió el alcohol, posteriormente, se colocó sobre una caja Petri estéril para realizar un corte longitudinal con ayuda de un bisturí previamente esterilizado, quedando dos secciones de la cápsula con las semillas expuestas. Cada una de las secciones se tomó con ayuda de unas pinzas de disección estériles para distribuir las semillas del interior de la cápsula dentro

de los frascos con medio de cultivo de cada uno de los tratamientos. Para cada repetición se colocaron aproximadamente 100 semillas.

Los recipientes de cultivo con semillas se colocaron en condiciones de incubación bajo una intensidad luminosa de 2 focos (322.9 lux focos Phillips® F96T8 de 59 watts) con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

Evaluación de la germinación

Para evaluar la germinación de *Epidendrum radicans* se registró cada semana durante 120 días, en cada una de las repeticiones por tratamiento, el porcentaje de semillas que presentaran el embrión hinchado con rompimiento de la testa (fig. 2), y se consideró este estadio como el inicio de la germinación de semillas.

Evaluación del Índice de Desarrollo

Los cambios ontogénicos del embrión de las semillas de *E. radicans*, durante el proceso de la germinación, fueron registrados en cada una de las repeticiones por tratamiento cada siete días durante cuatro meses para establecer la ontogenia del embrión durante su germinación; así como, para calcular el índice de desarrollo o I.D. considerando seis 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:

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

Donde:

x = Valor del estadio ontogénico

e_x = Número de individuos registrados en ese estadio ontogénico

e = Total de individuos en la muestra

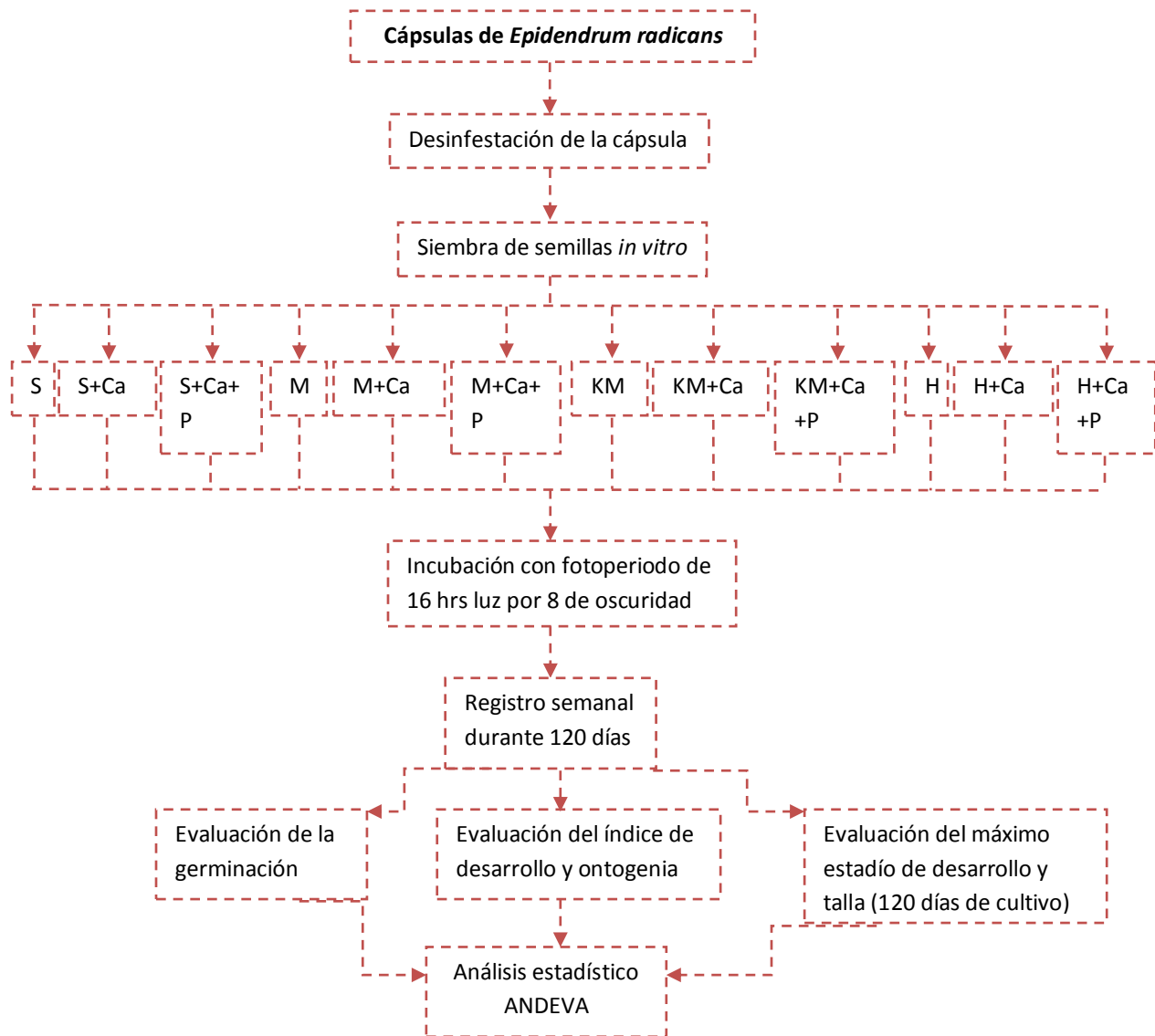
Evaluación de estadíos a los 120 días de cultivo.

Para establecer el máximo estadío de desarrollo alcanzado (plántula con hojas y raíz) en los diferentes tratamientos, en la inducción de la germinación *in vitro* de *E. radicans*, a los cuatro meses de cultivo de las semillas se seleccionó al azar una repetición de cada tratamiento y se determinó el porcentaje de cada uno de los estadios ontogénicos presentes a partir del embrión hinchado, considerando el total de individuos como el 100%. Se midió la altura de aquellos estadios presentes para cada tratamiento.

Diseño estadístico

A los datos obtenidos del porcentaje de germinación, del índice de desarrollo durante la germinación de semillas, del estadío de desarrollo más avanzado y de las tallas de cada uno de los estadíos presentes a los cuatro meses se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa estadístico computarizado Statgraphics Plus 5.0, para conocer si existieron diferencias significativas entre los tratamientos empleados durante el tiempo de cultivo.

Figura 6.- Metodología general



RESULTADOS

Germinación de semillas de *Epidendrum radicans*

Durante la germinación de las semillas de *E. radicans* existieron diferencias significativas (p -valor= 0.0) entre los tratamientos y entre los días de cultivo y no existieron diferencias significativas (p -valor= 0.4693) en sus interacciones (Anexo 2, Cuadro 1).

Al comparar las medias de los porcentajes de germinación obtenidos en cada uno de los tratamientos, independientemente de los días de cultivo, se comprobó que fueron diferentes estadísticamente entre sí. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento T6 con el medio de cultivo Mitra, adicionado con carbón activado y peptona, donde las semillas alcanzaron el 87% de germinación; mientras que, el menor porcentaje obtenido fue en el tratamiento T10 que corresponde al medio nutritivo con el fertilizante orgánico comercial con Humus, donde alcanzaron 38% de germinación (Fig. 7) (Cuadro 2, Anexo 2).

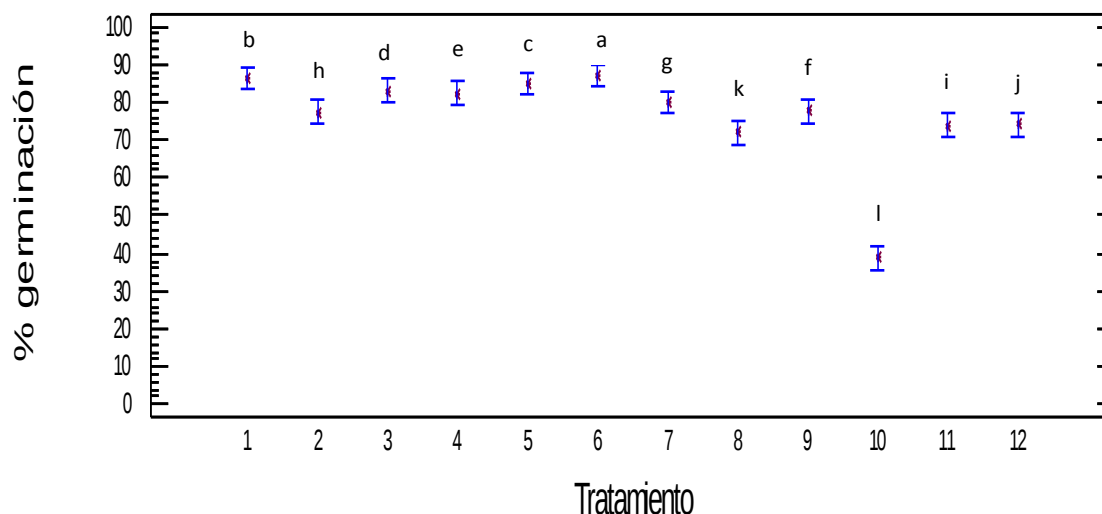


Figura 7.- Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Epidendrum radicans* en los doce tratamientos independientemente de los días de cultivo.

(1=S, 2=S+Ca, 3=S+Ca+P, 4=M, 5=M+Ca, 6=M+Ca+P, 7=KM, 8=KM+Ca, 9=KM+Ca+P, 10=H, 11=H+Ca, 12=H+Ca+P) (Ca=carbón activado; P=peptona)

Con respecto al tiempo de cultivo, independientemente de los tratamientos, al comparar las medias de los porcentajes de germinación obtenidos en cada uno de los días de cultivo se comprobó, que a partir de los 7 días de cultivo y hasta los 35, los porcentajes de germinación se incrementaron, resultando diferentes estadísticamente entre sí y mayores a los obtenidos durante menos días de cultivo. Estadísticamente, a partir de los 35 días de cultivo las semillas alcanzaron

el mayor porcentaje promedio de germinación con 83% y se mantuvo hasta el fin de la evaluación, a los 120 días, sin existir diferencias significativas entre estos tiempos (Fig. 8) (Anexo 2, Cuadro 3).

La germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas de *E. radicans* se registró en todos los tratamientos probados para su inducción a partir de los 14 días de cultivo (Fig. 9) y fue mayor en los tratamientos M+Ca (T5) y M+Ca+P (T6) con 77%, mientras que el menor porcentaje se registró en el medio nutritivo con el fertilizante orgánico comercial con Humus, tratamiento T10, con 16% (Cuadro 2)

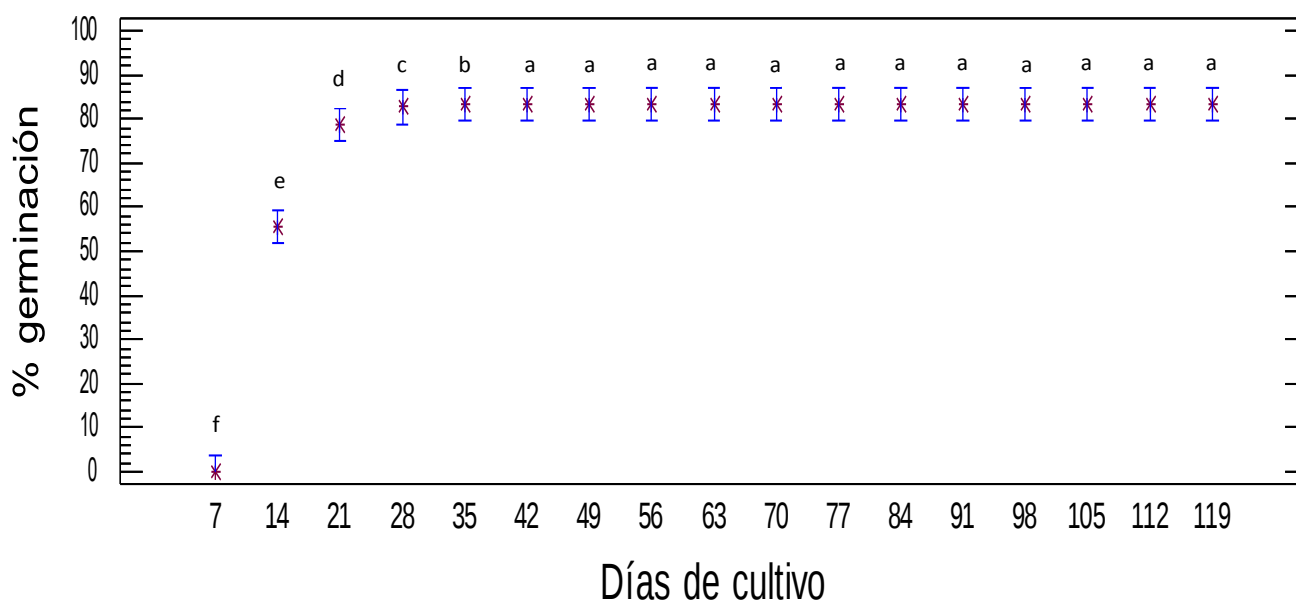


Figura 8.- Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Epidendrum radicans* en los días de cultivo independientemente de los doce tratamientos.

A los 21 días el porcentaje de germinación aumentó considerablemente. En el tratamiento T6 se obtuvo el mayor con 92% y el tratamiento T10 resultó nuevamente con el menor porcentaje en 34% (Cuadro 2, Fig. 9).

A los 28 días se incrementó de nuevo el porcentaje de germinación. El tratamiento M+Ca+P (T6) y el tratamiento H (T10) resultaron nuevamente con el mayor y menor porcentaje respectivamente, con 94% y 43% (Cuadro 3, Fig. 9).

Cuadro 3.- Porcentaje promedio de germinación de las semillas de *Epidendrum radicans* hasta los 35 días de cultivo.

		Días de cultivo			
		14	21	28	35
Tratamientos	Medio de Cultivo	%			
T1	S	38	90	92	96
T2	S + Ca	69	77	82	84
T3	S + Ca + P	75	87	88	89
T4	M	55	87	89	89
T5	M + Ca	77	88	92	92
T6	M + Ca + P	77	92	94	94
T7	KM	57	83	87	87
T8	KM + Ca	55	76	77	78
T9	KM + Ca + P	63	81	84	84
T10	H	16	34	43	43
T11	H + Ca	20	72	81	84
T12	H + Ca + P	63	74	80	80

(Ca=carbón activado, P=peptona).

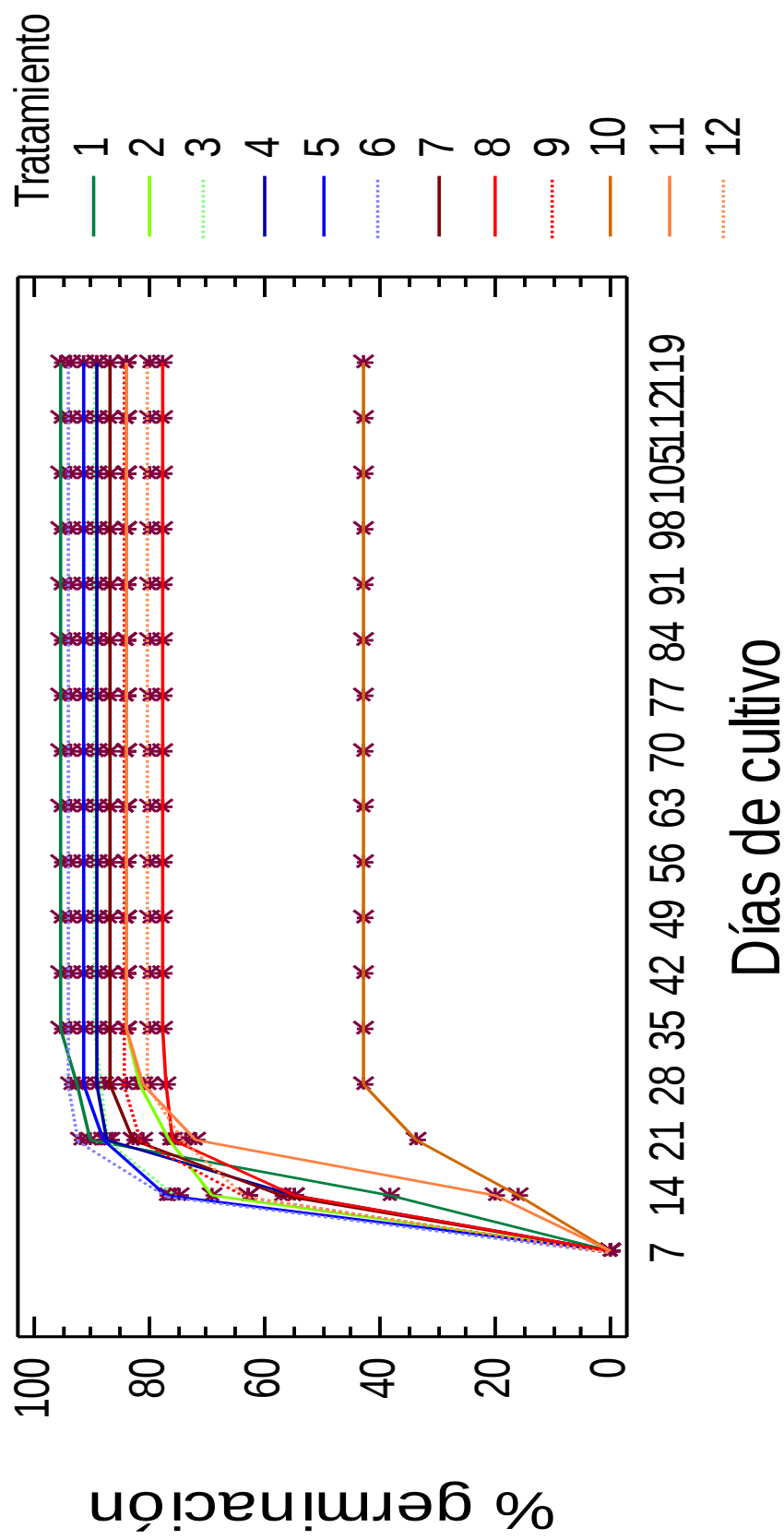
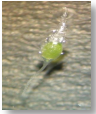
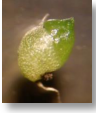


Figura 9.- Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *E. radicans* en los doce tratamientos.
 (1=S, 2=S+Ca, 3=S+Ca+P, 4=M, 5=M+Ca, 6=M+Ca+P, 7=KM, 8=KM+Ca, 9=KM+Ca+P, 10=H, 11=H+Ca, 12=H+Ca+P; Ca=carbón activado, P=peptona).

Desarrollo ontogénico

Durante el proceso de germinación de las semillas de *E. radicans* se establecieron seis estadios ontogénicos (Cuadro 4) como resultado del crecimiento, diferenciación y desarrollo del embrión para la formación del protocormo; así como, de estructuras foliares y raíces.

Cuadro 4.- Estadios ontogénicos registrados durante la germinación *in vitro* de semillas de *Epidendrum radicans*.

Valor del estadio	Índice de desarrollo	Estadio	
1	100	Embrión hinchado	
2	200	Embrión rompiendo la testa	
3	300	Protocormo	
4	400	Protocormo con primordio foliar	
5	500	Plántula con hojas	
6	600	Plántula con hojas y raíz	

Las semillas de *Epidendrum radicans* al inicio del cultivo, poseían un embrión de color crema igual que la testa.

Después de 7 días de cultivo, se observaron los embriones hinchados (Estadío 1) y de color verde dentro de la testa de las semillas, en todos los tratamientos (Fig. 10).

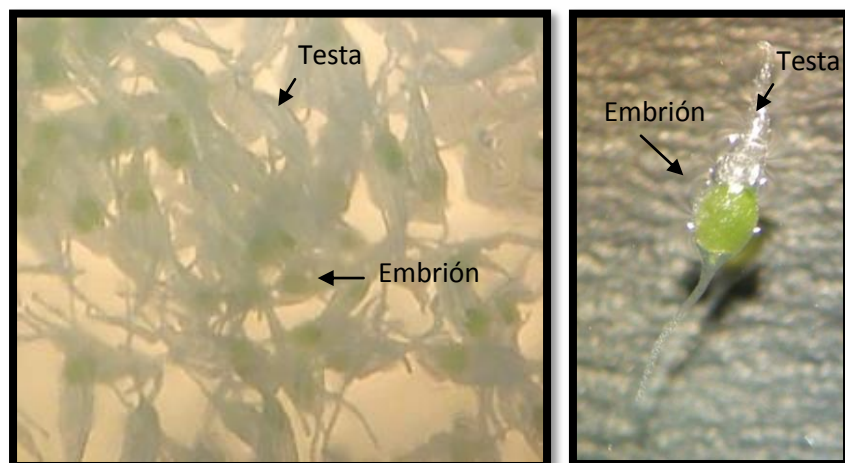


Figura 10.- Semillas de *Epidendrum radicans* con embrión verde e hinchado (Estadío 1).

El embrión, al incrementar su volumen, ocupó un mayor espacio en el interior de la testa hasta provocar que ésta se desgarrara y permitiera la salida del embrión para iniciar así el proceso de germinación (estadío 2) (Fig. 11), para los 14 días este estadio ya había sucedido en todos los tratamientos.

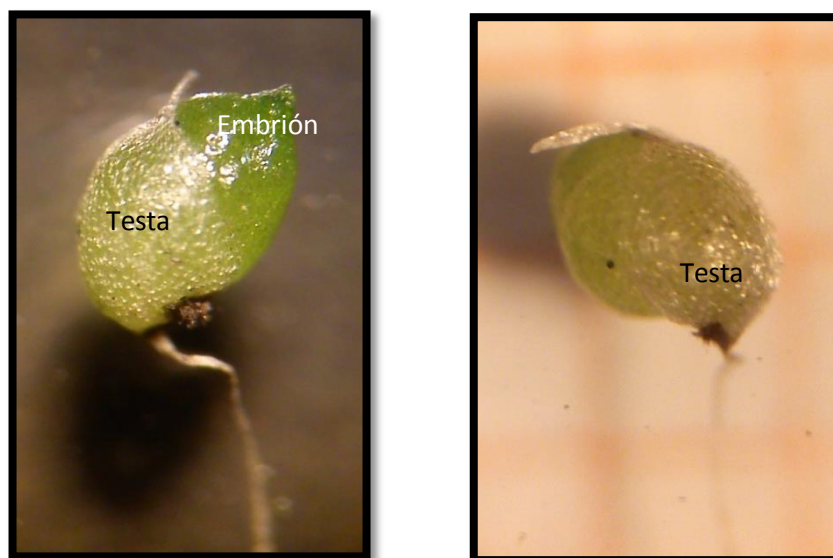


Figura 11.- Embrión de *Epidendrum radicans* rompiendo y emergiendo de la testa (Estadío 2).

El embrión ya libre de la testa incrementó su tamaño formando una esférula o protocormo (estadío 3) (Fig. 12a), la cual en su polo apical desarrolló una protuberancia que evidenció la zona meristemática (Fig. 12b). Este estadio se observó inicialmente a los 14 días en los tratamientos M+Ca (T5), KM+Ca (T8) y

KM+Ca+P (T9), a los 21 días en los tratamientos S+Ca (T2), M+Ca+P (T6), a los 28 días en el tratamiento KM (T7) y el tratamiento H+Ca+P (T12), a los 35 días en el tratamiento S+Ca+P (T3), además del tratamiento H+Ca (T11), a los 42 días de haber iniciado la siembra se observaron en los tratamientos S (T1) y M (T4) y finalmente este estadio de protocormo fue observado a los 49 días en el tratamiento H (T10).

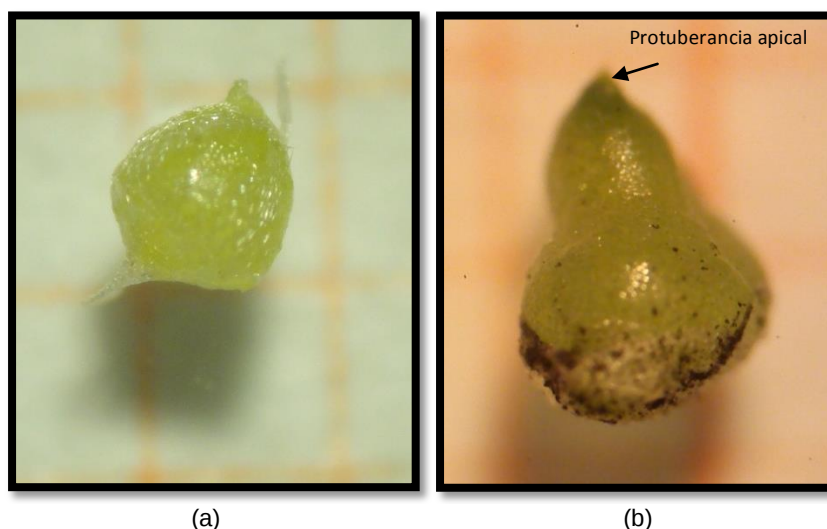


Figura 12.- (a) Embrión en forma de esférula (b) protocormo con protuberancia apical.

A partir del estadio 3 o protocormo se observó la presencia de rizoides en el polo basal (Fig. 13). Cabe mencionar que la aparición de rizoides en los protocormos no se tomó en cuenta como un estadio, por lo que no se registró, además de que la presencia de éstos solo fue observable en los tratamientos que contenían carbón activado.



Figura 13.- Protocormo de *Epidendrum radicans* con rizoides

Posteriormente el protocormo presentó la formación del primordio foliar (estadio 4), el cual es un precursor de las hojas verdaderas (Fig. 14). Inicialmente se observó este estadio en los tratamientos KM+Ca (T8) y KM+Ca+P (T9) a partir de los 28 días de haber realizado la siembra; consecutivamente, a los 35 días se

observó en el tratamiento M+Ca (T5) y en el tratamiento con el medio KM (T7), a los 42 días de cultivo, este estadio se obtuvo en los tratamientos S+Ca (T2), M+Ca (T6) y H+Ca+P (T12), a los 49 días de cultivo el estadio de protocormo con primordio foliar fue observado en el tratamiento H+Ca (T11), a los 63 días en el tratamiento Mitra (T4), a los 70 días en el tratamiento S+Ca (T3), a los 77 días en el tratamiento H (T10) y finalmente a los 84 días de cultivo fue observado en el tratamiento S (T1).



Figura 14.– Protocormo con primordio foliar (Estadio 4) de *Epidendrum radicans*.

A los 42 días de cultivo se observó por primera vez en el tratamiento KM+Ca (T8) plántulas con hojas (estadio 5) (Fig. 15); posteriormente se observó a los 49 días de cultivo en el tratamiento KM+Ca+P (T9), a los 56 días en los tratamientos S+Ca (T2), M+Ca (T5), M+Ca+P (T6) y KM (T7), a los 63 días en los tratamientos H+Ca (T11) y H+Ca+P (T12), a los 91 días en los tratamientos S+Ca (T3) y M (T4), y por último hasta los 119 días en el tratamiento H (T10).

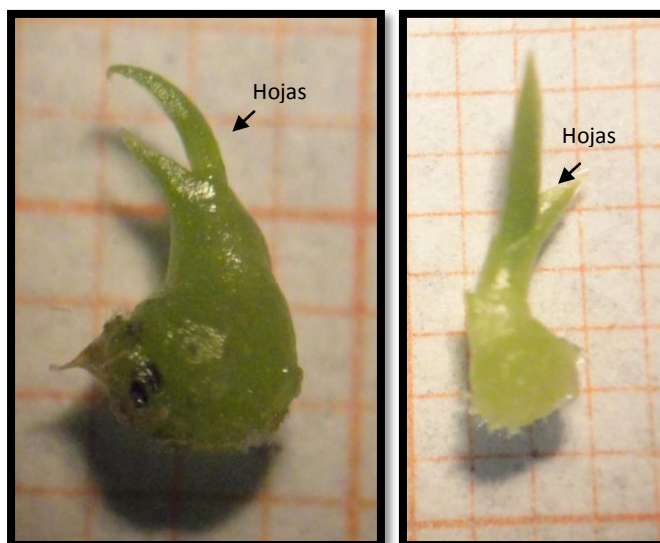


Figura 15.– Plántulas con hojas (Estadio 5) de *Epidendrum radicans*.

Las primeras plántulas completas, con hojas y raíz (estadio 6) (Fig. 16). Se observaron a los 56 días de cultivo en el tratamiento KM+Ca (T8), a los 63 días en los tratamientos S+Ca (T2) y M+Ca+P (T6), a los 70 días en el tratamiento KM+Ca+P (T9), posteriormente a los 77 días de cultivo este estadio se obtuvo en el tratamiento con medio de cultivo KM que corresponde al tratamiento T7, y en el tratamiento H+Ca+P correspondiente al tratamiento T12, a los 84 días de cultivo las plántulas con hojas y raíz se observaron en el tratamiento H+Ca (T11), a los 91 días en el tratamiento M+Ca (T5) y finalmente en los tratamientos S+Ca+P y M (T3 y T4 respectivamente) se obtuvieron plántulas completas a los 119 días.



Figura 16.- Plántula con hojas y primera raíz (Estadio 6) de *E. radicans*.

Después del desarrollo de la primera raíz las plántulas generaron nuevas hojas y raíces.

Índice de desarrollo

El análisis del índice de desarrollo obtenido, durante la germinación de las semillas de *Epidendrum radicans*, mostró que existieron diferencias significativas (p -valor= 0.00) en los tratamientos y en los días de cultivo y no existieron diferencias significativas (p -valor= 0.0691) entre sus interacciones (Anexo 2, Cuadro 4).

Al comparar las medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los tratamientos, independientemente al tiempo de cultivo, se comprobó que fueron diferentes estadísticamente entre sí. Los resultados demostraron que el menor índice de desarrollo promedio se obtuvo en el tratamiento H correspondiente al tratamiento T10 con un valor de 108 (Fig. 17), este valor indica que los embriones de las semillas cambiaron su morfología a un estadio de

embrión hinchado o estadio 1 (Cuadro 4); mientras que, el mayor índice de desarrollo promedio se obtuvo en el tratamiento M+Ca+P correspondiente al tratamiento T6 con un valor de 309, indicando que los embriones cambiaron al estadio de desarrollo conocido como protocormo ó estadio 3 (Cuadro 4).

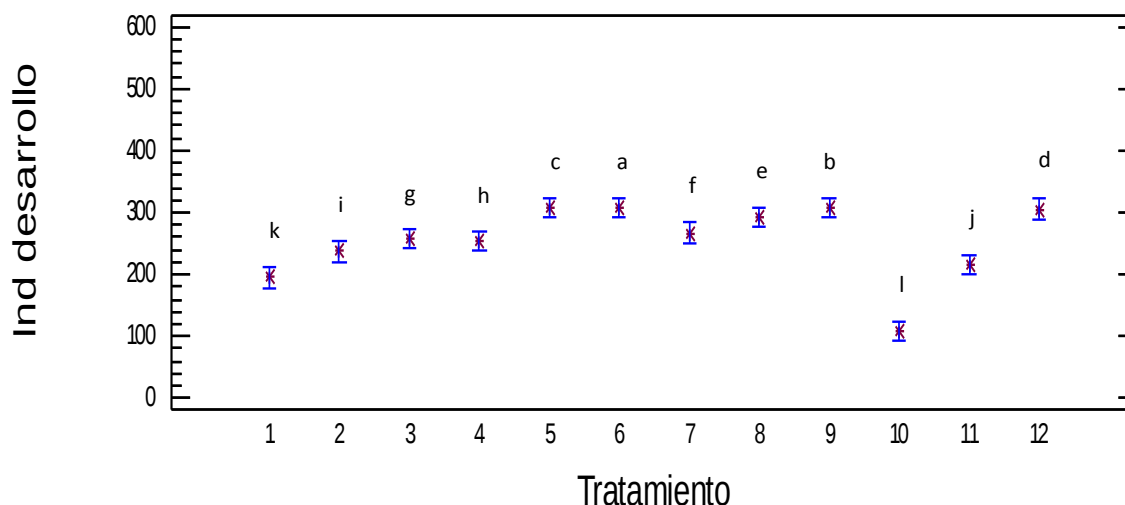


Figura 17.-Índice de desarrollo de *Epidendrum radicans* en los doce medios de cultivo independientemente a los días de cultivo.

(1=S, 2=S+Ca, 3=S+Ca+P, 4=M, 5=M+Ca, 6=M+Ca+P, 7=KM, (= KM+Ca, 9=KM+Ca+P, 10=H, 11=H+Ca, 12=H+Ca+P) (Ca=carbón activado; P=peptona)

Al comparar las medias de los índices de desarrollo obtenidos para cada tiempo de cultivo, independientemente a los tratamientos empleados, se comprobó que fueron diferentes estadísticamente entre sí. Se observó que a los 7 días de cultivo el valor promedio del índice de desarrollo fue de 66, este valor demostró que 16% de las semillas, en ese tiempo, presentaron embriones hinchados (estadio 1). A los 14 días de cultivo, el índice de desarrollo promedio fue de 137, este valor reflejó que el 37% de las semillas con embriones hinchados rompió la testa de las semillas (estadio 2). Sin embargo, este estadio 2 se estableció hasta los 35 días de cultivo, en donde el valor del índice fue de 214. Posteriormente, transcurrieron 49 días más, para que los embriones que rompieron la testa cambiaran al estadio de protocormo o estadio 3, donde el valor del índice de desarrollo a los 84 días de cultivo fue de 298. Finalmente a los 119 días de cultivo, el índice promedio de desarrollo fue de 383, lo que indicó que el 17% de los protocormos desarrollados permaneció en ese estadio; mientras que, en el 80% se les diferenció el primordio foliar conformando así el estadio de protocormo con primordio foliar o estadio 4 (Fig. 18).

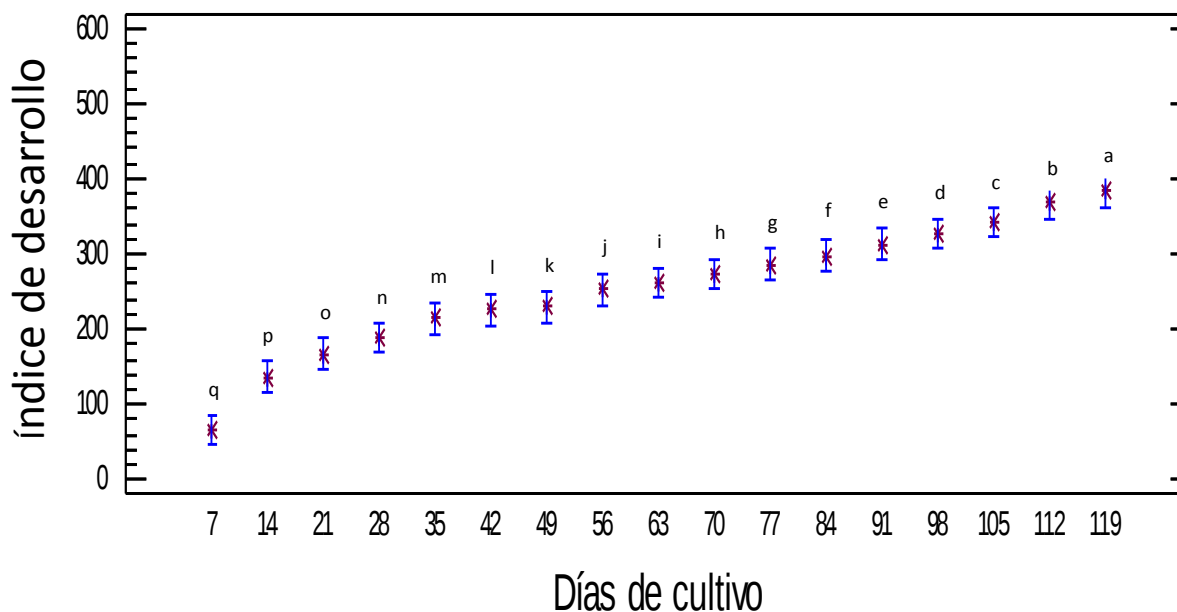


Figura 18.-Índice de desarrollo de *E. radicans* en los días de cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

En la figura 19 se aprecia que el índice de desarrollo promedio obtenido en todos los tratamientos a los 7 días de cultivo es inferior a 90; sin embargo, el valor del índice en el tratamiento H (T10) quedó por debajo de 20, mientras que en el resto fue superior a 50. Esto indicó que los embriones de las semillas, de estos tratamientos en este tiempo de cultivo, estuvieron en el proceso de hinchamiento o estadio 1.

A los 14 días de cultivo el tratamiento H (T10) mostró el índice de desarrollo menor con 57, seguido por el tratamiento H+Ca (T11) aproximándose a 100, lo que indicó la presencia de embriones hinchados (estadio 1). Mientras que en el resto de los tratamientos los valores resultaron entre 130 y 175. El valor más alto del índice fue en el tratamiento M+Ca (T5) donde el 75% de los embriones presentaron rompimiento de testa (estadio 2).

Durante los 35 días de cultivo, nuevamente en el tratamiento H (T10), se mantuvo el menor promedio de índice de desarrollo con 86, lo cual significó, que la mayoría de las semillas de *Epidendrum radicans* presentaban solo embriones hinchados (estadio 1). En los tratamientos S (T1), M (T4) y H+Ca (T11) los índices de desarrollo se mantuvieron por debajo de 200, lo que indicó que cerca del 100% de las semillas presentaron embriones rompiendo la testa (estadio 2). En los tratamientos restantes los valores de los índices de desarrollo fueron de 200 a 260, este último valor se obtuvo en los tratamientos M+Ca (T5) y KM (T7), donde la mayoría de las semillas presentaron el estadio de protocormo o estadio 3.

Posteriormente, a los 84 días de cultivo, en el tratamiento H (T10) el índice de desarrollo de las semillas se incremento 130, lo que indicó que sólo el 30% de

los embriones hinchados lograron romper la testa (estadío 2); en el tratamiento S (T1), la mayoría de las semillas, permanecieron con embriones hinchados rompiendo la testa (estadío 2). En el tratamiento H+Ca (T11), el índice de desarrollo fue de 240, por lo que solo el 40% de los embriones alcanzaron el estadío de protocormo o estadío 3; mientras que, en los tratamientos S+Ca (T2), S+Ca+P (T3), M (T4) y KM (T7) los valores del índice fueron cercanos a 300 presentando el estadío 3 o protocormo. En el tratamiento KM+Ca (T8) el índice fue menor a 350 por lo que menos del 50% de los protocormos presentaron un primordio foliar o estadío 4. En el resto de los tratamientos (T5, T6, T9 y T12) los valores del índice de desarrollo fueron cercanos a 381, indicando que la mayoría de los protocormos desarrollaron primordio foliar (estadío 4), sobresaliendo los tratamientos KM+Ca+P (T9) y H+Ca+P (T12).

Finalmente a los 119 días de cultivo, el índice de desarrollo de las semillas de *Epidendrum radicans* en el tratamiento con el medio de cultivo Humus (T10) permaneció rezagado, ya que las semillas sobre este medio se mantuvieron, hasta el final del cultivo, en estadío 2; en tanto que, en el tratamiento S (T1) la mayoría de las semillas alcanzaron el estadío de protocormo o estadío 3. En los tratamientos H+Ca (T11) y S+Ca (T2), aproximadamente el 40% de los protocormos generaron un primordio foliar (estadío 4); mientras que, en el tratamiento S+Ca+P (T3) aproximadamente el 100% de los protocormos alcanzaron este estadío. En el resto de los tratamientos (T4, T5, T6, T7, T8, T9, y T12) entre un 20% y 60% de los protocormos con primordio foliar avanzaron al estadío 5 o plántula con hojas; sin embargo, se mantuvieron induciendo el mayor desarrollo de plántula con hojas en los tratamientos H+Ca+P (T12) y KM+Ca+P (T9).

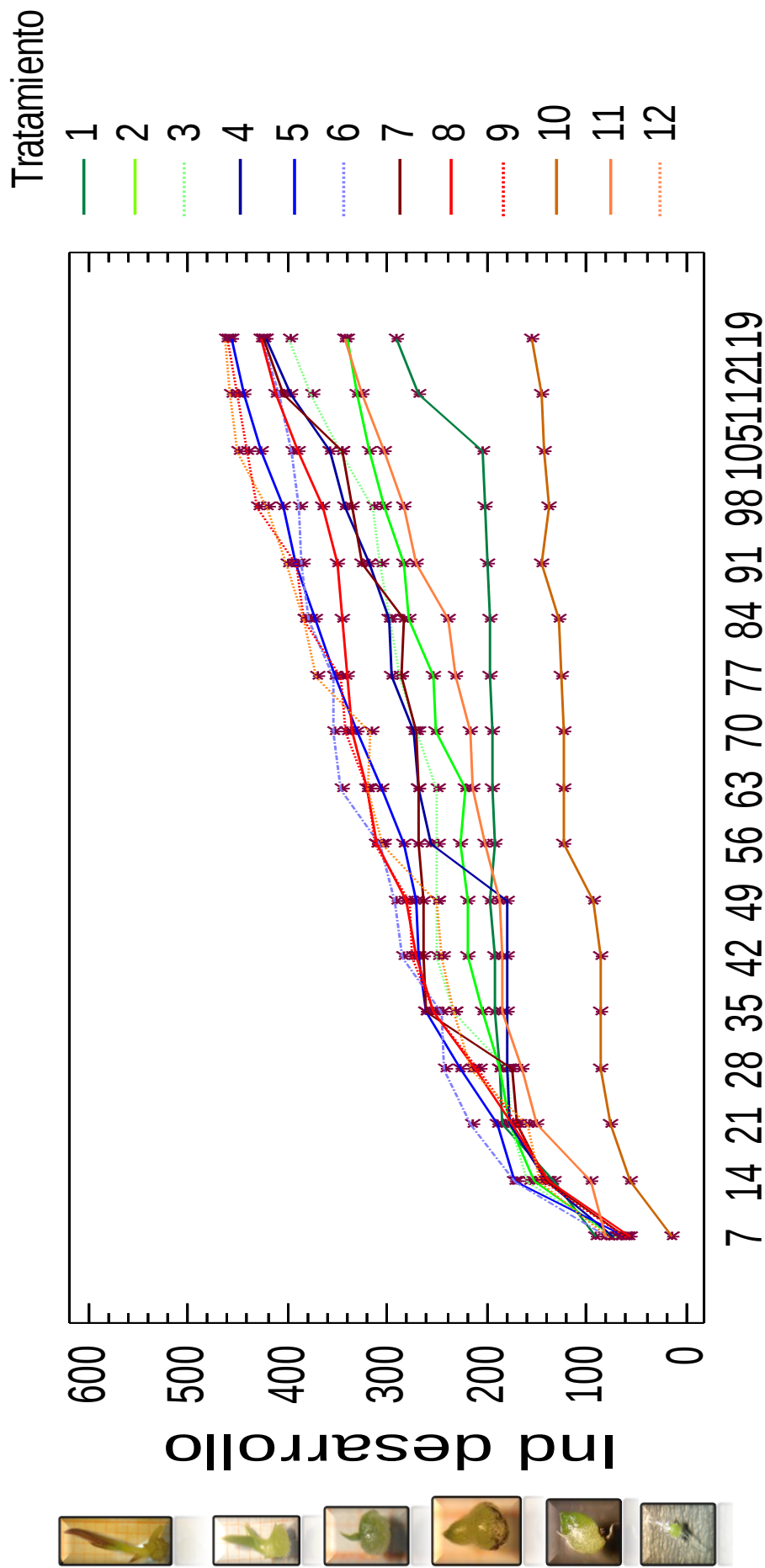


Figura 19.- Comportamiento del índice de desarrollo de semillas de *E. radicans* en los doce medios de cultivos.
 (1=S, 2=S+Ca, 3=S+Ca+P, 4=M, 5=M+Ca, 6=M+Ca+P,
 7=KM, 8=KM+Ca, 9=KM+Ca+P, 10=H, 11=H+Ca, 12=H+Ca+P,
 Ca=carbón activado, P=peptona)

Estadíos a los 120 días de cultivo

En la figura 20 se observa el máximo estadio de desarrollo alcanzado en cada uno de los tratamientos empleados para inducir la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans* después de cuatro meses de cultivo.

En los tres tratamientos donde se utilizó el fertilizante orgánico Superthrive[®], como medio nutritivo, se observó que, al utilizarlo sin carbón activado (Ca) y sin peptona (P) (tratamiento T1) el máximo estadio de desarrollo alcanzado fue el de protocormo con primordio foliar o estadio 4 con 2%. El estadio predominante fue el de embrión rompiendo la testa o estadio 2 con 45% seguido por el estadio de embrión hinchado o estadio 1 con 34% y el de protocormo con 19%. En los otros dos tratamientos donde se le adicionó Ca (S+Ca o tratamiento T2) o además P (S+Ca+P o tratamiento T3) se observó que el máximo estadio de desarrollo alcanzado fue el de plántulas con hojas y raíz o estadio 6 con 38% y 14% respectivamente; sin embargo, el estadio predominante para el tratamiento con Ca (T2) fue el estadio 5 o plántulas con hojas con 61% y el estadio 4 o protocormos con primordio foliar con 73% para el tratamiento con Ca y P (T3). En estos tratamientos ya no fueron evidentes los dos primeros estadios de desarrollo (estadio 1 o embriones hinchados y estadio 2 o embriones rompiendo la testa).

En los tres tratamientos, en los que se utilizó el medio nutritivo Mitra, con sales inorgánicas analíticas, el máximo estadio de desarrollo alcanzado fue el de plántulas con hojas y raíz o estadio 6; sin embargo, el mayor porcentaje fue de 41% cuando se adicionó Ca y P al medio nutritivo M, seguido por 4% si únicamente estaba adicionado con Ca y de 2% sin alguno de estos dos suplementos. El estadio de desarrollo predominante, en estos tres tratamientos, fue el de plántulas con hojas o estadio 5 con un mayor porcentaje (88%) al utilizar el tratamiento T4 o medio de nutritivo Mitra, seguido por el tratamiento T5 suplementado con Ca con 75% y por el tratamiento T6 suplementado con Ca y P con 52%. En los tres tratamientos ya no fue evidente el primer estadio de desarrollo o embrión hinchado; mientras que, el segundo estadio, embrión rompiendo la testa, fue del 1% únicamente en el tratamiento T5 adicionado con Ca; así mismo, el tercer estadio o protocormos se observaron en los tratamientos T4, T5 y T6 con 1%, 6% y 1% respectivamente (Fig.20).

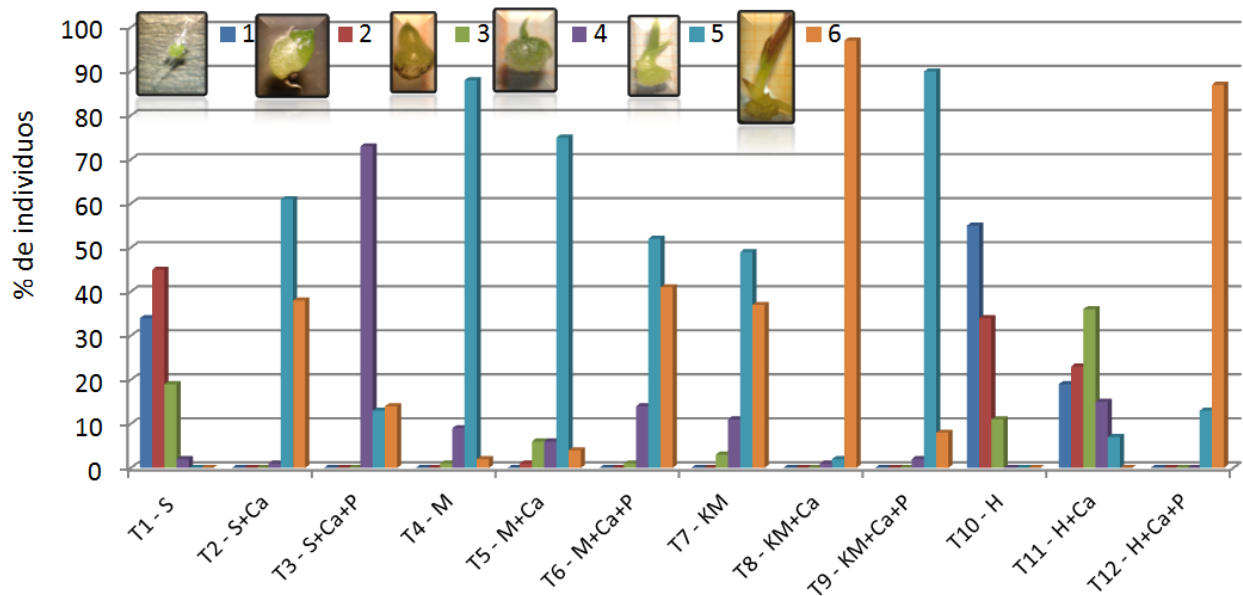


Figura 20.- Máximo estadio de desarrollo alcanzado en cada tratamiento utilizado para inducir la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans* después de 120 días de cultivo.

(T= Tratamiento, S= Superthrive®, M=Mitra, H=Humus, Ca=carbón activado, P=peptona)

En los tratamientos T7, T8 y T9, con sales inorgánicas analíticas del medio nutritivo KM, el máximo estadio de desarrollo alcanzado fue el de plántula con hojas y raíz o estadio 6; sin embargo, es importante resaltar que este estadio de desarrollo predominó en el tratamiento T8, con un 97% al adicionar Ca al medio nutritivo KM, y también sobre el resto de los tratamientos empleados para inducir la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans* después de 120 días de cultivo. Mientras que en los tratamientos T7, sin ningún suplemento, y T9, adicionado con Ca y P, el estadio de desarrollo que predominó fue el de plántula con hojas o estadio 5 con 49% y 90% respectivamente. En los tres tratamientos la presencia de protocormos con primordio foliar o estadio 4 fue evidente pero con mayor porcentaje en el tratamiento T7 o medio nutritivo KM con 11%. Además, en este último tratamiento, fue el único donde se mantuvo 3% de protocormos o estadio 3. La presencia de embrión hinchado y embrión rompiendo la testa ya no fue evidente en alguno de los tratamientos con el medio KM.

En los tres tratamientos, T10, T11 y T12, donde se utilizó el fertilizante orgánico comercial Xibani® de Humus de lombriz, como medio nutritivo, se observó que únicamente cuando se suplementó con Ca y P (tratamiento T12) se promovió el desarrollo del máximo estadio alcanzado, con 87%, que correspondió al de plántula con hojas y raíz o estadio 6, además de ser el estadio que predominó en estos tres tratamientos. Al estar suplementado únicamente con Ca (tratamiento T11) el máximo estadio de desarrollo alcanzado fue el de plántula con

hojas o estadio 5, con 7%, el resto de los estadios predecesores a este, fueron evidentes después de 120 días de cultivo; sin embargo, el estadio predominante en este tratamiento fue el de protocormos o estadio 3 con 36%. En el tratamiento T10, sin ningún suplemento, el máximo estadio de desarrollo alcanzado fue el de protocormo o estadio 3 con 11% y predominó el de embrión hinchado o estadio 1 con 55%.

En la figura 21 se muestra la altura media que alcanzaron los embriones hinchados de *Epidendrum radicans*, a los 120 días de cultivo, presentes en los tratamientos S (T1), H (T10) y H+Ca (T11). La altura osciló entre 0.058 mm a 0.068 mm, sin existir diferencias significativas (p-valor=0.3219) entre ellos (Anexo 2, Cuadro 7 y 8).

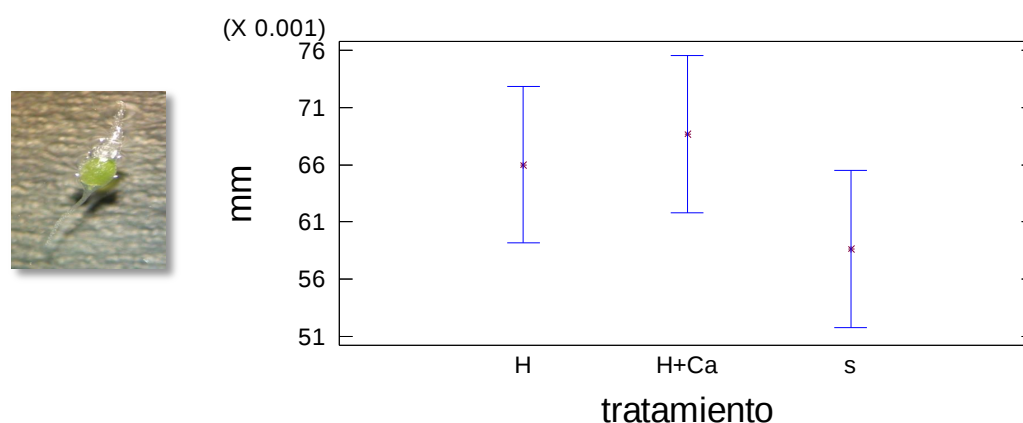


Figura 21.-Altura media de embriones hinchados o estadio 1 por tratamiento a los 120 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

(S=Superthrive®, H=Humus, Ca=carbón activado)

A los 120 días de cultivo, los embriones hinchados que rompieron la testa presentes sólo en los mismos tratamientos anteriores (S, H y H+Ca), presentaron diferencias significativas (p-valor=0.0001) entre sus tallas (Anexo 2, Cuadro 9). En la figura 22 se muestra la altura media de los embriones en los tratamientos T10 y T11 con el medio nutritivo Humus, solo o adicionado con Ca, con 0.104 mm y 0.107 mm respectivamente fueron mayores y diferentes a la de los obtenidos en el tratamiento T1 con el medio nutritivo Superthrive® (Anexo 2, Cuadro 10).

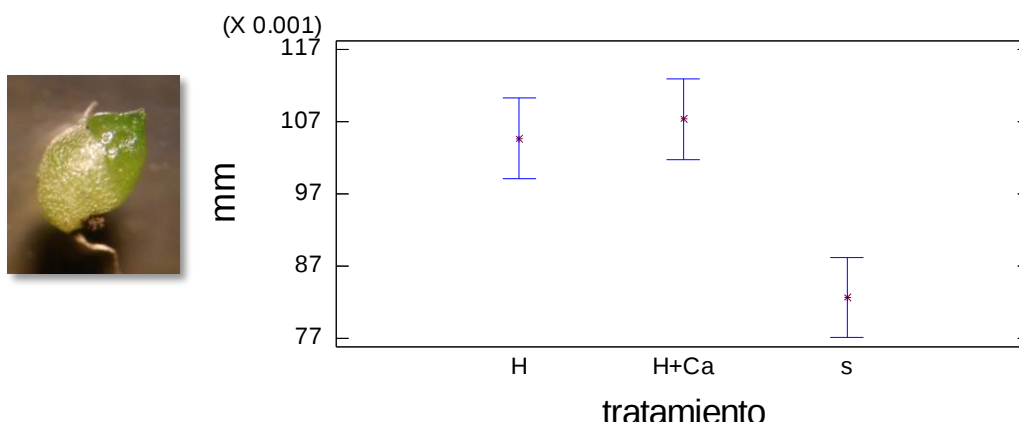


Figura 22.-Altura media de los embriones rompiendo la testa o estadio 2 por tratamiento a los 120 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

(S=Superthrive®, H=Humus, Ca=carbón activado)

La altura media de los protocormos presentes con más del 10% del total de los protocormos estuvieron en los mismos tratamientos anteriores, en la figura 23 se muestra la altura media de los protocormos (de 0.12 mm a 0.14 mm) obtenida por tratamiento (Anexo 2, Cuadro 12), sin existir diferencias significativas (p-valor=0.8756) entre ellos (Anexo 2, Cuadro 11).

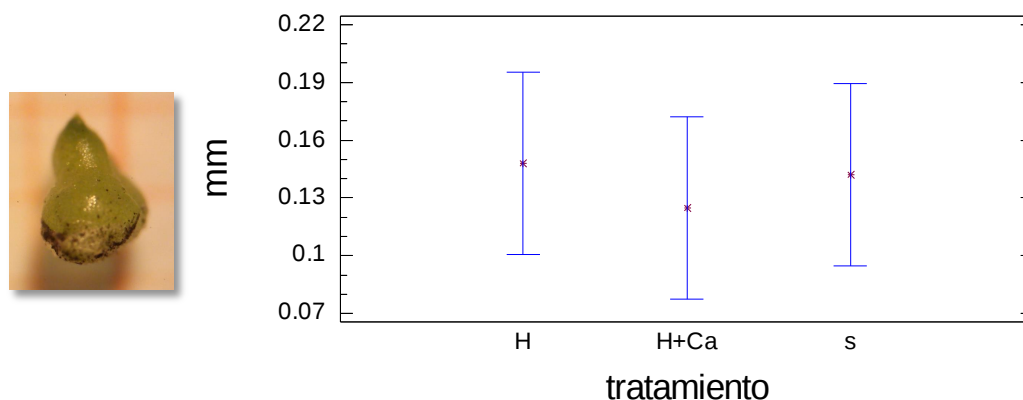


Figura 23.-Altura media de los protocormos o estadio 3, por tratamiento a los 120 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

(S=Superthrive®, H=Humus, Ca=carbón activado)

En la figura 24 se muestran las tallas obtenidas de los protocormos con primordio foliar, a los 120 días de cultivo, los cuáles se encontraron presentes en los tratamientos S (T1), S+Ca (T2), S+Ca+P (T3), M (T4), M+Ca (T5), M+Ca+P (T6), KM (T7), y H+Ca (T11), en donde, existieron diferencias significativas estadísticamente (p-valor=0.0000), (Anexo 2, Cuadro 13). La menor altura media de este estadio fue en el tratamiento S (T1) con 0.124 mm, resultando diferente estadísticamente a las restantes; en contraste, con la obtenida en el tratamiento

S+Ca (T2) que fue mayor y diferente a las restantes con 0.296 mm (Anexo 2, Cuadro 14).

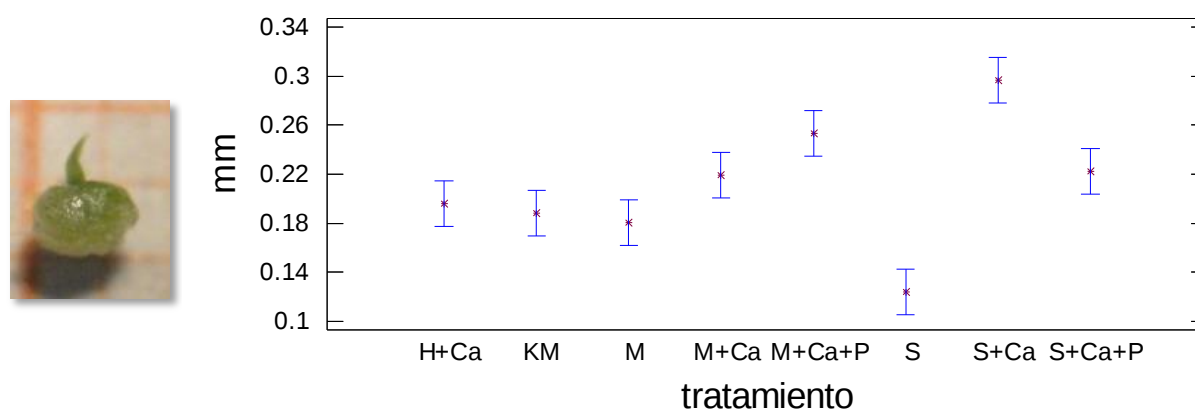


Figura 24.-Altura media de los protocormos con primordio foliar o estadio 4 por tratamiento a los 120 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.
(S=Superthrive®, M=Mitra, H=Humus, Ca=carbón activado, P=Peptona)

Para la altura media obtenida de las plántulas con hojas, en los tratamientos S+Ca (T2), S+Ca+P (T3), M (T4), M+Ca (T5), M+Ca+P (T6), KM (T7), KM+Ca (T8), KM+Ca+P (T9), H+Ca (T11) y H+Ca+P (T12) existieron diferencias significativas (p -valor=0.0000) (Anexo 2, Cuadro 15). En la figura 25 se muestran las alturas medias de las plántulas con hojas por tratamiento. En el tratamiento H+Ca las plántulas tuvieron la menor altura (0.25 mm) a diferencia de las del tratamiento KM+Ca que presentaron la mayor talla (1.64 mm) (Anexo 2, Cuadro 16).

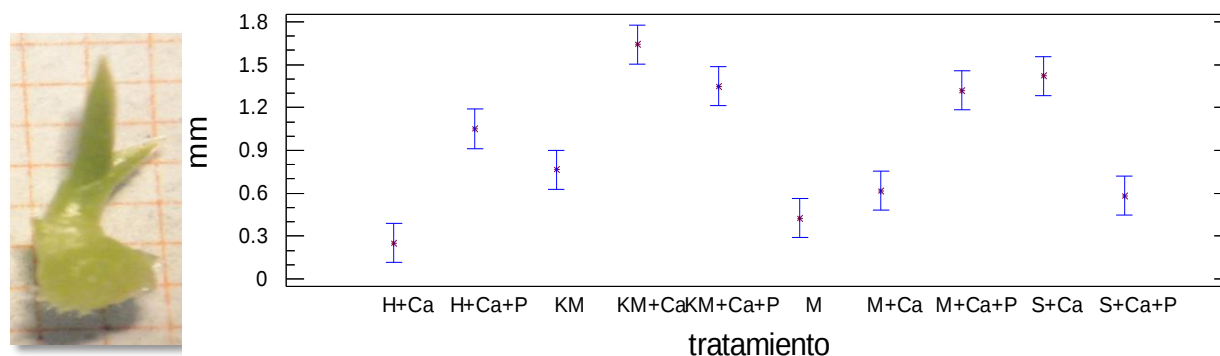


Figura 25.-Altura media de las plántulas con hojas o estadio 5 por tratamiento a los 120 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.
(S=Superthrive®, M=Mitra, H=Humus, Ca=carbón activado, P=Peptona).

La altura obtenida para el estadio ontogénico de plántula con hojas y raíz en los tratamientos S+Ca (T2), S+Ca+P (T3), M+Ca+P (T6), KM (T7), KM+Ca (T8) y H+Ca+P (T12) a los 120 días de cultivo; arrojó que existieron diferencias significativas ($p\text{-valor}=0.0000$) entre ellos, (Anexo 2, Cuadro 17). En la figura 26 se muestra la altura media de este estadio en los 6 tratamientos, siendo el tratamiento S+Ca+P donde las plántulas tuvieron la menor talla promedio (0.4mm) y el tratamiento KM con la mayor (4.34 mm) (Anexo 2, Cuadro 18).

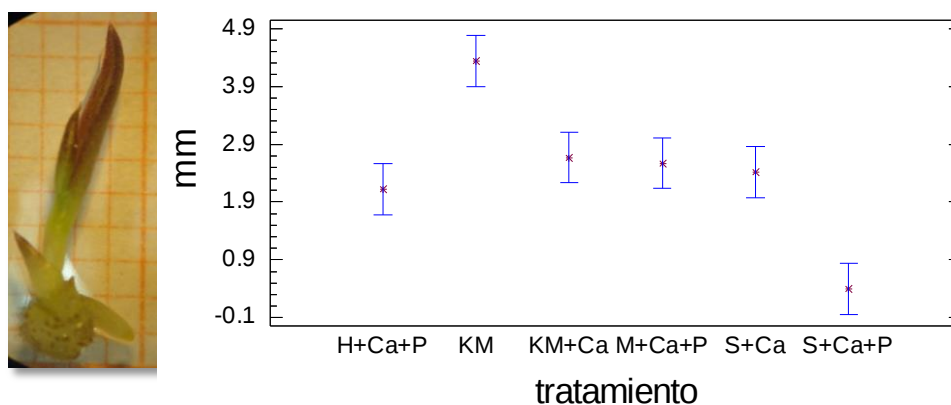


Figura 26.-Altura media de las plántulas con hojas y raíz o estadio 6 por tratamiento a los 120 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

(S=Superthrive[®], M=Mitra, H=Humus, Ca=carbón activado, P=Peptona).

DISCUSIÓN

De acuerdo con Arditti (1992), los porcentajes de germinación para orquídeas epífitas alcanzados sobre un medio asimbiótico son mayores al 50%; Lee y Lee (1991) reportaron que la germinación en semillas de orquídeas ocurre entre los 30 y 60 días de cultivo. Para *Epidendrum radicans* la germinación ocurrió entre los 14 y 35 días de cultivo, un tiempo menor al mencionado por Lee y Lee (1991).

Santos y colaboradores (2005), por ejemplo, reportaron para *Laelia albida* un porcentaje de germinación entre 75 y 85% al utilizar el medio KC (Knudson C), suplementado con extracto de papa, a los 24 días después de la siembra. En el presente estudio para *Epidendrum radicans* el máximo porcentaje de germinación fue de 96% en el medio Superthrive® a los 35 días de cultivo, superando lo reportado por Santos y colaboradores (2005); probablemente el inicio de la germinación en este tratamiento fue beneficiado por las vitaminas y reguladores del crecimiento que contiene el fertilizante Superthrive®.

Muñoz-Barrionuevo (2011), reportó para *Epidendrum jameisonic*, el 99% de germinación a los 90 días de cultivo en el medio MS (Murashige & Skoog) adicionado con 8 gL⁻¹ de carbón activado; por su parte, Damon *et al.* (2004) reportaron para *Cattleya aurantiaca* un porcentaje de germinación de 93% a los 120 días de cultivo en el medio KC modificado; para *E. radicans* el máximo porcentaje de germinación fue similar a lo reportado por estos autores, pero en menor tiempo de cultivo y en un medio diferente.

Hossain (2008) reportó para *Epidendrum ibaguense* 70% de germinación al utilizar el medio basal Mitra. En el caso de *E. radicans*, al emplear el medio de cultivo Mitra con sales inorgánicas analíticas, pero adicionado con carbón activado y peptona se incrementó a un 94% el porcentaje de germinación.

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⁻¹ de carbón activado, a los 30 días de cultivo. Estos porcentajes son similares a los obtenidos en este estudio para el tiempo de cultivo, 28 días, de *E. radicans* pero difiriendo en el medio de cultivo empleado; ya que, con el medio nutritivo con el fertilizante orgánico comercial con Humus se obtuvo el menor porcentaje y con el medio nutritivo Mitra con sales inorgánicas, adicionado con Carbón activado y peptona, el mayor. Como se ha observado en este estudio, el carbón activado favoreció el proceso de germinación *in vitro*.

Para el caso del medio nutritivo con el fertilizante orgánico comercial con Humus (H), donde se obtuvo el menor porcentaje de germinación, la cantidad de compuestos con nitrógeno, amonio y nitrato, son menores. El N es un constituyente de muchos compuestos esenciales como el adenosín trifosfato (ATP), enzimas, proteínas estructurales y ácidos nucleicos; y en un medio con baja concentración de amonio se provoca la disminución en la asimilación de N, lo cual se traduce en una germinación y desarrollo pobres (Stenberg y Kane, 1998).

Se ha reportado que la adición de varias vitaminas al medio de cultivo promueve la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas de *Cymbidium elegans* y *Coelogyne punctulata* (Sharma *et al.*, 1991). Hossain (2008) reportó el máximo porcentaje de germinación de las semillas de *E. ibaguense* en el medio Mitra enriquecido con diferentes vitaminas; lo que concuerda para *E. radicans* al emplear el medio nutritivo Mitra, suplementado con una mayor cantidad de vitaminas, lo que promovió el inicio de la germinación por la adición de biotina y riboflavina, además de tiamina, niacina y piridoxina.

Probablemente, en el medio nutritivo con el fertilizante Superthrive® se promovió este inicio de germinación por el contenido de una auxina (ácido naftalenacético), regulador del crecimiento vegetal, que promueve el alargamiento y división celular *in vivo* y se utiliza para la formación de raíces a partir del tallo, así como para la germinación *in vitro* de semillas y crecimiento de plántulas en algunas especies de plantas (Pierik *et al.*, 1984; Sagee *et al.*, 1992; Bandurski *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996; Acosta *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Barket *et al.*, 2007).

De la Cruz-Rodríguez (2006), reporta que los embriones de *Prosthechea vitellina* evidenciaron la presencia de clorofilas a los 10 días de haber iniciado el cultivo *in vitro*; lo que coincide con este estudio, ya que los embriones de *E. radicans*, mostraron a los 7 días después de la siembra, una coloración verde debido a la presencia de clorofila, en los 12 tratamientos empleados, excepto en los tratamientos con Superthrive®, Superthrive® adicionado con carbón activado y Humus. Contrario a lo que reportan Potisek y colaboradores (1994), para *Epidendrum stamfordianum*, semillas hinchadas a los 27 días después de la siembra, en el medio de cultivo MS. Obaidul *et al.*, (2000) señalan que los embriones de semillas cultivadas *in vitro* de un híbrido de *Cattleya walkeriana* adquirieron un color verde a los 20 días. Stenberg y Kane (1998) reportan que en la germinación de *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* y semillas de *Cattleya* sp., la coloración del embrión depende de la composición del medio de cultivo.

El cambio de fase de embrión hinchado a protocormo en *Epidendrum radicans* sucedió de manera temprana a los 14 días de haber iniciado el cultivo, en los medios de cultivo Mitra y KM adicionados con carbón activado y KM adicionado además con peptona, difiriendo en los resultados obtenidos por Santos y colaboradores (2005); quienes reportaron que a los 46 días de haber realizado la siembra de semillas de *Laelia albida*, obtuvieron el estadio de protocormos (E3), en el medio KC suplementado con extracto de papa.

López-Roberts y colaboradores (2007) obtuvieron en *Epidendrum* sp. después de 42 días de cultivo, el estadio de protocormo con primordio foliar (E4) en los medios de cultivo MS y KC adicionado con 15% de leche de coco, por otro lado, Potisek y colaboradores (1994) obtuvieron este estadio en *E. stamfordianum* a los 57 días de cultivo en el medio MS; contrastando con los resultados obtenidos para *E. radicans*, ya que, dicho estadio se obtuvo a los 28 días de iniciada la siembra, en los medio de cultivo KM adicionados con carbón activado y KM adicionado además con peptona.

De la Cruz-Rodríguez (2006), observó la aparición de la primera hoja verdadera (E5) en *Prosthechea vitellina* hasta los 150 días, a diferencia de *Encyclia tampensis* en la que se reporta la aparición de la primera hoja a los 90 días (Zettler *et al.*, 1999). En *Epidendrum radicans* la primera hoja verdadera se desarrollo a los 42 días de cultivo en el medio KM adicionado con carbón activado, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Luna y Barba (1993), en donde a los 40 días después de la siembra aparece la primera hoja en *Laelia speciosa*.

Potisek y colaboradores (1994) reportaron para *Epidendrum stamfordianum* la planta completa (E6) a los 130 días de cultivo en el medio MS, estadio que se reporta en este estudio para *E. radicans* a los 56 días de cultivo en el medio KM suplementado con carbón activado.

La velocidad de cambio morfogenético de manera general de un estadio al siguiente en *Epidendrum radicans* fue progresivo y rápido, siendo semillas hinchadas a los 7 días, embriones rompiendo la testa (estadio en el cuál se consideró el inicio de la germinación) a los 14 días; el cambio de un estadio al otro en general duró en promedio de 7 a 21 días. El proceso completo desde germinación de semillas hasta la plántula completa comprendió un desarrollo morfogenético desde los 63 a los 120 días variando el tratamiento. Con relación a esto, Harrison (1973), efectuó un estudio de la germinación de 55 especies de orquídeas encontró que el inicio de la germinación estuvo entre los 10 y 211 días y que la formación de plántulas abarcó de 61 a 724 días, lo que nos muestra que el tiempo de germinación es muy variable en cada especie.

Si bien, los tratamientos con los medios de cultivo Mitra y KM favorecieron el desarrollo de *Epidendrum radicans*, en los medios de cultivo Superthrive[®], Superthrive[®] adicionado con carbón activado y Humus sucedió lo contrario. Los protocormos adoptaron una coloración verde claro, seguido de un color amarillento, deteniendo o retrasando así su desarrollo, solo creciendo lentamente en volumen; ya que a los 120 días de cultivo, el mayor estadío encontrado fue el de protocormo con primordio foliar (E4) en el medio de cultivo Superthrive[®] adicionado con carbón activado y peptona, estos complementos favorecieron el desarrollo de los protocormos a diferencia de los otros dos tratamientos, en donde, el mayor estadío fue el de protocormo (E3); probablemente esto se debió a que los niveles de nitrógeno necesarios para el desarrollo fueron deficientes; a pesar de que en dichos tratamientos se trata con fertilizantes, los cuales no contaron con la cantidad necesaria de nitrógeno para el desarrollo de los protocormos; quizá estos fertilizantes sean útiles para el desarrollo de plantas adultas, pero en este estudio no fueron efectivos para el desarrollo de los protocormos.

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, 2008), ya que necesita una micorriza para su adecuada asimilación de nutrientes.

La adición de carbón activado al medio de cultivo es un método que ha sido empleado por una gran cantidad de autores (Thompson, 1989; Singh, 1993; George, 1996; Tisserat y Jones, 1999; Yang *et al*, 1999; Mckendrick, 2000) y se ha demostrado que influye positivamente en la germinación y crecimiento de las orquídeas. Como se observó con *Epidendrum radicans*, a los 120 días de cultivo, en los medios Superthrive[®] y KM adicionados con carbón activado en los cuales se observaron plántulas con hojas (E5), y plántulas con hojas y raíces (E6). Arditti y Ernst (1992), plantearon qué entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de orquídeas se encuentra el aumento de la aireación del medio de cultivo, además de adsorber el etileno el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación. Asimismo, favorece los procesos de crecimiento de las orquídeas, el carbón activado adicionado a los medios de cultivo es un agente químico que ejerce un control positivo de la oxidación tanto en el medio de cultivo como en el tejido vegetal, reduciendo considerablemente la pérdida de material vegetal por necrosis consecuente a la oxidación (Pedroza, 2009).

El carbón activado también mejora la germinación de semillas, incrementando la talla de los protocormos e induce la formación temprana de raíces en las plántulas (Hossain, 2008), por lo que, en el medio de cultivo KM

adicionado con carbón activado, a los 56 días de haber iniciado la siembra se observó el desarrollo de las primeras raíces.

Se ha reportado (Hossain, 2008) que la peptona es efectiva en la germinación y el crecimiento vigoroso de los protocormos. Los aminoácidos, amidas y vitaminas que se encuentran contenidos en la peptona son responsables del mejoramiento en la germinación de semillas (Oliva & Arditti, 1984). Lo anterior, sugiere que al agregar carbón activado y peptona al medio de cultivo se induce favorablemente el desarrollo de plántulas de *Epidendrum radicans*, sobre todo para la formación y proliferación de raíces.

En el medio de cultivo KM se encontraron las plántulas con mayor talla y mayor número de raíces, así como con la mayor cantidad de hojas; lo que confirma que el medio de cultivo KM favorece el desarrollo y crecimiento de las plántulas de *Epidendrum radicans*. Massaro, *et al* (2012) reportaron que el medio de cultivo MS con la mitad de la concentración de macronutrientes fue el más apropiado para el desarrollo de plántulas de *E. secundum*. Probablemente esto sucedió por la cantidad de nitratos y amonio que contiene el medio nutritivo KM.

Los medios de cultivo KM y Mitra beneficiaron el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Epidendrum radicans*, ya que en los tratamientos de dichos medios, se encontró que el mayor estadio fue de plántula con hojas, coincidiendo con Hossain (2008) en que, el medio de cultivo Mitra favorece a esta especie gracias a las vitaminas adicionadas a dicho medio.

En el medio de cultivo Humus suplementado con carbón activado y peptona se encontraron plántulas con hojas y raíz, siendo el máximo estadio, a diferencia de los demás tratamientos con Humus, esto quizá fue en respuesta a la peptona, cabe señalar, que las plántulas obtenidas en este medio son las de menor talla y grosor por lo que se puede deducir que la combinación de estos tres elementos (fertilizante humus, carbón activado y peptona) ayudan al desarrollo de hojas y raíces pero no al crecimiento en talla.

CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* se induce en todos los tratamientos.

El proceso de germinación de las semillas de *Epidendrum radicans* inicia a los 14 días en todos los tratamientos y culmina a los 56 días solamente en el medio con sales inorgánicas KM adicionado con Ca.

Los medios de cultivo que inducen el inicio del proceso de germinación de *Epidendrum radicans* en mayor porcentaje son el Mitra, de sales inorgánicas analíticas adicionado con carbón activado y peptona y el Superthrive[®], como fertilizante orgánico.

El medio nutritivo KM, con sales inorgánicas analíticas, adicionado con carbón activado, favorece el desarrollo ontogénico de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

La adición del carbón activado al medio nutritivo KM promueve la proliferación y diferenciación de plántulas con hojas y raíces con las mejores características morfofisiológicas, como pigmentación clorofílica y talla en *E. radicans*.

El desarrollo ontogénico de *Epidendrum radicans* comprendió seis estadios: embrión hinchado, embrión rompiendo la testa, protocormo, protocormo con primordio foliar, plántula con hojas y plántula con hojas y raíz.

Los seis estadios ontogénicos se desarrollan en todos los tratamientos, en algunos más tardíamente.

El desarrollo ontogénico se induce principalmente en los medios de cultivo con sales inorgánicas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda probar los fertilizantes orgánicos esterilizados en frío mediante filtración para comprobar su efectividad como componentes del medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, E.M.; B. J. Sánchez y A.M. Bañón, 2000. "Auxinas". *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcon-Bieto y Talón (Eds.) Interamericana-McGraw-Hill., 323 pp.
- Arditti, J and Ernst, R. 1992. Micropropagation of Orchids. Ed. John Willey & sons, Inc., NY, U.S. A.
- Arditti, J. 1972. El profesor Lewis Knudson y la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas: Cincuentenario. Orquídea.
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. Department of Developmental and cell Biology. Ed John Willey & Sons, Inc., NY, U.S.A.
- Arditti, J. y Ernst, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In; J. Arditti (ed.). Orchid biology: Reviews and perspectives. Vol III. Cornell University Press, Ithaca, N. Y.
- Baker, M. and C, Baker. 1998. Orchid species culture: *Pleione*, *Pescatorea*, *Pharus*, *Phalaenopsis*, *Pholidota* and *Phragmipedium*. Timber Press. Portland, USA.
- Bandurski, R.S., J.P. Slovi y J.D. Cohen, 1993. Auxinas. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Azcon-Bieto y Talon (Eds.) Interamericana-McGraw-Hill, 285-300 pp.
- Barba, A. A., Luna, R. S. y Romero, A, J. 2002. Orquideología Básica. Biotemas. U.I.B.V.FES. Zaragoza.
- Barket A.; I. Rani, S. Hayat and A. Ahmad, 2007. Effect of 4-Cl-indole-3-acetic acid on the seed germination of *Cicer arietinum* exposed to cadmium. *Acta Botánica Croat*, (66): 57-65.
- Batygina, T., E. Bragina and V. Vasilyeva. 2003. The Reproductive System and Germination in Orchids. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botánica* 45 (2): 21-34.
- Casco, A. C. e Iglesias C. M. 2005. Producción de biofertilizantes líquidos a base de lombricomposto. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

Chase, M.C., Cameron, K.M., Barret, R.L. and Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: K.W.

Chen, L.M.; J.T. Cheng, E.L. Chen, T.J. Yiu and Z.H. Liu, 2002. Naphtaleneacetic acid suppresses peroxidase activity during the induction of adventitious roots in soybean hypocotyls. *Plant Physiologic.*, (159): 1349-1354.

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-Rodríguez, R. 2006. Micropropagación y adaptación a condiciones ambientales de: *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins. (Orchidaceae). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de licenciatura.

Dearnaley, J. D. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. Review. *Mycorrhiza* 17:475 - 486.

Domínguez, A. 1989. Tratado de fertilización. Mundi prensa. 2a ed. Madrid.

Dressler, R. 1981. The Orchids; Natural History and classification. Harvard University Press. Cambridge, USA. 332 p. En: Montalvo, P. 1995. Germinación y propagación *in vitro* de la especie *Myrmecophila tibicinis* (Baterm) Rolfe (Orchidaceae). Tesis. Conkal, Yuc. México.

Dressler, R. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Discorides Press, Ortland.

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

Espinosa, J. 1997. Fertilización química y biológica de tres híbridos de orquídeas en condiciones de invernadero. Tesis. Colegio de postgraduados. Montecillo, México.

García, M. y M. Cuevas. 2000. Abonos, fertilizantes y aplicación. En: García, D.; J. Arceo e I. Miranda, Apuntes de agronomía II. Capítulo 6. Universidad Autónoma Chapingo. México: 156-167

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

- George, E. F. 1996. *Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd. Edington, Wilts. 2nd ed. England. pp. 575-1361
- Gernandt, D. 2007. Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México.
- Gravel, H. 1989. Étude de la germination et des premières étapes de la morphogenèse du *Cypripedium reginae* Walt. (Orchidaceae). Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, Montréal.
- Hadley, G. and Williamson, B. 1972. Features of mycorrhizal infection in some Malayan.
- Hágsater, E., Soto, M., Salazar, G., Jiménez, R., López, M. y Dressler, R.; 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín México, D.F.
- Halbinger, F. and M. Soto. 1997. Laelias of Mexico. *Orquídea* (México) XV. México.
- Harrison, C. R. 1973. Physiology and ultrastructure of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae) germination. These de doctorat. University of California.
- Harrison, C. and Arditti J. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanic Gazette*. 139:180-189.
- Hicks, J. 2000. Asymbiotic Technique of Orchid Seed Germination. Orchid Seedbank Project. United States of America.
- Hossain, M. 2008. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (orchidaceae). *African Journal of Biotechnology* 7(20): 3614-3619.
- Hurtado, D.; Merino, M. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. and Stevens, P.F. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland.
- 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, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*. 73: 1-25.

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

Krikorian, A.D. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical).

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

Liu, Z.H., I.C. Hsiao, and Y.W. Pan, 1996. "Effect of naphthaleneacetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyls cuttings of soybean during root formation". *Botanical Bulletin. Acad. Sci.*, 37: 247-253.

López-Roberts, C., Villegas-Alvarado, G., Mamani-Sánchez, B., Bermejo-Franco, 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, R. B. y Barba, A. 1993. Estudios Morfológicos de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr durante su germinación asimbiótica *in vitro*. In: Exporquidea. V Encuentro Latinoamericano de Orquideología Programa y resúmenes. Xalapa, Veracruz.

Manning, J.C., and Van Standen, J, 1987. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. *Australian Journal Botanical*. 35: 343-353.

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, M., Cázares, C., De la Cruz, L. y Flores, H. 2010. Germinación *in vitro* de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. Villahermosa, Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Mc Donald, E. 1999. *Orthos. All About Orchids*. Meredith Books. Des Moines, USA. 96p

McKendrick, S., 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.

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 GC, 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. 14:350-351.

Muñoz-Barrionuevo, M. 2011. Evaluación de medios de cultivo para la germinación “in vitro” de las orquídeas *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rchb. F. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.

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

NOM-059-ECOL-2010. Norma oficial mexicana, 2010. Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres en categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio.

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

Oliva, A.P. and Arditti, J. 1984. Seed germination of North American orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* y *Spirentes*. Botanical. Gazette. 145(4): 495-501.

Pedroza-Manrique, J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq. bajo condiciones *in vitro*. Revista Colombiana Biotecnológica. 1: 17-32.

Pierik, M. 1990. Cultivos *in vitro* de las plantas superiores. Trad. Ayerber-Mateo-Sagasta. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Pierik, R.L.M.; H.H.M. Steegmans and J. Hendriks, 1984. “The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of *in vitro* cultivated seedlings of Bromeliaceae”. *Scientia Horticulturae*, 24: 193-199.

Potisek, M., Sarmiento, M. y Puc, L. 1994. Germinación de semillas y su establecimiento *in vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem.

Pridgeon. A., Cribb, P. and Chase, M. 2006. Genera Orchidacearum: Epidendroideae. Oxford University Press (4):1

Rasmussen, F. 1985. In The families of monocotyledons: Structure, evolution and taxonomy (RM Dahlgren, H. Clifford, PF Yeo, Editors).

Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial Orchids from Seed to Micotrophic Plant. Cambridge University Press.

Rentoul, J. 1987. The specialist orchid grower. Timber Press. Portland.

Richardson, K. A., Peterson, R. L. and Currah, R.S. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hiperborea* (Orchidaceae). Canadian Journal of Botany. 70: 291-300.

Rivas, M., Warner, J y Bermudes, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. Revista de Biología Tropical. 46 (2).

Rivera-Dueñas, R., 2002. Guía ilustrada de 55 especies de Orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras. Carrera de desarrollo socioeconómico y ambiente.

Romero-Tirado, R. 2008. 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.

Sagee, O., M.M. Raviv, D. Becker and A. Cosse, 1992. "Involvement of rooting factors and free IAA in the rootability of *Citrus* species steem cuttings". *Scientia Horticulturae*, 51: 187-195.

Sánchez Saldaña, L. M., 2007. Revisión del complejo *Epidendrum difforme* Jacq. (Orchidaceae). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Tesis de Licenciatura.

Sanders, I. 2003. Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Trends in Plant Science. 8:143 - 154.

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.

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.

Sessler, J. 1978. Orchids and how to growth them. Prentice Hall. Englewood, USA.

Sharma SK, Tandon P, Mishra RR. 1991. Vitamins as related to axenic seed germination and seedling growth of *Cymbidium elegans* Lindl. And *Coelogyne punctulata* Lindl. J. Orchid Soc. Ind. 5(1,2):25-28.

Singh, F. 1993. *In vitro* Orchid Seed Germination and Cloning of Orchids. In: Plant Biotechnology. Science publishers, Inc. Lebanon, USA. pp. 289.

Solano G. R., 1999. Orchidaceae III. *Stelis*. En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 113. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.

Soto, M. A. y E. Hágsater. 1990. Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado preliminar de los taxa amenazados. En: J. Campillo Y F. Rivera (eds.), Áreas naturales protegidas en México y especies en Extinción. UNAM. México.

Soto, M. A.; 1993. "Population Studies in Mexican Orchids" en A. M. Pridgeon, (ed.) Proceedings of the 14th World Orchid Conference, Edinburgh.

Soto, M. A.; 2005. Regional Action Plan for the Orchids of Mexico, (estudio no publicado).

Stancato, G. & Faria, R. 1996. In vitro growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) In: Effects of macro and microelements. Lindleyana. 11 (1): 41-43

Stancato, G., Ferreira, M. y Cangiani, F. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. Bragantia, Campinas. 67(1): 51-57.

Stenberg, L. M. and Kane E. M. 1998. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. Lindleyana.13(2):101-112

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

Tisserat, B. and Jones, D. 1999. Clonal propagation of Orchids. In: Hall R D (Ed) Plant Cell Culture Protocols, CPRO-DLO. Wageningen.

Withner, C. L.; Krieger, R. E. 1985. The Orchids. Scientific Studies. Publishing Company. Florida.

Yang, J, Lee, H J.; Shin D H.; Oh SK.; Seon J K.; Paek, K Y.; Han K H.; 1999. Genetic tranformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. Plant Cell Reports 18: 978-984.

Yoder, J.A., Zettler, L. W., and Stewart, S. L. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seed and seedlings, and evidence for water uptake by means of micotrophy. Plant Science. 156; 145-150.

Zettler, W. L., Burkhead C J., and Marshall A. J. 1999. Use of mycorrhizal fungus from *Epidendrum Conopseum* To Germinate Seed of *Encyclia tampensis* *In vitro*. Lindleyana 14(2); 102-105.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

Orchidaceae. *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. [En línea]. Disponible en: <<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/orchidaceae/epidendrum-radians/fichas/ficha.htm#1>> (Noviembre 2011).

Cañas B, M. 1991. Cultivo asimbiótico in vitro en Orchidaceae. Disponible en <<http://acad.ucaldas.edu.co/jcg/fitotecnia/boletin/34/PROPAGACION%20IN%20VITRO%20DE%20ORQUIDEAS%20A%20PARTIR%20DE%20SEMILLA%20SEXUAL.pdf>> (Febrero 2010).

Miller, A. y Erston, J.V. 2010. Fisiología Vegetal. Disponible en <<http://www.aspaperu.org/boletines/bolfeb/tecnologia1.htm>> (Abril 2010).

ANEXO 1. Medios nutritivos

Cuadro1.- Composición de las sales inorgánicas analíticas de los medios nutritivos Kao & Mychayluk (KM) y Mitra (M) utilizados para la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

Sales inorgánicas	KM	M
	mgL ⁻¹	mgL ⁻¹
Macronutrientes		
MgSO ₄ 7H ₂ O	146.6	250
NH ₄ NO ₃	600	-
KH ₂ PO ₄	170	-
KNO ₃	190	180
CaCl ₂ 2H ₂ O	453	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	100
Ca(NO ₃) ₂	-	100
NaH ₂ PO ₄	-	150
KCl	300	-
Micronutrientes		
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2	0.05
H ₃ BO ₃	3	0.6
MnSO ₄ H ₂ O	10	0.4
Na ₂ Mo ₄ 2H ₂ O	0.25	0.05
KI	0.75	0.03
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.25	-
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	-
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.3	22.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	16.7

Cuadro 2.- Composición química del fertilizante orgánico comercial Superthrive® (S)* utilizado para la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

Vitamina B-1	0.09%
Ácido Naftalenacético	0.048%
Sólidos disueltos	Aprox. ¼ líquido total

*Se utilizaron 0.25 mL⁻¹

Superthrive® es un recuperador de plantas dañadas. Contiene más de 50 hormonas y vitaminas para recuperar, fortalecer plantas y maximizar su crecimiento potencial. Sirve además para sanar plantas de exterior e interior, flores, árboles, etc. Se usa especialmente en orquídeas y bonsái. Es un suplemento a la alimentación de plantas. Contiene vitaminas "B" y hormonas para estimular el sistema de raíz de la planta (<http://superthrive.com/gallon.html>).

Cuadro 3.- Composición química del fertilizante orgánico comercial XIBANI® Ácido Húmico y Fúlvico (lombrihumus) (H)** utilizado para la germinación asimbiótica *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

		mgKg ⁻¹
NH ₄	asimilable	28.7
NO ₃	asimilable	2.1
P	asimilable	54
K	asimilable	892
Ca	asimilable	81
Mg	asimilable	73
Na	asimilable	126
Fe	asimilable	5.2
Cu	asimilable	0.23
Mn	asimilable	1.40
Zn	asimilable	0.28
Materia orgánica	asimilable	58

**Se utilizaron 5 mL⁻¹

XIBANI® surge como la mejor alternativa para los suelos gastados por el excesivo trabajo en la aplicación indiscriminada de agroquímicos, el lombrihumus XIBANI®, que al ser un producto de origen natural que a través del composteo de estiércoles seleccionados y el posterior trabajo de lombrices californianas, se obtiene un buen abono orgánico (información basada en el envase).

ANEXO 2. Resultados

Cuadro 1.- Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de *E. radicans*

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrados	Coefficiente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A-Tratamiento	158193.0	11	14381.2	103.08	0.0000
B-Días	416442.0	16	26027.6	186.55	0.0000
INTERACCIONES					
AB	24705.5	176	140.372	1.01	0.4693
RESIDUO	113848.0	816	139.520		
TOTAL (CORREGIDO)	713189.0	1019			

Todos los coeficientes-F están basados en el error residual de los medios cuadrados.

Cuadro 2.- Prueba de rangos múltiples para los porcentajes de germinación de *E. radicans* por tratamientos.

Método: 95.0 porciento Tukey HSD				
Tratamiento	Cuenta	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
10	85	38.3412	1.28118	X
8	85	71.8588	1.28118	X
12	85	73.9176	1.28118	X
11	85	74.4118	1.28118	X
2	85	77.4941	1.28118	X
9	85	77.6588	1.28118	X
7	85	79.8706	1.28118	X
4	85	82.0	1.28118	X
3	85	83.0353	1.28118	X
5	85	85.1647	1.28118	X
1	85	86.4	1.28118	X
6	85	87.1176	1.28118	X

Cuadro 3.- Prueba de rangos múltiples para los porcentajes de germinación de *E. radicans* por días de cultivo.

Método: 95.0 porciento Tukey HSD				
Días	Cuenta	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
7	60	0.0	1.5249	X
14	60	55.3833	1.5249	X
21	60	78.5833	1.5249	X
28	60	82.65	1.5249	X
35	60	83.2833	1.5249	X
42	60	83.2833	1.5249	X
49	60	83.2833	1.5249	X
98	60	83.3	1.5249	X
84	60	83.3	1.5249	X
105	60	83.3	1.5249	X
77	60	83.3	1.5249	X
119	60	83.3	1.5249	X
112	60	83.3	1.5249	X
91	60	83.3	1.5249	X
70	60	83.3	1.5249	X
63	60	83.3	1.5249	X
56	60	83.3	1.5249	X

Cuadro 4.- Análisis de varianza del Índice de desarrollo de las semillas de *E. radicans* durante su germinación *in vitro*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrados	F-Coefficiente	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:tratamiento	3.34173E6	11	303794.0	74.68	0.0000
B:días	6.8011E6	16	425069.0	104.50	0.0000
INTERACCIONES					
AB	847194.0	176	4813.6	1.18	0.0691
RESIDUAL	3.31925E6	816	4067.7		
TOTAL (CORREGIDO)	1.43093E7	1019			

Todas las proporciones de F están basadas en el error residual de medios cuadrados.

Cuadro 5.- Prueba de rangos múltiples de porcentajes del índice de desarrollo de semillas de *E. radicans* durante su germinación por tratamientos.

Método: 95.0 porciento Tukey HSD				
Tratamiento	Cuenta	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogeneos
10	85	108.412	6.91776	X
1	85	195.0	6.91776	X
11	85	216.106	6.91776	X
2	85	237.412	6.91776	X
4	85	255.118	6.91776	X
3	85	257.835	6.91776	X
7	85	267.082	6.91776	X
8	85	292.506	6.91776	X
12	85	305.141	6.91776	X
5	85	306.694	6.91776	X
9	85	307.529	6.91776	X
6	85	308.836	6.91776	X

Cuadro 6.- Prueba de rangos múltiples de porcentajes del índice de desarrollo de semillas de *E. radicans* durante su germinación por tratamientos.

Método: 95.0 porciento Tukey HSD				
Días	Cuenta	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogeneos
7	60	65.9167	8.23378	X
14	60	136.633	8.23378	X
21	60	167.4	8.23378	X
28	60	188.15	8.23378	X
35	60	214.533	8.23378	X
42	60	226.1	8.23378	X
49	60	229.533	8.23378	X
56	60	252.183	8.23378	X
63	60	262.083	8.23378	X
70	60	272.383	8.23378	X
77	60	286.267	8.23378	X
84	60	298.0	8.23378	X
91	60	313.233	8.23378	X
98	60	326.567	8.23378	X
105	60	342.433	8.23378	X
112	60	367.633	8.23378	X
119	60	382.65	8.23378	X

Cuadro 7.- Análisis de varianza de la altura de los embriones hinchados o Estadío 1 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadros	Df	Media de Cuadros	F-Coefficiente	P-Valor
Entre grupos	0.000804444	2	0.000402222	1.16	0.3219
Dentro de grupos	0.0145067	42	0.000345397		
Total (Corr.)	0.0153111	44			

Cuadro 8.- Prueba de rangos múltiples de la altura de los embriones hinchados o Estadío 1 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Método: 95.0 porciento LSD			
Tratamiento	Cuenta	Media	Grupos Homogeneos
S	15	0.0586667	X
H	15	0.066	X
H+Ca	15	0.0686667	X

Cuadro 9.- Análisis de varianza de la altura de los embriones rompiendo la testa o Estadío 2 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadros	Df	Media Cuadros	F-Coefficiente	P-Valor
Entre grupos	0.00549778	2	0.00274889	12.08	0.0001
Dentro de grupos	0.00956	42	0.000227619		
Total (Corr.)	0.0150578	44			

Cuadro 10.- Prueba de rangos múltiples de la altura de los embriones rompiendo la testa o Estadío 2 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Método: 95.0 porciento LSD			
Tratamiento	Cuenta	Media	Grupos Homogeneos
S	15	0.0826667	X
H	15	0.104667	X
H+Ca	15	0.107333	X

Cuadro 11.- Análisis de varianza de la altura de los protocormos o Estadío 3 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadros	Df	Media Cuadros	F-Coefficiente	P-Valor
Entre grupos	0.00440444	2	0.00220222	0.13	0.8756
Dentro de grupos	0.694253	42	0.0165298		
Total (Corr.)	0.698658	44			

Cuadro12.- Prueba de rangos múltiples de la altura de los protocormos o Estadío 3 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Método: 95.0 porciento LSD			
Tratamiento	Cuenta	Media	Grupos Homogeneos
H+Ca	15	0.124667	X
S	15	0.142	X
H	15	0.148	X

Cuadro 13.- Análisis de varianza de la altura de los protocormos con primordio foliar o Estadío 4 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	DF	Media Cuadrados	F-Coefficiente	P-Valor
Entre grupos	0.278347	7	0.0397638	15.08	0.0000
Dentro de grupos	0.295253	112	0.00263619		
Total (Corr.)	0.5736	119			

Cuadro 14.- Prueba de rangos múltiples de la altura de los protocormos con primordio foliar o Estadío 4 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Método: 95.0 porciento LSD			
Tratamiento	Cuenta	Media	Grupos Homogeneos
S	15	0.124	X
R	15	0.180667	X
RM	15	0.188	XX
H+Ca	15	0.196	XX
R+Ca	15	0.219333	XX
S+Ca+P	15	0.222	XX
R+Ca+P	15	0.253333	X
S+Ca	15	0.296667	X

Cuadro 15.- Análisis de varianza de la altura de las plántulas con hojas o Estadío 5 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	DF	Media Cuadrados	F-Coefficiente	P-Valor
Entre grupos	30.752	9	3.41689	23.78	0.0000
Dentro de grupos	20.1141	140	0.143672		
Total (Corr.)	50.8661	149			

Cuadro 16.- Prueba de rangos múltiples de la altura de las plántulas con hojas o Estadío 5 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Método: 95.0 porciento LSD			
Tratamiento	Cuenta	Media	Grupos Homogeneous
H+Ca	15	0.250667	X
H	15	0.424667	XX
S+Ca+P	15	0.582667	XX
H+Ca	15	0.616	XX
KH	15	0.764667	X
H+Ca+P	15	1.050667	X
H+Ca+P	15	1.32	XX
KH+Ca+P	15	1.348	X
S+Ca	15	1.420667	XX
KH+Ca	15	1.64133	X

Cuadro 17.- Análisis de varianza de la altura de las plántulas con hojas y raíz o Estadío 6 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrados	F-Coefficiente	P-Valor
Entre grupos	119.114	5	23.8228	16.21	0.0000
Dentro de grupos	123.468	84	1.46985		
Total (Corr.)	242.581	89			

Cuadro 18.- Prueba de rangos múltiples de la altura de las plántulas con hojas y raíz o Estadío 6 a los 120 días de cultivo de *E. radicans* por tratamiento.

Método: 95.0 porciento LSD			
Tratamiento	Cuenta	Media	Grupos Homogeneous
S+Ca+P	15	0.400667	X
H+Ca+P	15	2.118	X
S+Ca	15	2.41667	X
H+Ca+P	15	2.572	X
KH+Ca	15	2.67	X
KH	15	4.34	X