



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**Germinación, desarrollo *in vitro* y aclimatización de:  
*Dichaea glauca* (Sw.) Lindl. y *Jacquiniella equitantifolia*  
(Ames) Dressler. (Orchidaceae)**

**Tesis que para obtener el título de Bióloga presenta:**

Romero Aguilar Lizbeth Janet

**Directora de Tesis:**

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales



*Dichaea glauca*



*Jacquiniella equitantifolia*

Unidad de Investigación en Biología Vegetal

Ciudad de México, Febrero 2018

Proyecto PAPIME PE207715



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo de tesis se realizó bajo la dirección de la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales en la Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Apoyado por el proyecto PAPIME con clave PE207715.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **ROMERO AGUILAR LIZBETH JANET**, con número de cuenta **307192596**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **27 de febrero de 2018** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Biól. JUAN ROMERO ARREDONDO
- VOCAL** M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES
- SECRETARIO** M. en C. GENARO MONTAÑO ARIAS
- SUPLENTE** Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO
- SUPLENTE** M. en C. FLORENCIA BECERRIL CRUZ

El título de la tesis que presenta es: **Germinación, desarrollo *in vitro* y aclimatización de: *Dichaea glauca* (Sw.) Lindl. y *Jacquiniella equitantifolia* (Ames) Dressler. (Orchidaceae).**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, a 17 de enero de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

“Kemaj aksaj kij tojkaj koujme uan kijmattok ke amoj kemaj tatampa moj sewis, kij mattiwa kenij se nemi in taltikpaj”

“Cuando un hombre planta árboles bajo los cuales sabe muy bien que nunca se sentará, ha empezado a descubrir el significado de la vida”

**Elton Trueblood**



## **Agradecimientos**

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una formación académica.

A la Unidad de Investigación en Biología Vegetal por el apoyo de sus instalaciones para esta investigación.

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, directora de esta tesis, por compartir su tiempo, experiencia, amistad y cariño. Por la confianza y todo el apoyo manifestado durante este tiempo.

A los miembros del jurado:

Dra. Hortensia Rosas Acevedo

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

M. en C. Florencia Becerril Cruz

Biól. Juan Romero Arredondo

M. en C. Genaro Montaña Arias

Por las aportaciones realizadas para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Biól. Juan Romero Arredondo, por su colaboración en la obtención del material fotográfico.

Al Dr. Isaías Hazarmabeth Salgado Ugarte, por su ayuda en el manejo estadístico de los datos e interpretación de los mismos.

A la Q.F.B. Graciela Rojas Vázquez, por sus consejos y apoyo con los trámites administrativos.

A las mujeres que influyeron durante mi formación académica, Biól. Yolanda Cortes Altamirano, Dra. Bertha Peña Mendoza, Biól. Elvia García Santos, Dra. Esther Matiana García Amador, Dra. Alejandrina Graciela Ávila Ortiz, Biól. Leticia López Vicente, Dra. Hortensia Rosas Acevedo, M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, M. en C. Florencia Becerril Cruz, Biól. Aida Zapata Cruz, M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, M. en C. Socorro García Villegas y M. en F. Idalia L. Flores Gómez.

Al Jardín Botánico Xoxoctic y a la Sra. Juana María Cristina Eleuteria García Juárez, por proporcionarme el material biológico con el cual se llevó a cabo esta investigación, así como sus instalaciones para la aclimatización de las plantas.

Al Herbario AMO, al Ing. Eric Hágsater Gartenberg, Biól. Luis Martín Sánchez Saldaña † y al Biól. Rolando Jiménez Machorro.

## **Dedicatorias**

A mis padres, Manuel Romero y Rosa Aguilar, por estar siempre conmigo en cada uno de mis pasos, apoyando incondicionalmente mis decisiones, por darme la oportunidad de tener una educación y por todos los sacrificios que realizaron para que yo fuera alguien en la vida.

A mi hermano Omar Romero, por sus consejos, apoyo y cariño.

A mis abuelos, Juana Eloísa †, Daniel Aguilar †, Piedad Galicia †, Alejandra Martínez † y David Álvarez, por ser una parte fundamental en mi vida.

A toda mi familia, al Club de los desgraciados, Ali, Claudia, Erika, Santiago, Rosario, Zarahi, Zoe, Alinne, y Elvira, por consentirme, cuidarme y apoyarme.

A mis compañeros de laboratorio, Paola, Irving, Fernando, Víctor, Daryl, Betty, Montse, Lorena, Fernando, Luis, Erick, Araceli, Abel, Wendy, María Fernanda, Andrea, Irlanda, Jorge, Karen, por hacer de cada practica de campo una experiencia inigualable.

A mis amigos de Cuetzalan, Raúl, José Luis, Serafín, Reina y Mariano, por siempre hacer mi estancia muy amena, las caminatas en el jardín, las escapadas nocturnas para conseguir la cena, los largos paseos por Yohualichan, por esas razones y más “No Yolotzin mokauaj Cuetzalan”.

A mis amigos Andy, Paty, Ilse, Karen, Marco, Cecilia, Jesús, Roció, Danna y Gustavo, por todos los momentos que pasamos juntos, las risas, las enseñanzas, el aprendizaje, los quiero muchísimo.

A Juan Romero Arredondo, por brindarme su amistad, sus sabios consejos, sus regaños oportunos, su apoyo en las buenas y malas, por ser mi confidente y estar a mi lado en cada logro, entre otras cosas de las cuales jamás terminare de agradecerle.

A Aida Zapata, por sus consejos de vida, por su amistad, su cariño, su apoyo en los momentos difíciles y las reconfortantes platicas.

A Héctor Ramírez, por ser mi apoyo día con día, estar conmigo en los momentos difíciles, que para su mala suerte han sido bastantes, por siempre estar en el momento adecuado para hacerme sonreír.

## ÍNDICE

<b><u>Resumen</u></b> .....	1
<b><u>Introducción</u></b> .....	2
<b><u>Marco teórico</u></b> .....	4
<b>Distribución y área de estudio</b> .....	4
<b>Generalidades de las Orquídeas</b>	
Clasificación de las orquídeas por su forma de vida.....	6
Clasificación de las orquídeas por su hábito de crecimiento .....	6
Tallos.....	7
Hojas .....	7
Raíces .....	8
Inflorescencias .....	8
Flores.....	9
Partes de una flor .....	9
Polinarios y polinios .....	11
Resupinación.....	11
Polinización.....	12
Semillas.....	13
Micorrizas .....	13
<b>Germinación <i>in vitro</i></b> .....	14
<b>Índice de desarrollo</b> .....	15
<b>Medio de cultivo</b>	
Sales inorgánicas (minerales). .....	16
Compuestos orgánicos. ....	16
Preparaciones naturales complejas. ....	17
Materiales inertes de soporte. ....	17
<b>Medios nutritivos</b>	
Murashige y Skoog, 1962 (MS).....	18
Kao y Michayluk, 1982 (KM) .....	18
Peters 24:8:16.....	18
<b>Aclimatización</b> .....	19



<b>Sustratos</b>	
Corteza .....	21
Fibra de Coco .....	21
Sphagnum .....	22
Cero grueso .....	22
<b>Descripción de las especies</b>	
Género <i>Dichaea</i> (Sw.) Lindl.....	23
Descripción botánica de <i>Dichaea glauca</i> (Sw.) Lindl., Gen. & Sp. Orch. PI. 209. 1833.....	24
Género <i>Jacquiniella</i> (Ames) Dressler.....	26
Descripción botánica de <i>Jacquiniella equitantifolia</i> (Ames) Dressler, Taxon 15(6): 242. 1966.....	27
<b><u>Antecedentes</u></b> .....	29
<b><u>Justificación</u></b> .....	31
<b><u>Hipótesis</u></b> .....	32
<b><u>Objetivos</u></b>	
Objetivo general .....	32
Objetivos particulares .....	32
<b><u>Material</u></b>	
Material biológico .....	33
<b><u>Método</u></b>	
Viabilidad de las semillas .....	33
Medios de cultivo para la germinación y el desarrollo .....	34
Desinfestación de semillas .....	34
Siembra de semillas.....	35
Evaluación de la germinación.....	35
Evaluación del desarrollo ontogénico.....	35
Evaluación del índice de desarrollo.....	36
Medios de cultivo para el crecimiento.....	37
Subcultivos para el crecimiento de las plántulas de orquídeas.....	37
Evaluación del crecimiento de las plántulas.....	38

Trasplante de plántulas de <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i> .....	38
Preparación de las plántulas para el trasplante.....	38
Aclimatización de <i>Dichaea glauca</i> .....	39
Aclimatización de <i>Jacquiniella equitantifolia</i> .....	39
Evaluación de la aclimatización .....	39
Diseño estadístico .....	39
<b><u>Resultados y Análisis de Resultados</u></b>	
Evaluación de la viabilidad .....	41
<b>Evaluación de la germinación</b>	
<i>Dichaea glauca</i> .....	42
<i>Jacquiniella equitantifolia</i> . .....	44
<b>Evaluación del desarrollo ontogénico</b>	
<i>Dichaea glauca</i> .....	46
<i>Jacquiniella equitantifolia</i> . .....	48
<b>Índice de desarrollo</b>	
<i>Dichaea glauca</i> .....	50
<i>Jacquiniella equitantifolia</i> . .....	55
<b>Evaluación del crecimiento de las plántulas</b>	
<i>Dichaea glauca</i> .....	60
<i>Jacquiniella equitantifolia</i> . .....	63
<b>Evaluación de la aclimatización</b>	
<i>Dichaea glauca</i> .....	66
<i>Jacquiniella equitantifolia</i> . .....	67
XOXOCTIC .....	69
Herbario AMO .....	71
<b><u>Discusión</u></b> .....	73
<b><u>Conclusiones</u></b> .....	78
<b><u>Referencias</u></b> .....	79
<b><u>Anexos</u></b>	
Anexo 1 (Tipos de pseudobulbos) .....	90
Anexo 2 (Tipos de hojas) .....	91

<b>Anexo 3 (Formas de ápices, bases y márgenes de hojas presentes en orquídeas).</b>	92
<b>Anexo 4 (Origen de la inflorescencia)</b>	94
<b>Anexo 5 (Tipos de inflorescencias)</b>	95
<b>Anexo 6 (Composición del medio de cultivo Murashige &amp; Skoog (MS) al 100%)</b>	96
<b>Anexo 7 (Composición del medio de cultivo Kao &amp; Michayluk (KM) al 100%)</b>	97
<b>Anexo 8 (Composición del medio de cultivo Peters 24-8-16 al 100%)</b>	98
<b>Anexo 9 (Estadíos de germinación para orquídeas)</b>	99
<b>Anexo 10 (Evaluación de la germinación de <i>Dichaea glauca</i>)</b>	100
<b>Anexo 11 (Evaluación de la germinación de <i>Jacqiniella equitantifolia</i>)</b>	102
<b>Anexo 12 (Evaluación del desarrollo ontogénico de <i>Dichaea glauca</i>)</b>	104
<b>Anexo 13 (Evaluación del desarrollo ontogénico de <i>Jacqiniella equitantifolia</i>)</b>	106
<b>Anexo 14 (Evaluación del índice de desarrollo de <i>Dichaea glauca</i>)</b>	108
<b>Anexo 15 (Evaluación del índice de desarrollo de <i>Jacqiniella equitantifolia</i>)</b>	110
<b>Anexo 16 (Evaluación del crecimiento de <i>Dichaea glauca</i>)</b>	112
<b>Anexo 17 (Evaluación del crecimiento de <i>Jacqiniella equitantifolia</i>)</b>	113
<b>Anexo 18 (Protocolo de cultivo <i>in vitro</i> para <i>Dichaea glauca</i>)</b>	114
<b>Anexo 19 (Protocolo de cultivo <i>in vitro</i> para <i>Jacqiniella equitantifolia</i>)</b>	116

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Municipio de Cuetzalan del Progreso Puebla.....	5
<b>Figura 2.</b> Jardín Botánico Xoxoctic .....	5
<b>Figura 3.</b> Tipos de hábito de crecimiento .....	6
<b>Figura 4.</b> Raíces de una orquídea epífita.....	8
<b>Figura 5.</b> Simetría bilateral en flores de orquídeas .....	9
<b>Figura 6.</b> Estructuras de una flor de orquídea ( <i>Chysis limminghei</i> ).....	9
<b>Figura 7.</b> Corte longitudinal de las partes de una flor.....	10
<b>Figura 8.</b> Corte longitudinal de la columna y polinios .....	10
<b>Figura 9.</b> Polinario .....	11
<b>Figura 10.</b> Resupinación .....	11
<b>Figura 11.</b> Cápsula de orquídea .....	12
<b>Figura 12.</b> Semilla de orquídea .....	13
<b>Figura 13.</b> Estadios ontogénicos de <i>Laelia sp.</i> .....	15
<b>Figura 14.</b> <i>Dichaea glauca</i> (Sw.) Lindl., Gen. & Sp. Orch. Pl. 209. 1833.....	25
<b>Figura 15.</b> <i>Jacquiniella equitantifolia</i> (Ames) Dressler .....	28
<b>Figura 16.</b> Regiones Terrestres Prioritarias de México .....	31
<b>Figura 17.</b> Comercio ilegal de orquídeas, “La Plazuela” .....	31
<b>Figura 18.</b> Frutos maduros de <i>Dichaea glauca</i> y <i>Jacquiniella equitantifolia</i> .....	33
<b>Figura 19.</b> Semillas de orquídea y técnica de los sobres .....	33
<b>Figura 20.</b> Preparación de los medios nutritivos MS y KM .....	34
<b>Figura 21.</b> Sobres de semilla previos a la desinfestación .....	34
<b>Figura 22.</b> Semillas en medio nutritivo.....	35
<b>Figura 23.</b> Algunos estadios presentes en la germinación .....	35
<b>Figura 24.</b> Estadio 4 “Protocormo con brote apical”, presente en el desarrollo .....	35
<b>Figura 25.</b> Estadios ontogénicos registrados durante el desarrollo de la germinación <i>in vitro</i> de <i>Dichaea glauca</i> y <i>Jacquiniella equitantifolia</i> .....	36
<b>Figura 26.</b> Medio empleado para el crecimiento de las plántulas.....	37
<b>Figura 27.</b> Ejemplar de <i>Dichaea glauca</i> , preparada para la evaluación del crecimiento ....	37
<b>Figura 28.</b> Evaluación del crecimiento .....	38
<b>Figura 29.</b> Plantas de <i>J. equitantifolia</i> .....	38

<b>Figura 30.</b> Sustratos y mezclas .....	39
<b>Figura 31.</b> Plantas de <i>J. equitantifolia</i> en la mezcla de corteza + fibra de coco .....	39
<b>Figura 32.</b> Evaluación de la viabilidad con TTC .....	41
<b>Figura 33.</b> Germinación de <i>Dichaea glauca</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.....	42
<b>Figura 34.</b> Comparación de medias de los porcentajes de germinación de <i>D. glauca</i> , independientemente del tiempo de evaluación .....	43
<b>Figura 35.</b> Comparación del porcentaje de germinación de <i>D. glauca</i> , a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS .....	43
<b>Figura 36.</b> Germinación de <i>Jacquiniella equitantifolia</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos .....	44
<b>Figura 37.</b> Comparación de medias de los porcentaje de germinación de <i>J. equitantifolia</i> , independientemente del tiempo de evaluación .....	45
<b>Figura 38.</b> Comparación del porcentaje de germinación de <i>J. equitantifolia</i> , a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS .....	45
<b>Figura 39.</b> Desarrollo ontogénico de <i>Dichaea glauca</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.....	46
<b>Figura 40.</b> Comparación de las medias de la evaluación del desarrollo de <i>D. glauca</i> independientemente del tiempo .....	47
<b>Figura 41.</b> Evaluación del desarrollo de <i>D. glauca</i> , a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS .....	47
<b>Figura 42.</b> Desarrollo ontogénico de <i>Jacquiniella equitantifolia</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.....	48
<b>Figura 43.</b> Comparación de medias de la evaluación del desarrollo de <i>J. equitantifolia</i> independientemente del tiempo .....	49
<b>Figura 44.</b> Evaluación del desarrollo de <i>Jacquiniella equitantifolia</i> , a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS .....	49
<b>Figura 45.</b> Índice de desarrollo de <i>Dichaea glauca</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.....	50
<b>Figura 46.</b> Comparación de medias de la evaluación del índice de desarrollo de <i>D. glauca</i> , independientemente del tiempo .....	51
<b>Figura 47.</b> Evaluación del índice de desarrollo de <i>Dichaea glauca</i> durante su germinación, a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos.....	51
<b>Figura 48.</b> Comparación de los porcentajes de los estadios alcanzados por tratamiento de <i>D. glauca</i> , a los 287 días después de la siembra.....	53

<b>Figura 49.</b> Estadios ontogénicos de <i>Dichaea glauca</i> .....	54
<b>Figura 50.</b> Índice de desarrollo de <i>Jacquiella equitantifolia</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos .....	55
<b>Figura 51.</b> Comparación de medias de la evaluación del índice de desarrollo de <i>J. equitantifolia</i> , independientemente del tiempo .....	56
<b>Figura 52.</b> Evaluación del índice de desarrollo de <i>J. equitantifolia</i> durante su germinación, a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos .....	56
<b>Figura 53.</b> Comparación de los porcentajes de los estadios alcanzados por tratamiento de <i>J. equitantifolia</i> , a los 287 días después de la siembra .....	58
<b>Figura 54.</b> Estadios ontogénicos de <i>Jacquiella equitantifolia</i> .....	59
<b>Figura 55.</b> Crecimiento de <i>Dichaea glauca</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.....	60
<b>Figura 56.</b> Comparación de medias de la evaluación del crecimiento de <i>D. glauca</i> , independientemente del tiempo .....	61
<b>Figura 57.</b> Evaluación del crecimiento de <i>D. glauca</i> , a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos.....	62
<b>Figura 58.</b> <i>D. glauca</i> en medio MS.....	61
<b>Figura 59.</b> Evaluación del crecimiento de <i>D. glauca</i> .....	62
<b>Figura 60.</b> Crecimiento de <i>Jacquiella equitantifolia</i> , a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos .....	63
<b>Figura 61.</b> Comparación de medias de la evaluación del crecimiento de <i>J. equitantifolia</i> , independientemente del tiempo .....	64
<b>Figura 62.</b> Evaluación del crecimiento de <i>J. equitantifolia</i> , a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos.....	65
<b>Figura 63.</b> Raíces de <i>J. equitantifolia</i> en medio MS.....	64
<b>Figura 64.</b> Evaluación del crecimiento de <i>J. equitantifolia</i> .....	65
<b>Figura 65.</b> Plantas de <i>D. glauca</i> recién trasplantadas y en proceso de aclimatización .....	66
<b>Figura 66.</b> Plantas de <i>Dichaea glauca</i> en corteza de pino-encino + fibra de coco (2:1) a los 40, 45 y 50 días después del trasplante .....	66
<b>Figura 67.</b> Plantas de <i>J. equitantifolia</i> 120 días después del trasplante.....	67
<b>Figura 68.</b> Sistema 1 .....	68
<b>Figura 69.</b> Sistema 2 .....	68
<b>Figura 70.</b> Alumnos de la UIBV, preparándose para el trasplante .....	69
<b>Figura 71.</b> Plantas de <i>J. equitantifolia</i> , listas para ser colocadas en el sustrato.....	69

<b>Figura 72.</b> Plantas de <i>J. equitantifolia</i> en el sustrato .....	69
<b>Figura 73.</b> Plantas de <i>J. equitantifolia</i> .....	70
<b>Figura 74.</b> Planta adulta de <i>J. equitantifolia</i> que forma parte de la colección de plantas vivas del herbario AMO.....	71
<b>Figura 75.</b> Plantas de <i>J. equitantifolia</i> , propagadas desde semilla en la UIBV que ahora forman parte de la colección de plantas vivas del herbario A.M.O. ....	72
<b>Tabla 1.</b> Antecedentes sobre cultivo <i>in vitro</i> y aclimatización de géneros afines a <i>Jacquiiniella</i> .....	29
<b>Tabla 2.</b> Viabilidad de semillas maduras de <i>D. glauca</i> y <i>J. equitantifolia</i> .....	41
<b>Tabla 3.</b> Supervivencia de <i>D. glauca</i> durante la aclimatización después de 50 días .....	66
<b>Tabla 4.</b> Supervivencia de <i>J. equitantifolia</i> durante la aclimatización después de 120 días.....	67
<b>Tabla 5.</b> Supervivencia de <i>J. equitantifolia</i> durante la aclimatización en XOXOCTIC .....	70
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de aclimatización de <i>J. equitantifolia</i> en el herbario AMO .....	71

## Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo de germinación, desarrollo fenológico, crecimiento *in vitro* y aclimatización para *Dichaea glauca* y *Jacqiniella equitantifolia*, dos especies de orquídeas mexicanas, empleando la técnica de micropropagación a partir de semillas. El material biológico fue donado por la U.M.A. Jardín Botánico Xoxoctic ubicado en Cuetzalán del Progreso, estado de Puebla. Las semillas proporcionadas fueron desinfectadas con etanol al 70%, una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% y lavadas con agua destilada estéril para la siembra bajo condiciones asépticas. Los medios nutritivos empleados para la germinación y desarrollo fueron: Murashige y Skoog (MS) y Kao y Michayluck (KM), ambos al 50% de las sales inorgánicas, adicionados con  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de niacina,  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de piridoxina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de myo-inositol,  $30 \text{ grL}^{-1}$  de sacarosa,  $5 \text{ grL}^{-1}$  de agar gel,  $1 \text{ grL}^{-1}$  de carbón activado y suplementados con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de papilla de plátano Gerber®. Para el crecimiento de las plántulas se utilizó, además de los medios MS y KM, el fertilizante comercial Peters al 12%. Se registraron semanalmente, la germinación de las semillas hasta los 238 días, el desarrollo e Índice (I.D.) hasta los 287 días y el crecimiento de las plántulas se evaluó durante 120 días después del subcultivo de las plántulas. La aclimatización de las plantas se realizó probando diferentes sustratos y mezclas, fue evaluada 120 días después de ser trasplantadas a condiciones *ex vitro*. Se tomaron registros fotográficos. Se estableció si existieron diferencias significativas entre los tratamientos y a través del tiempo de cultivo. El medio nutritivo KM, al 50% de sus sales basales, induce la germinación de las semillas de *Dichaea glauca* a los 56 días de cultivo y alcanzan el máximo porcentaje a los 98 días con 71%, el mayor estadio de desarrollo ontogénico que se promovió fue el de plántulas con raíz y pseudobulbo a los 168 días y el valor del I.D. más alto a los 245 días, con 497, donde el 3% de los protocormos ya presentaban brote apical y el 97% plántulas con hojas iniciales. El medio nutritivo KM fue el óptimo para el crecimiento de *Dichaea glauca*, pues las plántulas presentaban la parte vegetativa elongada y desarrollaron una mayor cobertura de raíces. La aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro* fue nula.

El medio nutritivo KM, al 50% de sus sales basales, induce la germinación de las semillas de *Jacqiniella equitantifolia* a los 28 días de cultivo y alcanza el máximo porcentaje a los 63 días con 97%, el mayor estadio de desarrollo ontogénico que se alcanzó fue plántulas con raíz y pseudobulbo a los 175 días en el medio nutritivo MS y el valor del I.D. más alto a los 266 días, con 772, donde el 28% de los individuos que consiguieron germinar, se mantuvieron en el estadio 7 y el 72% restante alcanzó el estadio plántulas con pseudobulbo y raíces. El medio nutritivo MS fue el óptimo para el crecimiento de *Jacqiniella equitantifolia*, pues las plántulas presentaban la parte vegetativa elongada y desarrollaron una mayor cobertura de raíces. La aclimatización, fue favorecida en la mezcla de corteza de pino-encino + fibra de coco, junto con el sistema 2, pues en esta combinación se registró la formación de hojas, raíces y nuevos brotes, obteniendo un porcentaje de plántulas aclimatizadas de 65%. Se concluye que para la germinación, desarrollo y crecimiento *in vitro* de *D. glauca* y *J. equitantifolia* el medio nutritivo KM y MS, respectivamente, resultaron ser los más eficientes, estableciéndose así el protocolo de cultivo *in vitro*.



## **Introducción**

México está considerado como uno de los países más biodiversos del mundo. Algunos autores como Mittermeir (1988), lo ubican en el cuarto lugar, únicamente superado por Brasil, Colombia e Indonesia. Se ha señalado que el país contiene aproximadamente el 12% de la biodiversidad total del planeta. Dentro de esta diversidad biológica de México destaca la familia Orchidaceae, una de las más diversas dentro de las angiospermas, solamente superada en número de géneros y especies por las familias Asteraceae y Fabaceae.

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial (Chase, Cameron, Barrett & Freudenstein, 2003; Dressler, 2005). México, alberga una notable riqueza de orquídeas y han sido registrados en el país alrededor de 1260 especies y 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005).

Este número de taxa continúa incrementándose por el descubrimiento tanto de especies nuevas para la ciencia como de especies que eran conocidas en otros países, pero no habían sido encontradas en México. Se estima que alrededor del 40% de las orquídeas mexicanas son endémicas (Soto, 1996). Para el estado de Puebla, el conocimiento que se tiene de la orquideoflora proviene básicamente de los listados disponibles para orquídeas a nivel nacional, como los de Espejo y López (1997, 1998), Soto (1988) y Williams (1951), reportan la presencia en Puebla de 146 especies de orquídeas correspondientes a 58 géneros (como se citó en Pérez, *et al.*, 2010). Para Cuetzalan del Progreso, Puebla se tiene registradas 92 especies de orquídeas lo que representa el 46% de la orquideoflora registrada para este estado (Cetzal-Ix *et al.*, 2014).

Si bien sabemos que la familia Orchidaceae, es una de las más diversas, también es una de las más vulnerables, por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta, por el gran interés comercial que ha despertado desde hace muchos años, lo que ha favorecido un extenso mercado, en el que tanto las plantas como las flores de corte se cotizan en precios elevados. Desafortunadamente, cada año se extraen cientos de miles de plantas que se venden en las calles, lo que está contribuyendo a su extinción (Salazar, 2009).

Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas polvo porque son minúsculas, al no poseer o ser muy escaso el endospermo (tejido de reserva en semillas), por lo que es necesario, en condiciones naturales, la germinación mediante la asociación simbiótica (micorrización) generalmente con hongos del género *Rhizoctonia*, que son los que van a abastecer a las semillas de los azúcares y nutrientes que necesitan hasta que fabriquen su propio alimento (autótrofas) (Arditti, 1984).

Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro* (Arditti & Ernst, 1981; Cavalcante, Willadino, Dias y Tenório, 2001; Damon, Aguilar, Rivera y Nikolaeva, 2004; Haddix, Kamp y Raczkowski, 2006; Mckendrick, 2000; Pedroza, Fernández & Suarez, 2005; Pedroza y Mican, 2006; Serna, 1999; Steele, 2007; Yamazaki y Kasumitsu, 2006). Sin

embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar, por lo que hay que investigar cual es el medio de germinación adecuado para cada una de ellas.

La aclimatización es una etapa fundamental del proceso de cultivo *in vitro*. Uno de los factores que interfieren con el éxito de la aclimatización de las plántulas, es la baja eficiencia del sistema radicular, lo que combinado con la poca funcionalidad de los estomas y la malformación de la cutícula, reducen la supervivencia de las plantas expuestas a condiciones ambientales (Faria, Assis, Unemoto y Roble, 2012). Las plantas derivadas de cultivo *in vitro* son generalmente frágiles y tienen raíces poco funcionales en la absorción de agua y nutrientes (Pasqual, Chalfun y Ramos, 2001). Un sistema radicular vigoroso es vital para la supervivencia y la adaptación de plantas cultivadas *in vitro* cuando se someten a condiciones *ex vitro* (Liu, Luo y Liu, 2013).

Es importante destacar que durante la aclimatización la temperatura, la humedad, la luz y el sustrato desempeñan una función de apoyo para la supervivencia de las plántulas obtenidas *in vitro*. Además, de que el sustrato debe presentar propiedades químicas y físicas adecuadas para lograr una aclimatización exitosa (Kämpf, 2005).

En la actualidad, numerosos materiales orgánicos, minerales o de síntesis (Kämpf, 2005), tales como fibra de coco, cáscaras de arroz carbonizados, corteza de pino (Yamakami, Faria, Assis y Rego, 2006), semillas de almendra (Santos y Teixeira, 2010), vermiculita (Venturieri y Arbiato, 2011) y poliestireno (Yamamoto, Stegani, Faria, Fonseca y Angelis, 2009) han sido evaluados para el cultivo de orquídeas, se pueden usar solos o en mezclas con el fin de proporcionar las mejores características tales como permitir el intercambio de gases a través de raíces, la capacidad de carga actual y la retención de nutrientes para las plantas, proporcionar un pH adecuado y todavía estar libre de agentes causantes de enfermedades, plagas y plántulas de malas hierbas (Kämpf, 2005).

A pesar de que la familia Orchidaceae es una de las familias más diversas, de alto valor tanto económico como ecológico, para las especies de *Dichaea glauca* y *Jacquinilla equitantifolia*, empleadas en esta investigación, es escasa la literatura referente a micropropagación. Por lo tanto: El presente trabajo tiene como finalidad establecer un protocolo de germinación, desarrollo *in vitro* y aclimatización de ambas especies de orquídeas pertenecientes al estado de Puebla.

## **Marco teórico**

### **Distribución y área de estudio**

Las orquídeas se encuentran distribuidas por casi todas las regiones del planeta, con excepción de las zonas de aridez extrema (Hágsater *et al.*, 2005; Soto, 1996) y en las tierras permanentemente heladas (Antártida). La familia está mejor representada en los trópicos, donde se hallan confinadas numerosas especies, muchas de las cuales son plantas epifitas que viven sobre troncos y ramas de árboles. Las especies de las zonas templadas y frías son todas plantas terrestres adaptadas a una gran variedad de hábitats. Dressler (1981) considera que, del total de especies, el 25% son terrestres, el 5% capaces de crecer como epifitas o como plantas terrestres y el resto exclusivamente epifitas. La evolución de esta familia, sobre todo en cuanto se refiere a la morfología floral, ha estado estrechamente relacionada con la de los insectos polinizadores. Este número de taxa continúa incrementándose por el descubrimiento tanto de especies nuevas para la ciencia como de especies que eran conocidas en otros países, pero no habían sido encontradas en México.

Las orquídeas ocupan el tercer lugar a nivel nacional en lo referente a las familias de plantas con mayor diversidad taxonómica, siendo superadas sólo por Asteraceae y Fabaceae (Hágsater *et al.*, 2005; Villaseñor, 2003); así mismo, constituyen la quinta familia de fanerógamas con mayor número de especies en la Cuenca de México y las 60 especies registradas en la Cuenca hasta el momento representan aproximadamente 3% de la flora de la región (Rzedowski y Calderón, 1989).

Para el estado de Puebla no se han realizado grandes estudios para determinar la riqueza de orquídeas; solamente se han realizado algunos inventarios locales (Mora, 2004; Morales, 2008; Pérez, *et al.*, 2010; Romero, 2000). Por esta razón es que la riqueza, abundancia y distribución de las orquídeas de Puebla es poco conocida.

El municipio de Cuetzalan del Progreso (Figura 1) se localiza en la parte noreste del estado entre los límites de la Sierra Madre Oriental y el Golfo de México (Morrone, 2001). Sus coordenadas geográficas son los paralelos 19° 57'00" y 20° 05'18" de latitud norte y los meridianos 97° 24'36" y 97° 34'54" de longitud occidental, colinda al Norte: con Jonotla y Tenampulco, al Este: con Ayotoxco de Guerrero y Tlatlauquitepec, al Sur: con Zacapoaxtla y al Oeste: con Zoquiapan. Tiene una superficie de 181.73 km<sup>2</sup>. El municipio se localiza en la transición de los climas templados de la Sierra Norte a los cálidos del declive del Golfo; presenta un solo clima: Clima semicálido subhúmedo con lluvias todo el año. Con respecto a la Flora: El municipio ha perdido la mayor parte de las áreas boscosas debido al cambio de uso de la tierra para la producción de café y para el establecimiento de áreas de pastoreo de los rebaños de ganado y productos lácteos locales (I.N.E.G.I., 1985); aún conserva fragmentos de Bosques Mesófilo de Montaña, con especies arbóreas de liquidámbar y jaboncillo en la rivera del río Apulco. Un lugar importante lo ocupan las flores entre las más importante podemos mencionar: las orquídeas, alcatraces, azalias, hortencias y gachupinas cuyo nombre auténtico se desconoce (Gobierno del Estado de Puebla, 1988).

La diversidad de los tipos de vegetación del Golfo de México y las tierras bajas de las partes montañosas de la Sierra Madre Oriental, hacen de este municipio ecológicamente rico en alta biodiversidad de orquídeas (Cetzal-Ix *et al.*, 2014).

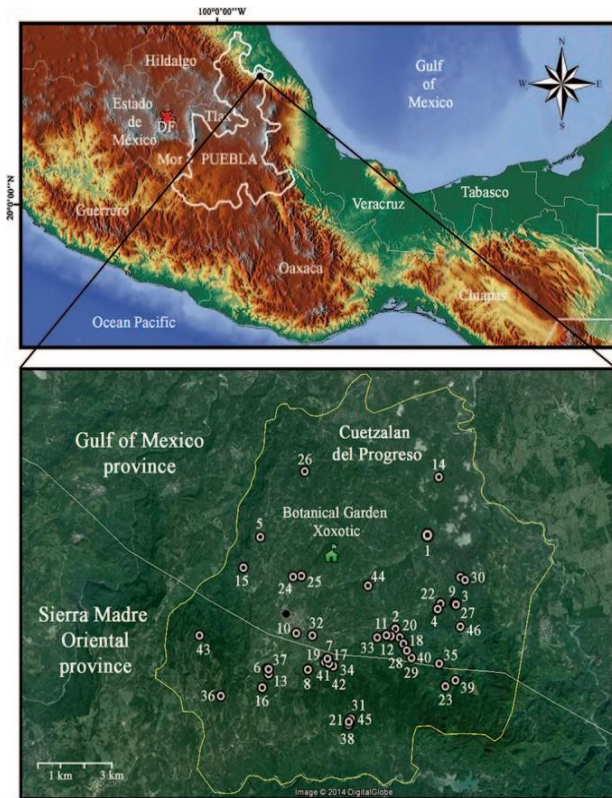


Figura 1. Municipio de Cuetzalan del Progreso Puebla. Tomado de Cetzal-Ix *et al.*, 2014.

El Jardín Botánico Xoxotic (Figura 2), ubicado en Cuetzalan de Progreso Puebla (20 ° 2'22.63 "N, 97 ° 30'32.16" W) es un agroecosistema vivo donde convive una gran colección de especies del bosque de niebla con los cafetales de gran valor para la región, por esto es posible apreciar una enorme diversidad de familias botánicas. Cuenta con diversas colecciones siendo una de ellas el Orquídeario, en su sitio web<sup>1</sup> podemos leer lo siguiente: “Las orquídeas de Cuetzalan son muy llamativas por su gran variedad de colores y formas; las hay desde terrestres hasta en la cima de los grandes árboles de la selva baja, el bosque de niebla y el bosque de pino. Esta belleza también ha puesto en peligro a algunas de estas especies, es aquí donde se hace realmente importante el trabajo de conservar ejemplares, reproducirlas y reintroducirlas a su ambiente original. En Xoxotic se puede apreciar una de las colecciones más bellas en orquídeas de la sierra

poblana y de otras partes del país y del mundo, se cuenta con más de 130 especies y miles de ejemplares en todo el jardín”



Figura 2. Jardín Botánico Xoxotic

<sup>1</sup>[http://www.grupoelencuentro.com.mx/index.php?q=diversidad&n=jardin\\_botanico](http://www.grupoelencuentro.com.mx/index.php?q=diversidad&n=jardin_botanico)

## Generalidades de las Orquídeas

### Clasificación de las orquídeas por su forma de vida

Estas plantas se han podido establecer en casi todos los ambientes de la Tierra gracias a sus adaptaciones para soportar muy distintas condiciones, las orquídeas son algunas de las plantas que hacen un uso más eficiente de los nutrientes y el agua en ambientes en los que estos dos factores son limitantes, son por mucho, el grupo de plantas que ha podido colonizar con más éxito las copas de los árboles y varias de sus adaptaciones más notables están asociadas de manera directa al epifitismo o a su capacidad de establecerse en otros ambientes restrictivos, podemos encontrar desde orquídeas litofitas o rupícolas que crecen sobre rocas, orquídeas subterráneas que emergen solo cuando florecen como la *Rhizanthella gardneri*, pasando por las epifitas del griego *epi-*, “sobre”, y *phyton*, “vegetal”, son aquellas que crecen naturalmente sobre otra planta buscando soporte, pero que no depende de ella para su nutrición u obtención de agua, además de orquídeas terrestres siendo aquellas que crecen ancladas al suelo, en este lugar obtienen el agua y nutrientes minerales necesarios para su sobrevivencia y por último orquídeas saprófitas del griego *saprobe* “podrido” no realizan fotosíntesis, el organismo se alimenta de materia orgánica muerta, ocasionando su putrefacción (Bastida, Flores, Vázquez y Navarro, 2007).

### Clasificación de las orquídeas por su hábito de crecimiento

Las orquídeas son plantas herbáceas con una estructura básica similar a la de muchas otras monocotiledóneas. Están constituidas por vástagos organizados en uno de dos hábitos de crecimiento (Figura 3); en el primero de ellos el desarrollo se da mediante la extensión vegetativa a partir de un meristemo apical que da lugar a un solo eje principal (monopodio), con este tipo de crecimiento las plantas crecen de manera erguida, erectas con un solo tallo que no se ramifica, al cual se insertan las hojas y no presentan pseudobulbos y se le conoce como crecimiento Monopodial. En el segundo, el eje está formado por una serie de vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemos o yemas de renovación situadas basal, lateral o apicalmente en el vástago anterior; el conjunto de vástagos forma un eje compuesto (simpodio), existe un rizoma que crece de manera horizontal, del cual van surgiendo los pseudobulbos que tienen un crecimiento vertical. A medida que va creciendo el rizoma van surgiendo nuevos pseudobulbos que pueden dar origen a otra planta y el hábito es entonces llamado Simpodial (Bell & Bryan, 1991).

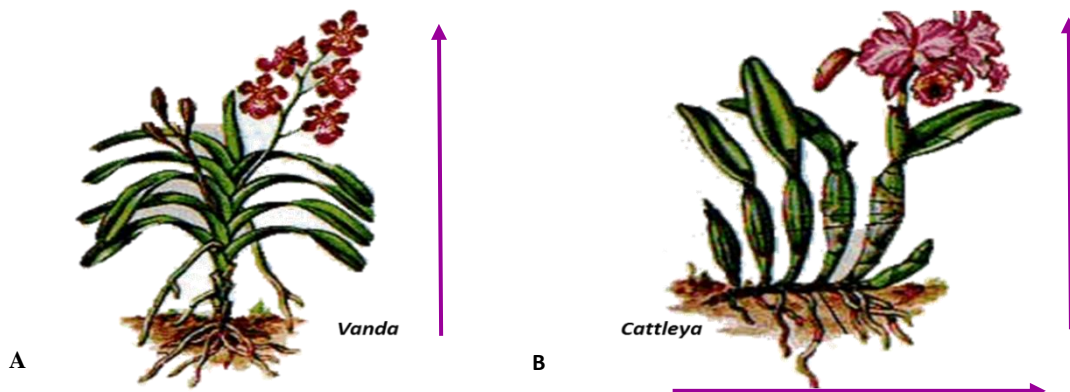


Figura 3. Tipos de hábito de crecimiento: A) Crecimiento monopodial. B) Crecimiento simpodial (Bell & Bryan, 1991).

## Tallos

La estructura básica del tallo de las orquídeas es comparable a una caña o carrizo y está formado por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrízales donde originalmente se insertaban las hojas. Otro tipo de tallo que puede estar presente en las orquídeas es el pseudobulbo, este es un tallo aéreo de secciones engrosadas, carnosas, formados por uno o varios nudos y entrenudos, donde originalmente se insertan las hojas. La función primordial de los pseudobulbos es la de almacenar agua y nutrientes, que son la fuente de reserva para la planta en temporada de sequía (Freuler, 2011).

El crecimiento del pseudobulbo es un proceso generalmente anual, usualmente presente en orquídeas epifitas, este crecimiento puede darse mediante el rizoma dando lugar a un crecimiento Simpodial. Los pseudobulbos pueden tener formas muy variables de acuerdo a su género y/o especie, siendo las más comunes; globoso, ovoide, oblongo, cilíndrico y segmentado, claviforme y fusiforme (Anexo 1). Por otro lado, su contraparte subterránea son los cormos, característicos de varios grupos de orquídeas terrestres. Ambos tipos de tallos engrosados constituyen almacenes de agua y sustancias de reserva, como almidón, que son utilizados al menos en parte para sustentar la producción de flores y frutos y el desarrollo de nuevos vástagos, la planta puede perder completamente la parte aérea y volver a rebrotar gracias a estas formaciones (Hágsater *et al.*, 2005).

## Hojas

Además de las funciones básicas que desempeñan las hojas de la mayoría de las plantas, es decir, la transpiración, el intercambio gaseoso y la producción de nutrientes mediante la fotosíntesis, las hojas de las orquídeas presentan modificaciones y funciones particulares (Hágsater *et al.*, 2005).

Las hojas varían mucho en tamaño y consistencia, pudiendo ser simples, paralelinervas, sésiles o pediceladas, alargadas y generalmente persistentes. Por su colocación pueden ser alterna helicoidal, opuestas y en algunos casos solo presentan una hoja verdadera (Anexo 2 y 3). La porción basal de las hojas forma una vaina alrededor del pseudobulbo, una característica que le permite brindarle protección a las yemas vegetativas de los pseudobulbos del próximo año.

El éxito de las orquídeas para adaptarse a su hábitat se debe en parte a sus hojas, ya que en lugares donde las condiciones climáticas son extremadamente secas durante una época del año, estas plantas han desarrollado hojas de consistencia carnosa o suculentas, que actúan como estructuras de reserva permitiéndole sobrevivir largos periodos de sequía (Bastida *et al.*, 2007).

En contraste, las orquídeas que crecen en ambientes sombreados necesitan tener hojas con una gran superficie foliar, que les permite captar la poca luz disponible para realizar su actividad fotosintética. Las formas de las hojas son muy variables en esta familia y podemos encontrar prácticamente tipos como: elíptica, lanceoladas, ovalanceoladas, lineales, liguladas, triangulares y acorazadas. La presencia de follaje deciduo es más común entre las orquídeas terrestres (Bastida *et al.*, 2007).

## Raíces



Figura 4. Raíces de una orquídea epífita.

Las raíces son órganos sumamente importantes, en especies terrestres no existen diferencias significativas con respecto a las demás monocotiledóneas; sin embargo, las especies epifitas presentan raíces aéreas que pueden estar libres y colgantes o fijarse fuertemente a los árboles hospederos (Bastida *et al.*, 2007).

Su organización anatómica consiste en un cilindro vascular central rodeado de una endodermis, envuelta a su vez por la corteza; esta última constituye la mayor parte del volumen de la raíz y se encuentra delimitada

hacia afuera por la exodermis, formada por algunas células de pared gruesa e impermeable y otras de pared delgada que permite el paso de agua del exterior hacia la corteza la porción más externa de la raíz es la epidermis se presentan alrededor de la raíz auténtica y es una capa de tejido esponjoso llamado velamen, que se desarrolla en las especies terrestres, epifitas, litofíticas. Las raíces presentan un ápice meristemático que absorbe la humedad y las pequeñas cantidades de nutrientes que la planta necesita (Figura 4). Este ápice tiene una coloración verde, el cual cumple la función de realizar parte de la fotosíntesis de la planta (Hágsater *et al.*, 2005).

## Inflorescencias

Esta estructura de las orquídeas presenta una gran diversidad de formas dentro de las cuales se tienen las siguientes (Anexo 4)

Con base a su origen:

- Axilar: se caracteriza por que los escapos florales surgen de las axilas de las hojas que se insertan en los pseudobulbos.
- Basal: el escapo floral surge de la base del pseudobulbo.
- Terminal: el escapo floral surge de la parte terminal del pseudobulbo.

Con base a su tiempo de floración:

- Determinada e Indeterminada

Con base a la forma de la inflorescencia

- Flores simples, espiga, racimo, panícula, umbela entre otros (Anexo 5).



## Flores

Las flores de las orquídeas presentan simetría bilateral (Figura 5), aunque varían en cuanto a tamaño, generalmente están compuestas por tres sépalos y tres pétalos, uno de estos pétalos ha sufrido una modificación siendo la parte más llamativa, recibiendo así el nombre de labelo. El labelo es la parte de la flor que desarrolla mayores adaptaciones y tiene como finalidad atraer a los insectos polinizadores de la flor y servir como plataforma de aterrizaje. Este puede presentar diversas características como:

engrosamientos (“callos”), áreas que producen néctar, aceites o compuestos aromáticos. También puede envolver o enmarcar a una pieza central llamada columna o ginostemio, la cual está compuesta por la fusión de los órganos sexuales femeninos y masculinos, por esta razón la mayoría de las orquídeas son hermafroditas, aunque existen algunas excepciones (Hágsater *et al.*, 2005).



Figura 5. Simetría bilateral en flores de orquídeas (Freuler, 2011).

## Partes de una flor

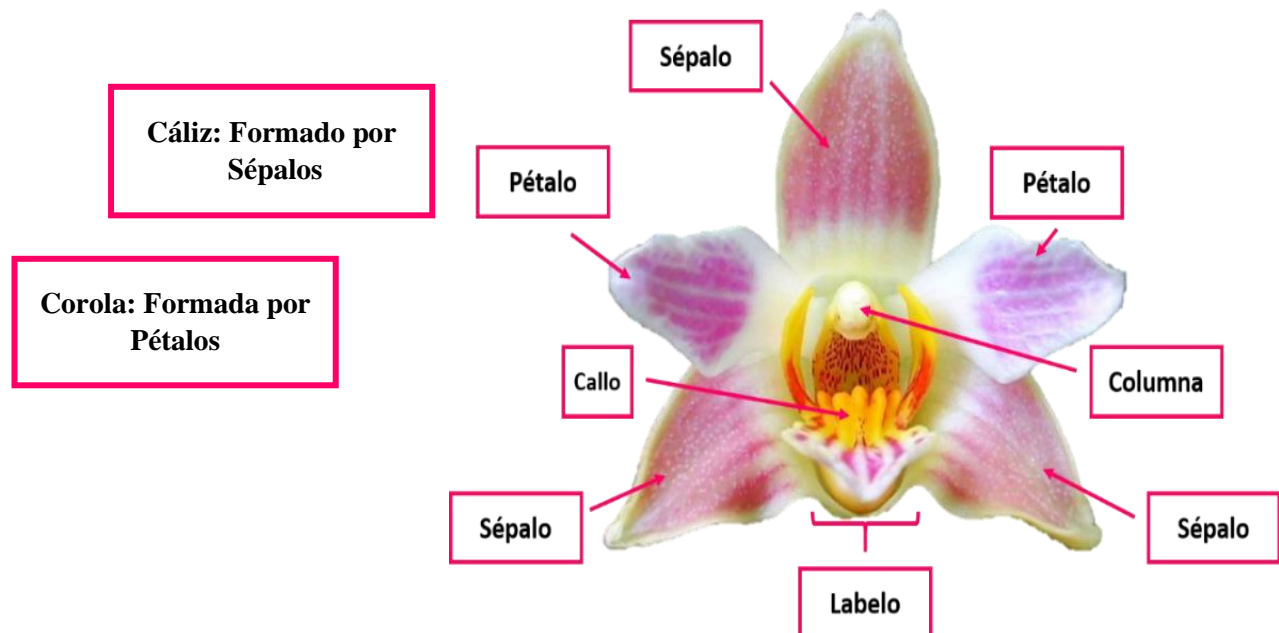


Figura 6. Estructuras de una flor de orquídea (*Chysis limminghei*).



En las Figuras 6, 7 y 8 se puede observar algunas de las siguientes estructuras que según Ackerman (1995) son:

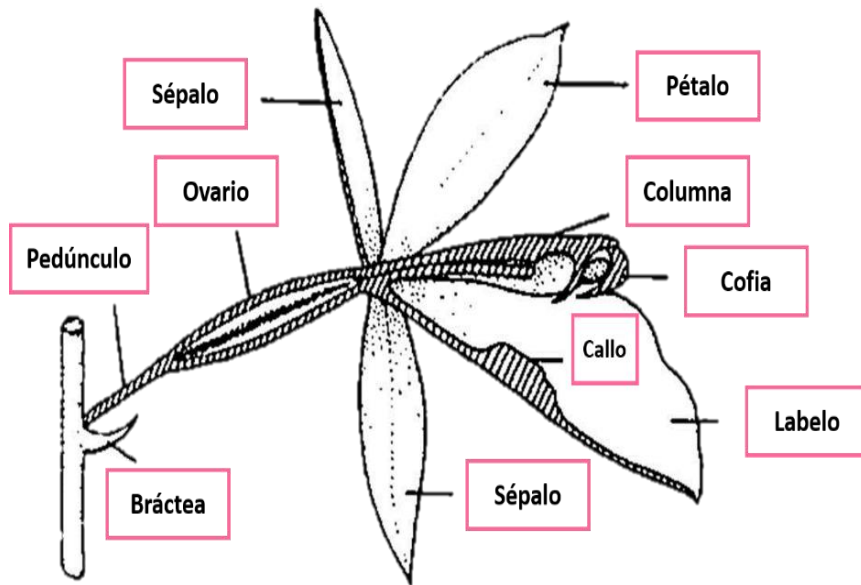


Figura 7. Corte longitudinal de las partes de una flor. Pupulin, 1998.

**Bráctea:** órgano foliáceo y a su vez, una hoja modificada, usualmente asociado con la flor y diferente de las partes de esta, así como de las hojas.

**Callo:** tejido grueso y carnoso del labio de la flor.

**Cofia:** estructura que se encarga de la protección de los polinios.

**Columna:** estructura central compuesta por el estilo, estigma, filamentos y una, o más, anteras.

**Estigma:** órgano piloso en que termina el estilo, donde se pega el polen.

**Estilo:** filamento que nace en el ovario y termina en el estigma.

**Labelo:** “labio” pétalo medio, generalmente de forma, tamaño y color diferentes al de los otros pétalos.

**Nectario:** estructura productora de néctar, el néctar producido por los nectarios sirve de recompensa para los polinizadores. Los nectarios que están localizados fuera de la flor atraen, generalmente a las hormigas.

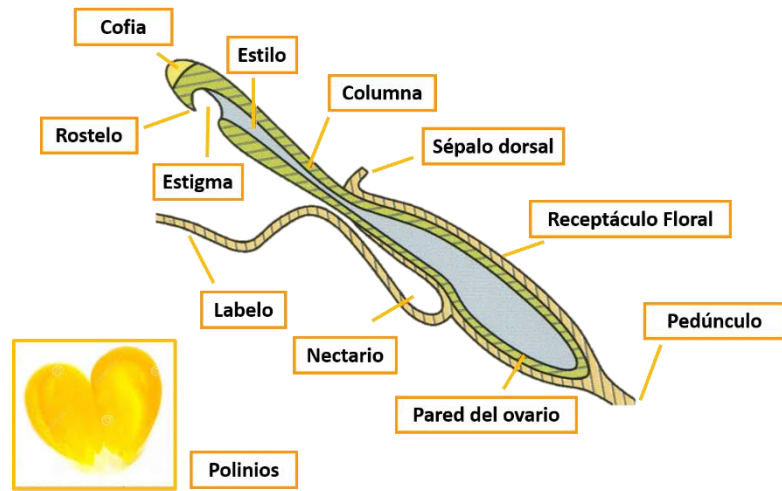


Figura 8. Corte longitudinal de la columna y polinios. Freuler, 2006.

**Ovario:** parte de la flor formada por carpelos. Estos son esporofilos modificados que a su vez son altamente modificadas. En el interior del ovario se encuentran los óvulos. El ovario se convierte en un fruto después de ocurrir la polinización y la fecundación. El ovario tiene una posición ínfera al punto llamado tálamo que es donde se insertan los verticilos florales –cáliz y corola- que constituyen el perianto.

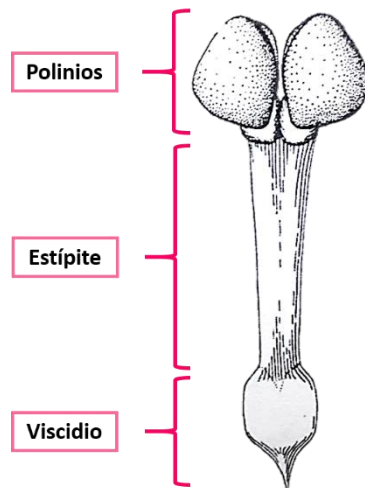
**Pedúnculo:** ramo o tallo de una flor solitaria. En el caso de las inflorescencias el pedúnculo se subdivide de tal forma que cada flor individual tiene una porción de tallo que la sostiene, el pedicelo.

**Pétalos:** antofilos u órganos foliáceos de la flor, con frecuencia de colorido y forma muy variados, que constituyen el verticilo más interno del perianto. El conjunto de ellos forma la corola.

**Polinios:** masa compacta y coherente de granos de polen que provienen de la teca, lóculo o cavidad de una antera.

**Róstelo:** parte no receptiva del lóbulo medio del estigma que separa los polinios de la superficie fértil del estigma e interviene en la dispersión de aquellos. El róstelo por lo general produce una porción adhesiva que permite fijar el polinario al polinizador. La parte adhesiva puede estar pegada al polinario, constituyendo un viscidio, o producir una sustancia viscosa que solo entra en contacto con los polinios mediante la intervención del polinizador, siendo entonces llamado viscario.

**Sépalo:** verticilo externo de hojas modificadas que rodea a los pétalos



### Polinarios y polinios

El polen se encuentra aglutinado en unidades discretas llamadas polinios. Estípites, es un tallo recto, largo que une los polinios con el viscidio. Y el viscidio, es la porción pegajosa que sirve para adherir los polinarios al polinizador. Esta unidad recibe el nombre de polinario (Figura 9). El color, número, formato y textura de los polinios y los polinarios varía de acuerdo con el grupo taxonómico de orquídeas (Pupulin, 1998).

Figura 9. Polinario (Pupulin, 1998).

### Resupinación

Las flores con frecuencia se tuercen durante el desarrollo. Este fenómeno toma el nombre de Resupinación. Para que el “Labelo” quede en la posición que se observa en una flor abierta, el botón floral debe girar 180° (Figura 10).

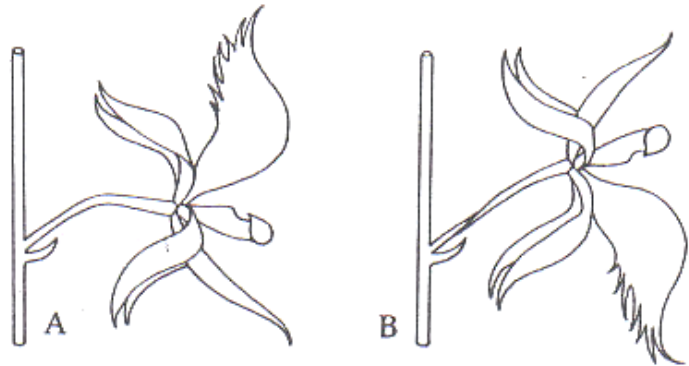


Figura 10. Resupinación. A) Flor sin resupinación. B) Flor con resupinación (Pupulin, 1998).

## Polinización

Generalmente en las orquídeas ocurre la polinización cruzada, es decir que las células sexuales masculinas son transportadas hasta los órganos femeninos de una flor distinta. La polinización cruzada provoca variabilidad genética sobre la cual actúa la selección natural. Cabe mencionar que para las orquídeas la polinización la realizan únicamente los insectos u otros animales como pájaros y lepidópteros, esta enorme diversidad floral sirve al propósito de atraer polinizadores específicos.

En las orquídeas se ha detectado la mayor diversidad de sistemas de polinización y polinizadores (Ackerman, 1986; Albores y Sosa, 2006; Cozzolino y Windmer, 2005; Dafni, 1984; Dodson, 1962; Johnson y Nilsson, 1999; Nilsson, 1992; Pijl & Dodson, 1969; Tremblay, 1991). Diferentes partes florales producen olores putrescentes o dulces, comúnmente forman trampas que retienen al polinizador, además de poseer varios apéndices que los atraen y colores ya sea brillantes o que semejan carne o algún otro tinte de materia putrefacta (Borba, Semir & Shepherd, 2001; Chase, 1985; Johnson & Edwards, 2000).

En las orquídeas, las barreras para prevenir la autopolinización y la hibridación entre especies del mismo género por lo general existen a nivel de los mecanismos de la polinización (Dressler, 1993; Pijl y Dodson, 1969). Una divergencia en el tiempo de floración previene el flujo de polen entre especies (Ellis & Johnson, 1999). Asimismo, el impedimento de intercambio polínico puede ser de carácter etológico, es decir que especies relacionadas presentan flores con morfología y fragancia distintas para atraer a diferentes polinizadores (Borba *et al.*, 2001; Ellis y Johnson, 1999; Hills, Norris & Dodson, 1972; Singer & Cocucci, 1999; Singer & Sazima, 1999).

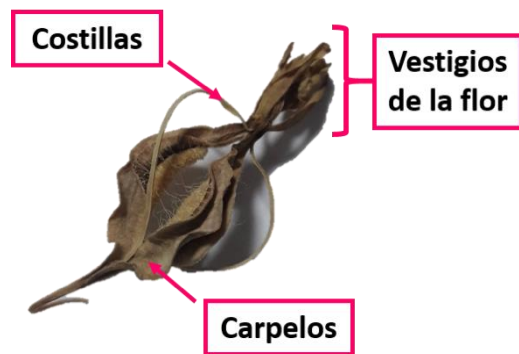


Figura 11. Cápsula de orquídea.

La agregación de los granos de polen en polinios constituyó la respuesta evolutiva a la necesidad de fertilizar miles o millones de óvulos en un solo evento de polinización. Los frutos de las orquídeas reciben el nombre de cápsulas (Figura 11), éstos al madurar presentan varias aberturas longitudinales a través de las cuales son liberadas las semillas. El número de semillas por fruto varía entre unos pocos miles y cuatro millones; su tamaño es muy pequeño (Arditti, 1992).

## Semillas

El reducido tamaño de las semillas es una severa limitante al tamaño del embrión. Por ende, en las orquídeas este es diminuto e indiferenciado, es decir, no presenta órganos incipientes como en las semillas de muchas otras plantas, si no que consiste por lo general en una masa de células (Figura 12). La semilla carece de reservas nutritivas, por lo que su germinación requiere la asociación del embrión con ciertos hongos que le proporcionan nutrientes (Hágsater *et al.*, 2005).

Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas de polvo porque son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento. Usualmente estas semillas no germinan en el medio natural a menos que presenten una asociación con un hongo “micorriza”, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento (Bastida *et al.*, 2007).

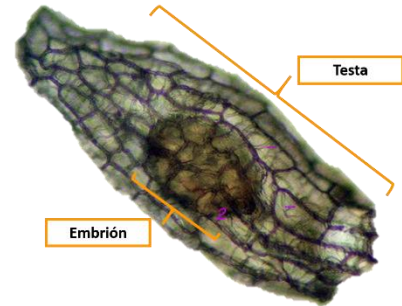


Figura 12. Semilla de Orquídea.  
Tomado de <http://orquideas-katia.org/ESP/SALAS/CONFERENCIAS/SEMILLAS-TESTA.htm>

## Micorrizas

El término micorriza se refiere a la relación simbiótica entre un hongo y las raíces de una planta vascular. En la mayoría de las asociaciones micorrízicas, el hongo que coloniza la raíz se beneficia con los productos de la fotosíntesis mientras que la planta incrementa la absorción de agua y nutrientes, principalmente fósforo (Harley & Smith, 1983). En algunos casos las plantas se benefician digiriendo el hongo y aprovechando sus productos.

Todas las orquídeas requieren de esta asociación para su germinación, principalmente con hongos del grupo *Rhizoctonia* (Rasmussen, 1995). Esta dependencia se asocia con las mínimas cantidades de nutrientes almacenados en las diminutas semillas de las orquídeas (Arditti & Ghani, 2000). Sin embargo, los hongos del grupo de *Rhizoctonia* son bien conocidos por sus capacidades patogénicas en muchos grupos diferentes de plantas (Otero y Bayman, 2009).

De acuerdo con la localización de las hifas con respecto a las células, las micorrizas se clasifican en ectomicorrizas y endomicorrizas. En las endomicorrizas el hongo crece dentro de las células corticales de la raíz (intracelular) o bien entre célula y célula (intercelular) de la raíz formando estructuras características (Currah, 1991). Existen dos tipos de endomicorrizas, el grupo más común se distingue por presentar hifas aseptadas, vesículas y estructuras ramificadas que le confieren el nombre de micorrizas vesículo-arbusculares. Aproximadamente 90% de las dicotiledóneas y la mayoría de las monocotiledóneas presentan este tipo de micorriza (Currah, 1991).

El segundo grupo está constituido por hongos con hifas septadas que invaden las células de la raíz sin romper la membrana plasmática y crecen dentro de la célula formando estructuras globosas conocidas como pelotones (Richardson, Currah y Hambleton, 1993). Estos son específicos de la

familia Orchidaceae. Sus cultivos puros han dado como resultado hongos basidiomicetes y hongos imperfectos, especialmente miembros del complejo *Rhizoctonia* (Hadley, 1982).

### **Germinación *in vitro***

Mediante la germinación *in vitro*, se colocan semillas en un frasco, sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan. Hay dos tipos básicos de germinación *in vitro*: simbiótica y asimbiótica. En la germinación simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo “micorriza” apropiado. 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. 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 hongo micorriza adecuado para que se origine la simbiosis y prevenir parasitismo y la consecuente muerte de las semillas (McKendrick, 2000).

Las semillas de las orquídeas presentan problemas serios para su germinación en forma natural debido a que carecen de endospermo (Pierik, 1990). El medio usado 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 intervención del hongo (McKendrick, 2000).

Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas. Sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Arditti, 1993). Se reporta que las orquídeas fueron las primeras plantas propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas, de manera simbiótica (Bernard, 1899) y asimbióticamente (Arditti, 1992; Arditti & Krikorian, 1996; Knudson, 1921). Dada la importancia ecológica y comercial de las orquídeas, se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto asexual, a través de división de pseudobulbos, keikis y cultivo de meristemas; así como sexual, a través de semillas (Arditti & Ernst, 1981; Leroy & Pike, 1976; Northen, 1970; Sheehan, 1983).

Barba, Luna y Romero (2002) mencionan que: “Para el crecimiento y desarrollo *in vitro* del material vegetal es necesario que el medio de cultivo contenga todos aquellos nutrientes, vitaminas y fitorreguladores del crecimiento que las células recibirían a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores de la planta. Es por esto por lo que la composición del medio de cultivo es un factor determinante para obtener resultados satisfactorios en la micropropagación de una especie vegetal. Debido a que cada planta tiene necesidades nutricionales específicas, no existe un medio de cultivo de uso general. Se han formulado una gran cantidad de medios de cultivo, los que generalmente están constituidos por la mayoría de los siguientes componentes: Sales inorgánicas (mezcla de sales), compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte agua

destilada (encargada de disolver todos los componentes anteriores). El medio de cultivo puede usarse con una consistencia semisólida o líquida”. El proceso de germinación de las semillas de orquídeas es muy similar entre las diferentes especies y según diferentes autores se puede describir de la siguiente forma, se considera que el proceso de germinación empieza cuando la semilla se hincha y toma un color verde, lo que origina una estructura indiferenciada en forma esférica denominada protocormo. A su vez, este protocormo origina la plántula completa después de pasar por cinco etapas de desarrollo fenológico (Seaton & Ramsay, 2005) (Figura 13). Estas etapas han sido descritas y divididas en: (1) formación del protocormo; (2) aparición de los rizoides; (3) aparición del meristemo apical; (4) desarrollo de la primera hoja; y (5) aparición de la primera raíz verdadera. De la etapa 5 en adelante se considera ya formada la plántula y se identifican tallos, hojas y raíces (Zettler & McInnis, 1994).

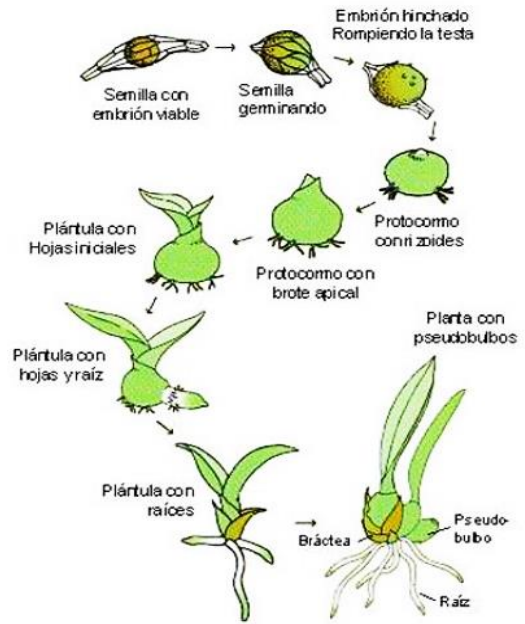


Figura 13. Estadios ontogénicos de *Laelia* sp. Según Seaton & Ramsay (2005).

## Índice de desarrollo

Spoerl, (1948) menciona que: Debido al pequeño tamaño de los embriones de las semillas de orquídeas, se utiliza un “índice de desarrollo”, que es la más apropiada para las mediciones del desarrollo. La técnica consiste en disponer las semillas y plántulas en clases. Las frecuencias de estas clases de tamaño se utilizan entonces para calcular el índice de desarrollo. Colocó grupos de 50 hasta un total de 200 semillas en seis clases. La clase 1 consistió en semillas no germinadas, las cuatro clases siguientes contenían etapas intermedias y la clase 6 incluía plántulas con una o más hojas y raíces.

El número de semillas o plántulas en cada clase se convirtió en un porcentaje del total de 200 y los porcentajes se multiplicaron por el número de clase. Los productos se suman y se utilizan como un índice para representar el desarrollo del cultivo. La clase 1 no se incluyó en el cálculo de los índices. Al eliminar este porcentaje, se toma en cuenta la proporción de semillas que no germinan, de modo que los índices miden el efecto combinado del tratamiento sobre la germinación y el desarrollo.

Harrison y Arditti, 1978, proponen que: Se emplea un Índice (Arditti, 1967; Curtis, 1947; Mariat, 1952; Spoerl, 1948) para seguir el desarrollo de las plántulas cuantitativamente. A las semillas no germinadas se les asignó un valor de clase 1) Semillas hinchadas, 2) Protocormos, 3) Plántulas con una sola hoja, 4) Aquellas plántulas con dos hojas y 5) plántulas con al menos una raíz.

Para calcular el “Índice de Desarrollo” se observaron un total de 250 plántulas por cada repetición. La frecuencia de cada clase de tamaño se determinó como porcentaje del número total de plantas obtenidas.

Estos porcentajes se multiplicaron por el valor de sus respectivas clases de tamaño y la suma de la multiplicación del total por 100 proporcionó el índice de crecimiento de cada repetición.

## **Medio de cultivo**

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas, que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*.

Los ingredientes de un medio de cultivo vegetal según Abdelnour y Escalant (1994), pueden clasificarse en:

### **1) Sales inorgánicas (minerales)**

Los elementos mayores esenciales que todas las plantas requieren y que están presentes en los fertilizantes comunes, también forman parte de los medios de cultivo: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe).

Además de los elementos menores, que también son esenciales pero que se requiere en cantidades extremadamente pequeñas: Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeseo (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) y Yodo (I).

### **2) Compuestos orgánicos**

Aquí se encuentran sustancias como carbohidratos, hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y algunos otros compuestos que se han descrito como beneficiosos para el cultivo de tejidos vegetales: aminoácidos, amidas, purinas y pirimidinas y ácidos orgánicos.

- **Los carbohidratos:** son sustancias orgánicas como los azúcares que proveen tres de los elementos mayores esenciales: Hidrogeno (H), Carbono (C) y Oxigeno (O).

Los azúcares son producto de la fotosíntesis, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo, las plantas que crecen *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica, no pueden fabricar todo el azúcar que requieren, por lo que se adicionan altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo.



- **Hormonas:** las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos vegetales (CTV), son las auxinas y las citoquininas. Estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces y en la germinación de las semillas.  
Entre las auxinas más utilizadas se encuentran: ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), 2, 4, diclorofenoxiacético (2,4-D), picloram. Entre las citoquininas se encuentran: benzilaminopurina (BA), la kinetina (K) y zeatina (Z)  
Las giberelinas y el ácido abscísico son también utilizadas en algunos casos.
- **Vitaminas:** la vitamina que se ha demostrado consistentemente como importante en el CTV es la tiamina. Sin embargo, otras han sido utilizadas con frecuencia por estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantotenato, riboflavina.
- **Aminoácidos:** entre los aminoácidos y amidas que se han mostrado más frecuentemente como beneficiosos está L- arginina, L- ácido aspártico, L- glutamina, L- ácido glutámico y L- tirosina.

Otros compuestos orgánicos comúnmente empleados en el CTV son el Myo-inositol, adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ascórbico (para evitar la oxidación de los tejidos).

### 3) Preparaciones naturales complejas

Una gran variedad de sustancias de composición indefinida han sido utilizadas para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellas se menciona: extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de plátano, caseína hidrolizada y jugo de naranja y tomate.

### 4) Materiales inertes de soporte

- **Agentes gelificantes:** agentes de soporte, agar, gelrite, fitogel.
- **Carbón activado:** en bajas concentraciones contrarresta efectos negativos que producen algunas sustancias liberadas al medio por el cultivo (fenoles).

## Medios nutritivos

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero no fue sino hasta 1922 cuando se logró el primer experimento exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un



medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias), (Segretín, 2006).

### **Murashige & Skoog (MS)**

Es el medio más conocido; se elaboró tomando el cultivo *in vitro* de tabaco (Murashige & Skoog, 1962), como modelo y siguiendo un procedimiento cuantitativo se determinaron las concentraciones más adecuadas de todos los nutrientes. Es apto para la mayoría de las especies, en él han prosperado eficientemente orquídeas como *Cypripedium acaule* (St Arnaud, Lauzer & Barabe, 1992). Por lo que es de amplia utilización, excepto para las especies más sensibles a la salinidad ya que se caracteriza por tener una elevada concentración salina (Anexo 6).

### **Kao & Michayluk (KM)**

Kao y Michayluk abordaron la dificultad de lograr la viabilidad de protoplastos cultivados *in vitro*, hasta entonces muy limitada, desde el punto de vista de la optimización del medio, y formularon varios; el más exitoso fue el KM (Kao & Michayluk, 1975). Su característica principal y distintiva de los medios hasta entonces formulados es la gran diversidad de nutrientes que contiene, muchos de ellos no esenciales para el desarrollo de las plantas, pero que si han resultado limitantes en el cultivo de sus protoplastos (Anexo 7).

### **Peters 24:8:16**

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, 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 como el Peters 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), citado en (Rodríguez, 2013).

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 con mucho menor proporción (Mc Donald, 1999).

Los fertilizantes pueden encontrarse en presentaciones sólidas, líquidas y gaseosas (García y 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 de fertilizante recomendada para otro tipo de cultivos (Mc Donald, 1999).

Los medios de cultivo usados para la germinación asimbiótica están compuestos de sales basales y azúcares, entre otros componentes. Las sales están conformadas por cationes (calcio, magnesio, amonio, etc.) y aniones (cloruro, nitrato, sulfato, etc.) (Romero, 2008).

Por su parte, los fertilizantes balanceados también están constituidos por sales minerales, las cuales coinciden parcialmente con las sales presentes en los medios de cultivo *in vitro*, de manera que pueden ser utilizadas para sustituir los componentes normalmente usados en el cultivo *in vitro*. Es posible elaborar medio para germinación de semillas de orquídeas a partir de fertilizantes, azúcar y algunos extractos, como plátano y piña (Romero, 2008) (Anexo 8).

### **Aclimatización**

Las plántulas obtenidas *in vitro* realizan fotosíntesis, sin embargo, al transferirse a las condiciones *ex vitro* para su aclimatización, generalmente disminuye el desarrollo y rendimiento fotosintético, esto, debido a las condiciones particulares del cultivo *in vitro* como son alta humedad relativa, baja intensidad luminosa y baja concentración de CO<sub>2</sub> (Kadleček, Tichá, Haisel & Schafer, 2001). Tales condiciones dan lugar a plántulas morfológica, anatómica y fisiológicamente anormales (Pospíšilová, Tichá, Kadleček, Haisel & Plzánková, 1999), por ejemplo, en comparación con una planta en su ambiente natural, pueden presentar alta o baja densidad de estomas, aparato estomatal poco funcional y baja tasa fotosintética entre otras características. Para corregir estas anomalías se requiere de un periodo de aclimatización.

Los términos de aclimatación y aclimatización se refieren a cualquier cambio en la estructura o función del organismo que le permite encajar mejor en las condiciones del ambiente. La aclimatación es un proceso regulado por la naturaleza, mientras que la aclimatización es regulada por el hombre (Vázquez, 1994).

El proceso de aclimatización más aceptado es el de descenso gradual de humedad relativa, el cual permite a las plantas desarrollar mecanismos de protección a las nuevas condiciones ambientales, ya que se ha visto que los problemas que se presentan durante la aclimatización están relacionados principalmente con las variaciones de humedad. Además de ser el procedimiento más rápido, menos costoso y más práctico con el que generalmente se obtienen buenos resultados, este puede hacer uso de bolsas de plástico sobre la maceta, túneles de PVC, láminas de plástico transparente que cubran las plantas trasplantadas a invernaderos o cámaras de crecimiento de ambiente controlado o semi controlado (Vázquez, 1994), (como se citó en De la Cruz, 2006).

Algunos factores que se deben considerar para que el proceso de aclimatización sea exitoso son:

- **Estrés hídrico.** El estrés hídrico puede ser el resultado de una excesiva transpiración de las diferentes partes aéreas de las plantas, especialmente de las hojas, o por una inadecuada

absorción de agua por parte de las raíces. La cutícula y los estomas son la ruta primaria de pérdida de agua desde de las hojas provenientes de esta técnica reproductiva (Raveschot, 2009).

- **Cutícula.** Es una membrana cuya función consiste en limitar la pérdida de agua por transpiración. La estructura cristalina de la parte encerada de las hojas es distinta en las plantas micropropagadas con respecto a las plantas silvestres. Esto hace que las plantas *in vitro* pierdan más agua (Raveschot, 2009).
- **Estomas.** La estructura estomática presente en algunas especies de plantas cultivadas *in vitro* difiere marcadamente. Debido a que las primeras presentan estomas de mayor tamaño y más redondos, a diferencia de las plantas silvestres que presentan estomas más pequeños y elípticos lo que resulta en una deshidratación más rápida en el caso de las provenientes de cultivo *in vitro* (Debergh & Zimmerman, 1991).
- **Humedad.** En las plantas desarrolladas *in vitro*, se mantiene una alta humedad relativa, es necesario regar al momento del traslado para obtener una alta sobrevivencia (Raveschot, 2009).
- **Luz.** Las plantas *in vitro* están expuestas a altos niveles de luminosidad, lo que se traduce en hojas delgadas. Antes del traslado, se recomienda mantener las plantas con un 50% de sombra para así poder aclimatarlas de mejor manera, esto debido a que las plantas micropropagadas tienen un bajo control sobre la transpiración y un inadecuado mecanismo de fotosíntesis. La sombra reduce la transpiración evitando excesivas pérdidas de agua, así como también el exceso de luz destruye las moléculas de clorofila. Luego del período bajo sombra se deben mover las macetas gradualmente hacia el nivel de luz al cual será llevado para su crecimiento final (Debergh & Zimmerman, 1991).
- **Temperatura.** El calor es necesario en los meses de invierno y el frío (enfriar) es esencial en los meses de verano (Debergh & Zimmerman, 1991).
- **Fotosíntesis.** Las plantas sufren un cambio radical cuando son cambiadas del cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro* donde, la fotosíntesis se vuelve fundamental para la sobrevivencia. El bajo nivel de CO<sub>2</sub> durante el cultivo *in vitro* limita el proceso de fotosíntesis, lo cual se puede compensar usando sacarosa en el medio de cultivo. También se puede incrementar el nivel de luz y CO<sub>2</sub>, obteniendo un fuerte aumento en el crecimiento de varias especies como orquídeas, clavel, etc. (Debergh & Zimmerman, 1991).

## Sustratos

La aclimatización es una de las etapas más importantes dentro de la técnica de propagación *in vitro*, el trasplante de las plántulas al sustrato, así como la adaptación de estas al medio ambiente, es la etapa más crítica por lo que requiere mayor cuidado; ya que, durante este proceso es cuando se pierde el mayor número de material biológico, pero también se ha llevado a cabo con éxito en varias especies a través de numerosos intentos (Hurtado, 1987). Para esta etapa es importante seleccionar el tipo de sustrato adecuado tomando en cuenta las necesidades de cada una de las especies.

Un sustrato es todo material sólido, natural y/o artificial, mineral u orgánico; que colocado, en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por lo tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta.

Los sustratos ejercen una influencia significativa en la arquitectura del sistema radical de las plantas y en las asociaciones biológicas de este con el suelo, influenciando el estado nutricional y la translocación de agua en el sistema suelo-planta-atmósfera. Uno de los requisitos fundamentales que debe cumplir el sustrato para su utilización es la sanidad.

La presencia de inhibidores o también cambios en el pH del sustrato pueden afectar el crecimiento de las raíces y consecuentemente el éxito del trasplante. Muchos laboratorios y viveros trasplantan a un sustrato uniforme, éste debe ser adecuado en cuanto a: soporte de las plantas, pH, porosidad, aireación y drenaje (Debergh & Zimmerman, 1991).

Entre los sustratos más comunes podemos encontrar:

**Corteza:** La corteza de pino es un sustrato liviano, generalmente libre de patógenos, de buen drenaje. Se utiliza ya que tiene poca retención de agua y su densidad es alta lo que favorece a dar un mejor sostén a la planta. Constituye un buen sustituto de la turba, por lo que es utilizada como componente orgánico en los sustratos para contenedores de numerosas plantas leñosas y ornamentales (Hartmann & Kester, 2002). Se recomienda realizar una mezcla con corteza, corteza de coco y carbón. Como componente del medio es incluida generalmente en cantidades de hasta 50% del volumen (Schmilewski, 2008).

**Fibra de Coco:** La fibra de coco en estos últimos años es un sustrato que va ganando terreno en los productores de orquídeas y su uso se debe a que el musgo es muy escaso y de alto costo. Es un desecho de la industria alimentaria de procesado de coco. Entre sus características se cuentan las siguientes: elevada porosidad, baja densidad aparente, aireación, capacidad de retención de agua, donde los valores dependen del tamaño de las partículas (Abad, Noguera, Puchades, Maquieiria & Noguera, 2002). El aporte de las propiedades siempre influirá marcadamente de acuerdo con su procedencia (Abad *et al.*, 2002). Es una de las mejores alternativas y remplazo efectivo de la raíz de helecho, aunque su durabilidad no lo es tanto; sin embargo, presenta excelente almacenamiento de

humedad, es de constitución fibrosa por lo que facilita la aireación de las raíces y puede ser manipulado con facilidad. Se consigue fácilmente y no representa costo económico. Hay que tener en cuenta que debido al almacenamiento de humedad puede prestarse a la proliferación de hongos o insectos si no se le proporciona una correcta aireación (caso extremo).

**Sphagnum:** El musgo *Sphagnum* posee una gran capacidad de absorción de agua, hasta 20 veces su peso seco (Schofield, 1985). Gaudig y colaboradores, en 2014, indican que la biomasa fresca de *Sphagnum* constituye la alternativa más prometedora al uso de turba en los sustratos, pues presenta propiedades físicas y químicas similares a la turba rubia.

**Cero Grueso:** Es una marmolina en grano, obtenido mediante la trituración de mármol. Tiene una granulometría aproximada de 2.37 mm. Por ser un material 100% natural y con un gran contenido de calcio, es indispensable en la Industria Avícola. Se recomienda su uso en: Nutrición Animal e Industria de la Construcción.

## Descripción de las especies

### Género *Dichaea* (Sw.) Lindl.

Plantas epífitas, ocasionalmente litófitas o terrestres, perennes; raíces blanquecinas, rollizas; tallos alargados, ocasionalmente ramificados, erectos o péndulos, cubiertos por vainas foliares; hojas numerosas, dísticas, distribuidas a todo lo largo del tallo, las bases formando vainas envolventes, imbricadas, conduplicadas, láminas articuladas con las vainas; inflorescencia axilar, uniflora, pedúnculo opuesto a la base de las hojas; ovario pedicelado; sépalos desiguales, los laterales en ocasiones formando un mentón con el pie de columna; pétalos similares a los sépalos, generalmente más angostos; labelo entero a lobado, unguiculado, unido al pie de columna; columna corta, erecta, en ocasiones con una lígula infraestigmática, pie de columna corto; antera terminal, operculada, incumbente, polinios 4, cerosos; cápsula muricada o con espinas suaves, o bien, lisa. Género de aproximadamente 40 a 50 especies, distribuidas en América tropical. Nueve han sido registrados para México (Pupulin, 2007).

### Clasificación taxonómica

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Equisetopsida

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Orchidaceae

**Tribu:** Cymbidieae

**Subtribu:** Zygopetalinae

**Género:** *Dichaea* Lindl.

**Especie:** *Dichaea glauca* (Sw.) Lindl.

### Descripción botánica de *Dichaea glauca* (Sw.) Lindl., Gen. & Sp. Orch. Pl. 209. 1833

*Epidendrum glaucum* Sw., Prodr. 124. 1788 (Jamaica, Blue Mountains, Swartz, BM, the type).  
*Cymbidium glaucum* (Sw.) Sw., Nov. Act. Ups. 6: 71. 1799. *Dichaeopsis glauca* (Sw.) Schltr.,  
Beih. Bot. Centralbl. 36, 2: 519. 1918. *Dichaea willdenowiana* Kraenzl., Engl. Pflanz. 4, 50  
(Heft 83): 46. 1923.

**Hierba** epífita, cespitosa, de hasta de 65 cm de alto. **Raíces** carnosas, redondas, de hasta 6 mm de grosor. **Tallos** erectos, ligeramente comprimidos, completamente cubiertos por vainas foliares, de hasta 60 cm de largo y 3-4 mm de ancho. **Hojas** dísticas, las bases formando vainas envolventes, imbricadas, conduplicadas, las láminas articuladas con las vainas, eventualmente deciduas, glaucas, oblongo-elípticas, agudas, cortamente mucronadas, con la vena media prominente en el envés, todas las hojas de un tallo dispuestas en el mismo plano, de 2.5-6 x 0.6-1.3 cm. **Inflorescencias** unifloras, axilares, varias simultáneas en cada tallo; pedúnculo delgado, casi recto, de ca. 2.5 cm de largo y 0.5 mm de grosor, con 2 brácteas tubulares, apresadas, agudas, de 4-8 mm de largo. **Bráctea floral** ampliamente ovada, amplexicaule, acuminada, de ca. 2.5 mm de largo. **Flores** abiertas hacia el lado abaxial de las hojas, de ca. 1.5 cm de diámetro, con fragancia muy dulce y agradable durante el día, color blanco con manchas ocre en la base de los sépalos laterales y en ocasiones manchadas de café rojizo u ocre en las bases de todos los segmentos. **Ovario** pedicelado, subcilíndrico, glabro, de 8-10 mm de largo y ca. de 1.5 mm de grosor. **Sépalos** elíptico-ovados a elíptico-lanceolados, cóncavos, agudos a acuminados, los laterales ligeramente oblicuos, de 9-12 x 4-4.5 mm. **Pétalos** oblicuamente oblongo-lanceolados, dorsalmente quillado-engrosados, agudos a acuminados, de 9-10 x 3.5-4 mm. **Labelo** ampliamente sagitado, carnoso, cóncavo, de 7-10 x 9-12 mm al extender; base ampliamente cuneada, glabra, produciendo gotitas de sustancia aromática; lámina diminutamente papilosa, extendiéndose a cada lado en un lóbulo angostamente triangular, recurvado, obtuso a agudo, en ocasiones muy poco desarrollado; porción apical ligeramente conduplicada, aguda. **Columna** corta, diminutamente papilosa, de ca. 5 mm de largo y 3-4 mm de ancho cerca del ápice; clinandrio prominente, formando una capucha transversalmente oblonga sobre la antera. **Antera** semiglobosa, bilocular, color crema, de ca. 2 x 1.5 mm. **Polinario** de ca. 2 mm de largo, con 4 polinios amarillos, duros, ovados, dorsiventralmente comprimidos; estípite obtrulado, translúcido, con viscidio pequeño, oblongo, translúcido. **Rostelo** semiorbicular, tridentado después de remover el viscidio. **Cavidad estigmática** suborbicular-obovada, cóncava, el margen con pelos largos y delgados, limitado inferiormente por una lígula linear, cortamente pilosa, de ca. 1 x 0.3 mm. **Cápsula** elipsoide-fusiforme, glabra, de 20-25 x 7 mm (Figura 14) (García, Sánchez, Jimenéz y Solano, 1998; Folsom, 1996).

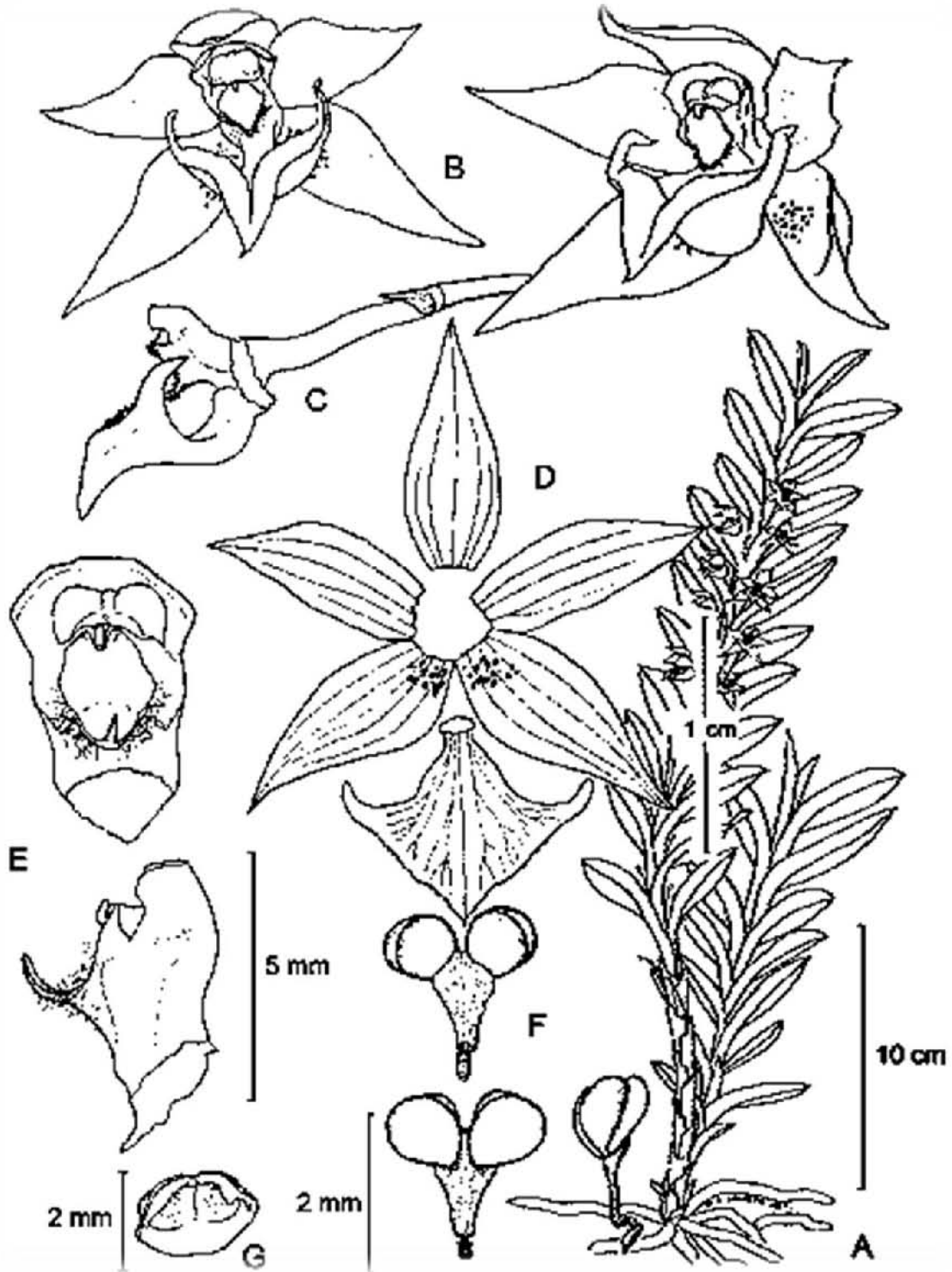


Figura 14. *Dichaea glauca* (Sw.) Lindl., Gen. & Sp. Orch. Pl. 209. 1833. A. Planta con inflorescencia; B. flor vista de frente y de tres cuartos; C. vista lateral de la columna y del labelo; D. disección floral; E. columna en vista ventral y lateral; F. polinario en vista ventral, dorsal y lateral; G. antera. Ilustrado por Gerardo A. Salazar, basado en una planta de Puebla. Tomado de García, et al., 1998.



## **Género *Jacqiniella* (Ames) Dressler**

Existen varias especies actualmente incluidas en *Epidendrum* que se distinguen de *Jacqiniella* principalmente por su mayor tamaño. La transferencia de estas especies a *Jacqiniella* deja a ambos géneros mucho más claramente delimitados, y una se ve apoyado por especies aún no descritas que combinan las características florales y vegetativas de las clases más pequeñas y más grandes de *Jacqiniella*.

*Jacqiniella* está bien caracterizada por una serie de caracteres: hojas dísticas que son semi-cilíndricas o aplanadas lateralmente; inflorescencia fasciculada que está subtendido por una bráctea hoja-como; flores bracteoladas que desarrollan individualmente durante un largo período de tiempo; un nectario o cuniculo en la base de la flor (hinchado en algunas especies); un labelo tri-lóbado que es cóncavo entre el callo carnoso y el lóbulo medio muy carnoso, el labelo libre o en parte adnado a la columna; con un Viscidio; estigma, con lóbulos anteriores laterales delgados que cierran parcialmente la cavidad de la flor (excepto en formas autógamias); con cuatro polinias, con caudículas (excepto en algunas formas autógamias), (Dressler, 1966).

## **Clasificación taxonómica**

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Equisetopsida

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Orchidaceae

**Tribu:** Epidendreae

**Subtribu:** Laeliinae

**Género:** *Jacqiniella* Schltr.

**Especie:** *Jacqiniella equitantifolia* (Ames) Dressler.

**Descripción botánica de *Jacquiniella equitantifolia* (Ames) Dressler, *Taxon* 15(6): 242. 1966**

*Epidendrum equitantifolium* (Ames), Schedul. Orch. 4: 39. 1923; *Epidendrum equitans* Lindl., Edwards's Bot. Reg. 24: misc. 44. 1838; *Dressleriella equitantifolia* (Ames) Brieger, Die Orchideen 9(33-36): 555. 1977; *Briegeria equitantifolia* (Ames) Senghas, Die Orchideen 31: 30. 1980.

Plantas hasta 40 cm de alto, generalmente péndulas sobre troncos de árboles; tallos lateralmente aplanados, atenuados hacia la base y expandiéndose hacia el ápice, 3 mm de ancho en la base y 13 mm de ancho en el ápice. Hojas ensiformes, lateralmente aplanadas, hasta 20 cm de largo y 10 mm de ancho, ápice acuminado, imbricadas. Inflorescencia pedunculada, el pedúnculo hasta 15 cm de largo, connado a los  $\frac{3}{4}$  basales de la hoja apical, con 1–3 flores sucesivas, la bráctea floral hasta 10 mm de largo, café, escariosa, las flores café-verde olivas, el labelo y la columna amarillos; sépalos lanceolados, hasta 13 mm de largo, agudos, el dorsal 3.8 mm de ancho, los laterales 3.3 mm de ancho; pétalos oblongos, 10 mm de largo y 2.2 mm de ancho, agudos; labelo 8 mm de largo y 5 mm de ancho cuando aplanado, unguiculado y adnado a los  $\frac{2}{3}$  basales de la columna, 3-lobado cerca de la mitad, los lobulos laterales 4 mm de largo, erectos, escondiendo el ápice de la columna, el lóbulo medio linear, 3.5 mm de largo y 1.5 mm de ancho, en ángulo recto a la columna, ápice obtuso, disco con un callo trifido, elevado; columna 10 mm de largo; ovario y pedicelo juntos 10 mm de largo.

Rara, bosques montañosos húmedos, zona norcentral; 1000–1400 m; florece varias veces al año, principalmente en agosto, Distribución: México a Panamá. Esta *Jacquiniella* puede reconocerse de inmediato por sus hojas imbricadas, equitantes y colgantes y la flor inconspicua café-verde oliva en el extremo de la hoja más interna (Figura 15), (Dressler, 1966).

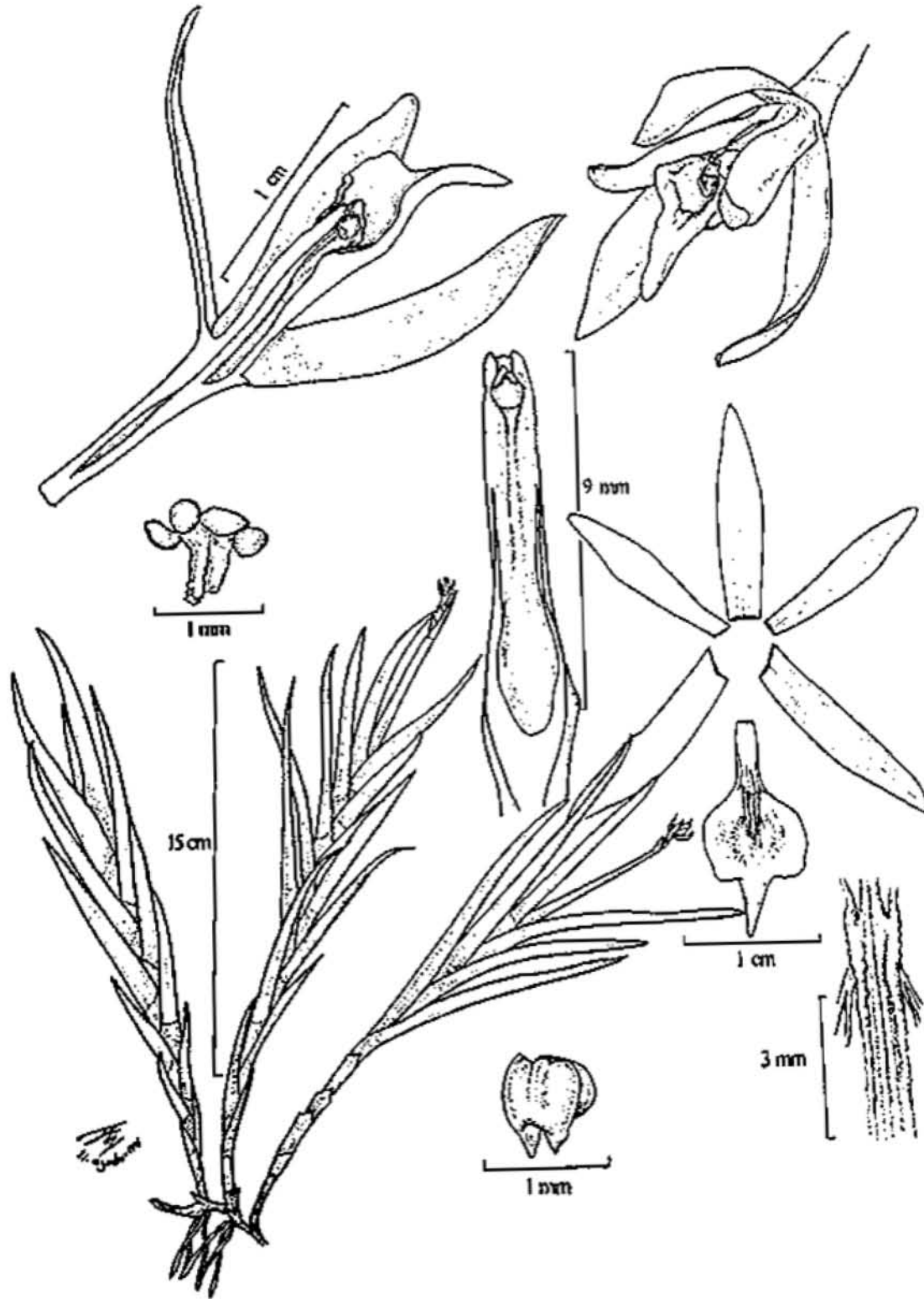


Figura 15. *Jacquiniella equitantifolia* (Ames) Dressler. Planta con inflorescencia; flor vista de frente y de tres cuartos; vista lateral de la columna y del labelo; disección floral; columna en vista ventral y lateral; polinario en vista ventral, dorsal y lateral; antera. Ilustrado por Rolando J. Machorro., basado en una planta de Veracruz. Consultada en el Herbario AMO, 2015. Lamina no publicada.

## Antecedentes

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre el cultivo *in vitro* de semillas y aclimatización de ambas especies para este estudio, encontrando únicamente literatura acerca de aspectos taxonómicos de *Dichaea* (Valsko, Krahl, Holanda & Zartman, 2014), ecológicos de *Jacquiniella* (Scheffknecht, Winkler, Hülber, Rosas & Hietz, 2010), o listados de la Orquideoflora donde se mencionan a ambas especies (Pérez *et al.*, 2010).

Por lo cual se realizó la búsqueda con los géneros afines filogenéticamente a *Jacquiniella* y *Dichaea* sobre este tema y solo se obtuvo información para algunos de *Jacquiniella*, Tabla 1.

Tabla 1. Antecedentes sobre cultivo *in vitro* y aclimatización de géneros afines a *Jacquiniella*.

Germinación de semillas y Desarrollo de plántulas <i>in vitro</i>			
Especie	Medio de cultivo	Resultados	Cita
<i>Cattleya bicolor</i>	VW <sup>1</sup> y MS <sup>2</sup>	Se recomienda para la germinación el medio VW <sup>1</sup> y para el desarrollo de plántulas el medio MS <sup>2</sup> .	Suzuki, Almeida, Pescador y Ferreira, 2010
<i>C. mendelii</i>	MS <sup>2</sup> 100%, MS <sup>2</sup> 100% + JP <sup>3</sup> , MS <sup>2</sup> 100% + AC <sup>4</sup> , MS <sup>2</sup> 100% + AIA <sup>5</sup> y MS <sup>2</sup> 100% + AG <sup>6</sup>	El mejor porcentaje de germinación se obtuvo en el medio de MS <sup>2</sup> + AC <sup>4</sup> y MS <sup>2</sup> + JP <sup>3</sup> .	Salazar, 2012
<i>C. loddigesii</i>	MS <sup>2</sup> 50% sin o con 10, 20, 30 y 40 gL <sup>-1</sup> de sacarosa en el medio	La concentración de 20 gL <sup>-1</sup> de sacarosa fue la más exitosa para la germinación de esta orquídea.	Galdiano, Mantovani, De Faria & Lemos, 2013
<i>C. mendelii</i> y <i>C. quadricolor</i>	MS <sup>2</sup> adicionado con AG <sup>6</sup> y ANA <sup>7</sup>	Los medios con AG <sup>6</sup> fueron los mejores para la germinación, mientras que los medios con ANA <sup>7</sup> favorecieron el crecimiento.	Díaz, Torres, Rojas & De La Barrera, 2015
<i>C. walkeriana</i>	Fertilizante Peters® (10:30:20) en diferentes concentraciones: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 gL <sup>-1</sup> .	La máxima producción de plántulas se obtuvo al utilizar 5,22 gL <sup>-1</sup> de fertilizante, con menor concentración disminuye la producción de plántulas.	Rodrigues, Novais, Dias, Otoni y de Albuquerque, 2015
<i>C. forbesii</i> y <i>C. harrisoniana</i>	MS <sup>2</sup> 100% + CA <sup>8</sup> MS <sup>2</sup> 50% + CA <sup>8</sup>	La germinación fue exitosa en MS <sup>2</sup> 50% + CA <sup>8</sup> , la adición de CA <sup>8</sup> favorece el incremento de la altura en las plántulas.	Schneiders, Pescador, Booz y Suzuki, 2015
<i>C. intermedia</i>	MS <sup>2</sup> 100% y MS <sup>2</sup> 50% adicionados con 15, 30, 45 y 60 gL <sup>-1</sup> de sacarosa	Las plántulas se desarrollaron en MS <sup>2</sup> 50% con 45 o 60 gL <sup>-1</sup> de la sacarosa y con 60 gL <sup>-1</sup> en MS <sup>2</sup> 100%	Sasamori, Endres & Droste, 2015
<i>Brassolaeliocattleya</i>	MS <sup>2</sup> al 100, 75, 50 y 25% de sales inorgánicas.	El mejor porcentaje de germinación se obtuvo en los medios MS <sup>2</sup> al 50% y MS <sup>2</sup> al 25%.	Andrade, Vargas, Villegas, Lopez, Guillen & Alia, 2015

<sup>1</sup>VW: Vacin Que & Went; <sup>2</sup>MS: Murashige & Skoog; <sup>3</sup>JP: Jugo de Piña; <sup>4</sup>AC: Agua de Coco; <sup>5</sup>AIA: Ácido indolacético; <sup>6</sup>AG<sub>3</sub>: Ácido giberélico; <sup>7</sup>ANA: Acido naftalenacético; <sup>8</sup>CA: Carbón activado.

<b>Aclimatización</b>			
<b>Especie</b>	<b>Sustratos empleados</b>	<b>Resultados</b>	<b>Cita</b>
<i>Brassavola tuberculata</i>	Sphagnum, carbón y fibra de coco.	Los tres sustratos son óptimos para la aclimatización de las plántulas.	De Macedo, Rosa, Soares, Tatará, Hofmann & Rosa, 2014
<i>B. tuberculata</i>	Sphagnum, fibra de coco y una mezcla de Sphagnum + fibra de coco (1: 1).	Sphagnum es el sustrato más adecuado para la aclimatización	Sousa, Rosa, Macedo & Soares, 2015
<i>Cattleya y Phalaenopsis</i>	La mezcla MAP <sup>1</sup> (1:1:1); MCP <sup>2</sup> (1:1:1); ACP <sup>3</sup> (1:1:1); MP <sup>4</sup> (1:1); AP <sup>5</sup> (1:1).	La mejor mezcla fue MAP <sup>1</sup> para <i>Phalaenopsis</i> , y MP <sup>4</sup> para <i>Cattleya</i>	Díaz, Namur, Bollati & Arce, 2010
<i>Cattleya forbesii</i> y <i>Laelia purpurata</i>	Turba, grava N°2; xaxim y la mezcla de grava N°2 + turba (3:1).	Xaxim fue el mejor sustrato para <i>C. forbesii</i> y para <i>L. purpurata</i> fue la mezcla de grava N°2 + turba.	Seidel & Venturieri., 2011
<i>Cattleya intermedia</i>	Sphagnum y corteza de pino	La supervivencia de las plántulas fue del 27% en la corteza de pino y del 53% en Sphagnum.	Dorneles y Trevelin., 2014
<i>Cattleya sp</i>	Corteza, perlita y peatmoss (1:1:1) Perlita y peatmoss (1:1)	Las plántulas se aclimatizarán con éxito en la mezcla de corteza, perlita y peatmoss (1:1:1)	Dewir, El-Mahrouk, Murthy & Paek, 2015

<sup>1</sup>MAP: musgo, viruta de algarrobo y perlita; <sup>2</sup>MCP: musgo, carbón y perlita; <sup>3</sup>ACP: viruta de algarrobo, carbón y perlita; <sup>4</sup>MP: musgo y perlita; <sup>5</sup>AP: viruta de algarrobo y perlita.

## Justificación

La información que se tiene sobre el número de especies conocidas de la familia Orchidaceae se presenta como un valor estimado, mientras, que el número de especies extintas de este grupo de plantas resulta mayor que el número de los nuevos descubrimientos.

La familia Orchidaceae es muy importante, ya que es la más especializada dentro del reino vegetal, pues ha evolucionado junto con sus polinizadores los cuales son específicos para cada una de las especies de esta familia, con respecto a sus raíces presenta una asociación simbiótica con hongos también específicos para cada ejemplar. Aparte de poseer una belleza extraordinaria con respecto a las flores, lo que ha hecho que se posicionen en el mercado ilegal.

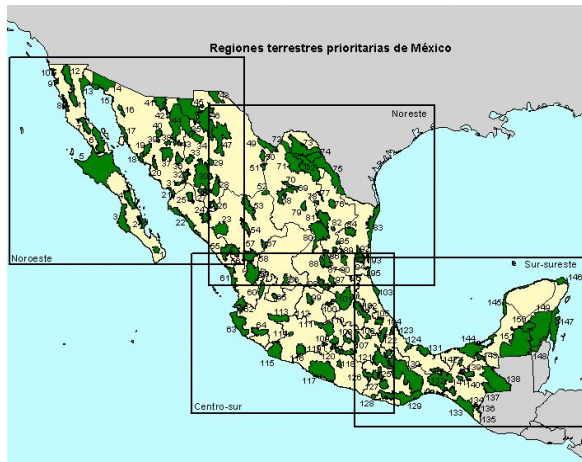


Figura 16. Regiones Terrestres Prioritarias de México. Tomado de Arriaga *et al.*, 2000.

El Municipio de Cuetzalan del Progreso, es considerado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) como una Región Terrestre Prioritaria de México (RTP-105) (Figura 16). Esta región se definió como prioritaria para la conservación por la existencia de bosque mesófilo de montaña presentes en las cañadas y la selva alta perennifolia en las partes bajas (Arriaga, Espinoza, Aguilar, Martínez, Gómez y Loa, 2000).

La vegetación se encuentra muy fragmentada debido principalmente a la ganadería extensiva, la deforestación, el cultivo de árboles frutales, el excesivo turismo en la zona, y la extracción masiva de plantas adultas, para el comercio ilegal (Figura 17), este grado de perturbación hace más difícil que las semillas de orquídeas encuentren esa asociación con los hongos simbiotes para poder germinar *in situ*, de aquí que la micropropagación a través de la germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas, así como el desarrollo de plántulas bajo estas mismas condiciones y posteriormente su adaptación *ex vitro*, da la oportunidad a muchas especies de orquídeas para ser estudiadas mediante esta técnica; además, de generar conocimiento sobre la biología de la germinación y desarrollo, ser una herramienta para obtener gran cantidad de ejemplares de estas especies mexicanas en cuestión, antes de que estén bajo alguna categoría de riesgo.

La información que se genere de este estudio será la base para la conservación, manejo, comercialización y estudios posteriores.



Figura 17. Comercio ilegal de orquídeas, “La Plazuela”, Cuetzalan del Progreso, 2017.

## **Hipótesis**

La implementación del cultivo *in vitro* ha dado resultados exitosos en la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas afines a los géneros *Dichaea* y *Jacqiniella*, empleando medios de cultivo como MS y algunos con fertilizantes, como Peters en diferentes concentraciones de sus sales basales, como también para la adaptación de las plántulas a condiciones ambientales después de su cultivo *in vitro*, empleando diversos sustratos; por lo que se espera que la respuesta de la germinación y desarrollo *in vitro* de estas dos especies, así como su adaptación a las condiciones *ex vitro* sea exitosa.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

- Establecer un protocolo de germinación, desarrollo fenológico, crecimiento *in vitro* y aclimatización para *Dichaea glauca* y *Jacqiniella equitantifolia*.

### **Objetivos particulares**

- Determinar el medio de cultivo más adecuado para la germinación de *Dichaea glauca* y *Jacqiniella equitantifolia*.
- Comparar el efecto de dos medios de cultivo: MS (50%) y KM (50%) para el desarrollo de las plántulas.
- Establecer el medio de cultivo óptimo: MS (50%), KM (50%) y Peters (12%) para el crecimiento de las plántulas germinadas *in vitro*.
- Obtener la aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro* para su adaptación a las condiciones ambientales *ex vitro* y supervivencia.



## Material

### **Material biológico**

Para este trabajo fueron empleadas semillas, obtenidas a partir de frutos maduros de *Dichaea glauca* (tres cápsulas) y *Jacquiiniella equitantifolia* (dos cápsulas) (Figura 18), estos frutos fueron proporcionados por la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) Jardín Botánico Xoxoctic, ubicado en la Carretera Cuetzálán -Yohualichan km 2.8, Cuetzálán del Progreso, en el estado de Puebla.



Figura 18. A) Fruto maduro de *Dichaea glauca*. B) Fruto maduro de *Jacquiiniella equitantifolia*.

## Método

### **Viabilidad de las semillas**

Los diferentes lotes de semillas de cada especie se sometieron a una prueba para evaluar la viabilidad con 2, 3, 5- cloruro de trifenil tetrazolio (TTC). Previamente las semillas fueron colocadas en sobres de papel filtro (una muestra de 200 semillas aproximadamente); siendo asegurados los sobres con un clip (Figura 19). Posteriormente se sumergieron los sobres en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% y una gota de jabón líquido durante diez minutos, una vez transcurrido el tiempo se enjuagaron con agua destilada estéril, este procedimiento se repitió tres veces, para después ser colocados en cajas Petri con solución de TTC al 1% (1g en 100 mL de agua destilada), durante 24 horas en la oscuridad; al concluir este lapso, los sobres fueron enjuagados para retirar el exceso de TTC para examinarlas bajo el microscopio estereoscópico (Ossenbach, Arce y Warner, 2007). Se realizaron dos réplicas del proceso de viabilidad por lote de semillas de cada especie. Se calculó el porcentaje de viabilidad.

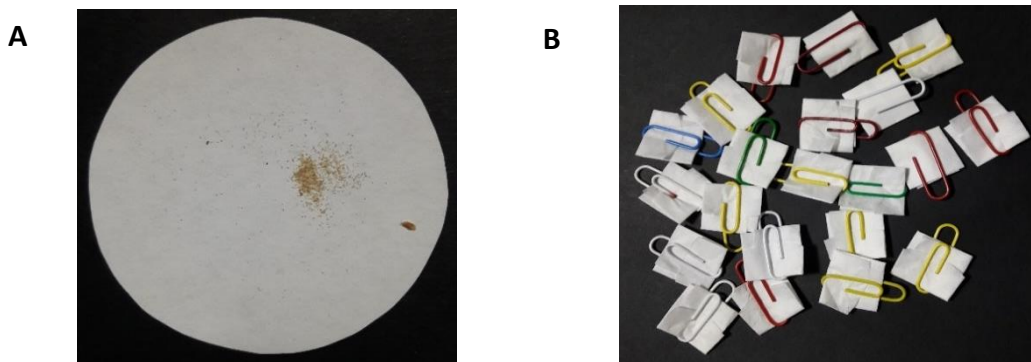


Figura 19. A) Semillas de orquídea. B) Sobres asegurados con los clips.



## Medios de cultivo para la germinación y el desarrollo

Se utilizaron dos medios nutritivos, MS (Murashige & Skoog, 1962) y KM (Kao & Michayluck, 1975), como tratamientos, con una concentración del 50% con respecto a las sales inorgánicas. Cada uno fue adicionado con tiamina  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$ , niacina  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ , piridoxina  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$ , myo-Inositol  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , sacarosa  $30 \text{ gL}^{-1}$ , agar gel  $5 \text{ gL}^{-1}$  como agente gelificante y carbón activado  $1 \text{ gL}^{-1}$  como agente antioxidante. Todos los medios de cultivo se suplementaron con Gerber® de plátano  $20 \text{ gL}^{-1}$  (Figura 20).



Figura 20. Preparación de los medios nutritivos MS y KM.

El pH del medio se ajustó a 5,7 usando NaOH o HCL 0.5 M. Una vez preparado el medio se procedió a verter 25 mL por frasco, obteniendo un total de 12 frascos. Se esterilizaron a 1.5 atmosferas de presión y  $120^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

## Desinfestación de semillas



Figura 21. Sobres de semilla previos a la desinfestación.

Fueron elaborados un total de 12 sobres de papel filtro con aproximadamente 200 semillas, seis sobres de *D. glauca* y seis para *J. equitantifolia*, se aseguraron con un clip metálico para evitar que las semillas se salieran del sobre. Los sobres se colocaron en un vaso de precipitados, con agua destilada para permitir que estos se humedeciera y así poder eliminar las burbujas de aire que pudieran tener (Figura 21), para después comenzar el proceso de desinfestación, para ello se colocaron los sobres en etanol al 70% durante 5 minutos, una vez transcurrido el tiempo, se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% y una gota de jabón líquido (para romper la tensión superficial) durante 15 minutos, para concluir se les dieron tres lavado con agua destilada estéril. Todo este procedimiento se llevó a cabo en la campana de flujo laminar previamente desinfectada con hipoclorito de sodio y etanol al 70%.

## Siembra de semillas

Después de la desinfestación, se les retiro el clip a cada uno de los sobres con semillas, para introducirlos en los frascos con medio de cultivo (KM y MS), se tuvieron que extender los sobres para que las semillas quedaran expuestas (Figura 22). Se sembraron un total de tres repeticiones para cada medio de cada especie.

Una vez terminada la siembra, los frascos con semillas, se colocaron en la sala de incubación a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, a fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, en este experimento se manejó una intensidad luminosa de 1076.39 lux para observar la mejor respuesta en cada uno de los tratamientos.

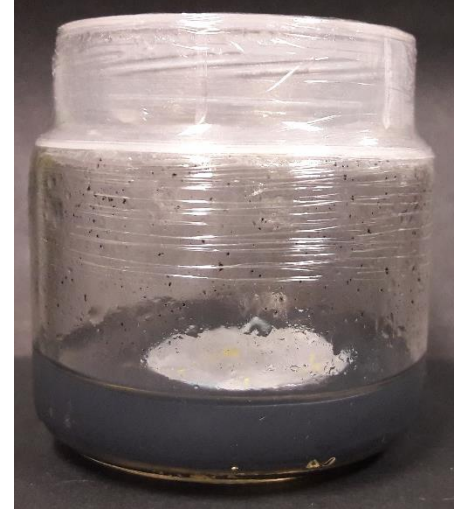


Figura 22. Semillas en medio nutritivo.

## Evaluación de la germinación

La germinación de las semillas de *D. glauca* y de *J. equitantifolia*, para cada uno de los tratamientos, se consideró a partir de que los embriones estaban hinchados y verdes (estadios 1) (Figura 23), esto se basó en los estadios descritos por Johnson & Kane (2007) y Seaton & Ramsay (2005), el porcentaje de semillas germinadas en cada una de las réplicas de los tratamientos se registró, apoyada por observaciones y fotografías, semanalmente durante 238 días a partir de la siembra.

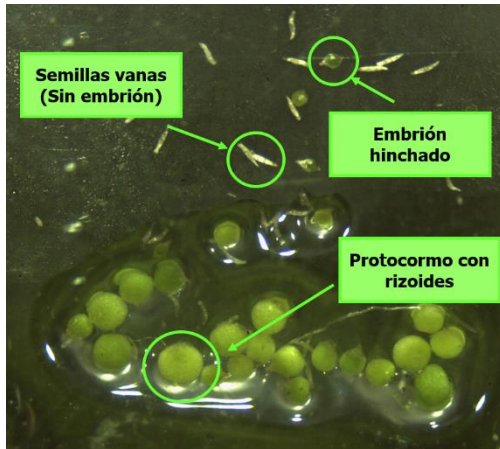


Figura 23. Algunos estadios presentes en la germinación.

## Evaluación del desarrollo ontogénico

Para evaluar el desarrollo de *D. glauca* y de *J. equitantifolia*, en cada uno de los tratamientos, se consideraron los cambios morfológicos que estos embriones pudieran presentar, con la finalidad de describir la ontogenia de las especies, basados en los estadios descritos por Johnson & Kane (2007) y Seaton & Ramsay (2005) (Anexo 9), (Figura 24), se consideró el porcentaje de cada uno de los estadios en las réplicas de los tratamientos y se registró, apoyada por observaciones y fotografías, semanalmente durante 287 días a partir de la siembra.

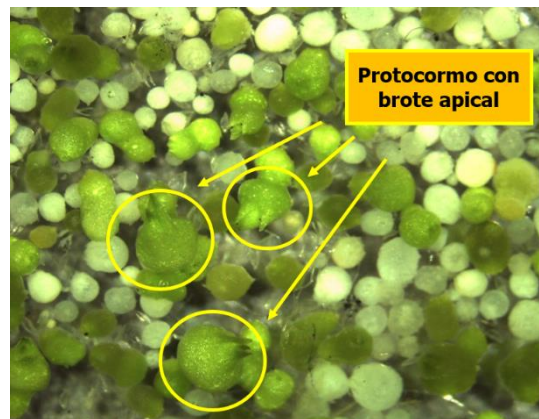


Figura 24. Estadio 4 “Protocormo con brote apical”, presente en el desarrollo.

## Evaluación del índice de desarrollo

Los cambios ontogénicos del embrión de las semillas de *D. glauca* y *J. equitantifolia* fueron registrados en cada una de las repeticiones por tratamiento semanalmente durante 287 días, para establecer la ontogenia del embrión durante el proceso de la germinación y desarrollo; así como, para calcular el índice de desarrollo (I.D.) considerando ocho estadios ontogénicos (Figura 25).










Estadio o Clase	Índice de desarrollo	Descripción	
0	Sin germinar	Semilla con embrión viable	
1	100	Semilla germinando	
2	200	Embrión hinchado rompiendo la testa	
3	300	Protocormo con rizoides	
4	400	Protocormo con brote apical	
5	500	Plántula con hojas iniciales	
6	600	Plántula con hojas y raíz	
7	700	Plántula con raíces	
8	800	Plántula con pseudobulbo y raíces	

Figura 25. Estadios ontogénicos registrados durante el desarrollo de la germinación *in vitro* de *Dichaea glauca* y *Jacquinilla equitantifolia*. Tomado de Duarte, 2014.

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 (Duarte, 2014):

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

Donde:

$x$  = Valor del estadio ontogénico

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

$e$  = Total de individuos de la muestra



## Medios de cultivo para el crecimiento



Figura 26. Medio empleado para el crecimiento de las plántulas.

Para evaluar el crecimiento de las plántulas de *D. glauca* y *J. equitantifolia*, se utilizaron tres diferentes medios nutritivos, MS (Murashige & Skoog, 1962), KM (Kao & Michayluck, 1975) y Peters 24:8:16, como tratamientos. Con una concentración al 50% con respecto a las sales inorgánicas para MS y KM, para Peters la concentración utilizada fue al 12%.

Cada uno adicionado con tiamina  $0.4$

$\text{mgL}^{-1}$ , niacina  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ , piridoxina  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$ , myo-Inositol  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , sacarosa  $30 \text{ gL}^{-1}$ , agar gel  $5 \text{ gL}^{-1}$  como agente gelificante y carbón activado  $1 \text{ gL}^{-1}$  como agente antioxidante. Todos los medios de cultivo se suplementaron con Gerber® de plátano  $20 \text{ gL}^{-1}$ .

El pH del medio se ajustó a 5,7 usando NaOH o HCL al 0.5 M. Una vez preparado el medio se vertieron 25 mL por tubo de ensaye (Figura 26). Se esterilizaron a 1.5 atmosferas de presión y  $120^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

## Subcultivos para el crecimiento de las plántulas de orquídeas

Fueron seleccionadas 60 plántulas de talla homogénea de un rango aproximado de 0.5 a 1 cm para *D. glauca* y de 4 a 5 cm para *J. equitantifolia*. Se colocó un ejemplar por tubo de ensaye dando un total de 20 repeticiones por cada medio nutritivo.

Una vez realizado el subcultivo, las plántulas dentro de los tubos de ensaye se colocaron en la sala de incubación a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad en este experimento se manejó una intensidad luminosa de 1076.39 lux para poder observar la mejor respuesta en cada uno de los diferentes tratamientos (Figura 27).

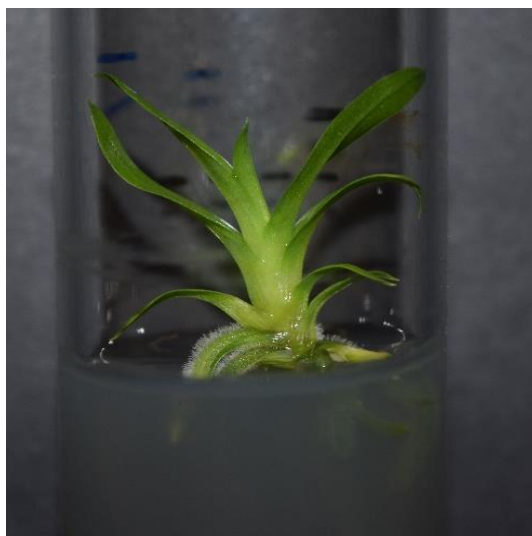


Figura 27. Ejemplar de *Dichaea glauca*, preparada para evaluación del crecimiento.

## Evaluación del crecimiento de las plántulas

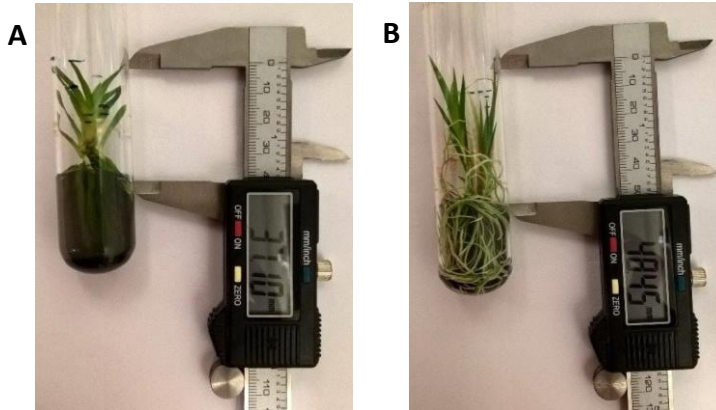


Figura 28. Evaluación del crecimiento. A) *D. glauca* y B) *J. equitantifolia*.

El crecimiento de las plántulas de *D. glauca* y *J. equitantifolia*, para cada uno de los tratamientos, fue evaluado únicamente en cuanto a la talla de cada individuo y se comparó entre los tratamientos, esto se realizó semanalmente durante 120 días, apoyada por fotografías (Figura 28).

## Trasplante de plantas de *in vitro* a *ex vitro*

### Preparación de las plantas para el trasplante

Se limpió externamente con etanol al 70% los recipientes con las plantas *in vitro* pre-acondicionadas, se destaparon, se adiciono agua para hidratar el agar y permitir que las raíces se desprendieran con facilidad, fueron sacadas cuidadosamente las plantas con ayuda de unas pinzas de disección y colocadas en una bandeja con agua corriente, hasta eliminar los restos del medio de cultivo adherido a las raíces y/u hojas. Posteriormente con ayuda de un bisturí se le retiraron las hojas muertas. Las plantas se sumergieron en una solución de fungicida “Manzate 200DF” ( $1\text{gL}^{-1}$ ) y fertilizante foliar “Peters” 24:8:16 ( $1\text{gL}^{-1}$ ) durante 15 minutos (Figura 29). Después de este procedimiento se colocaron las plantas en su respectivo sustrato para llevar a cabo la evaluación de la aclimatización.

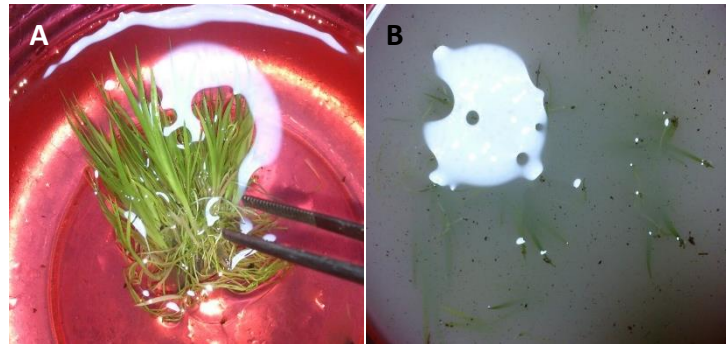


Figura 29. Plantas de *J. equitantifolia* A) En agua B) En solución de fungicida y fertilizante.



Figura 30. Sustratos y mezclas.

### Aclimatización de *D. glauca*

Para la aclimatización de *D. glauca* se probaron cinco tratamientos diferentes, tres sustratos y dos mezclas: el primero: sustrato de fibra de coco, el segundo: corteza de pino-encino y el tercero: la implementación de cero grueso como sustrato. El cuarto: una mezcla de corteza de pino-encino + fibra de coco (2:1) y por último: una mezcla de cero grueso + *Sphagnum* (3:1) (Figura 30), se seleccionaron 25 plantas de talla homogénea (con un rango aproximado de 3.8 a 4 cm) por tratamiento. Los ejemplares se colocaron en pequeñas bandejas previamente acondicionadas con el sustrato o la mezcla.

### Aclimatización de *J. equitantifolia*

Para la aclimatización de *J. equitantifolia* se utilizaron dos contenedores de vidrio (50 cm x 25.5 cm x 29 cm) para utilizarlos como micro invernaderos: Sistema 1 (S1) sin tezontle y Sistema 2 (S2) con una capa de tezontle, que siempre se mantuvo húmedo. Dentro de ellos se colocaron cada uno de los tratamientos. Estos consistieron en un sustrato de fibra de coco (tratamiento 1) y una mezcla de corteza de pino-encino + fibra de coco (2:1) (tratamiento 2). Se prepararon dos bandejas por cada tratamiento, colocando una capa de tezontle para un buen drenaje. A su vez, fueron seleccionadas plantas de talla homogénea (de un rango aproximado de 5.5 a 6 cm) y se colocaron 100 plantas en cada tratamiento (Figura 31). Los sistemas se mantuvieron cerrados para generar un micro ambiente.



Figura 31. Plantas de *J. equitantifolia* en la mezcla de corteza + fibra de coco.

### Evaluación de la aclimatización

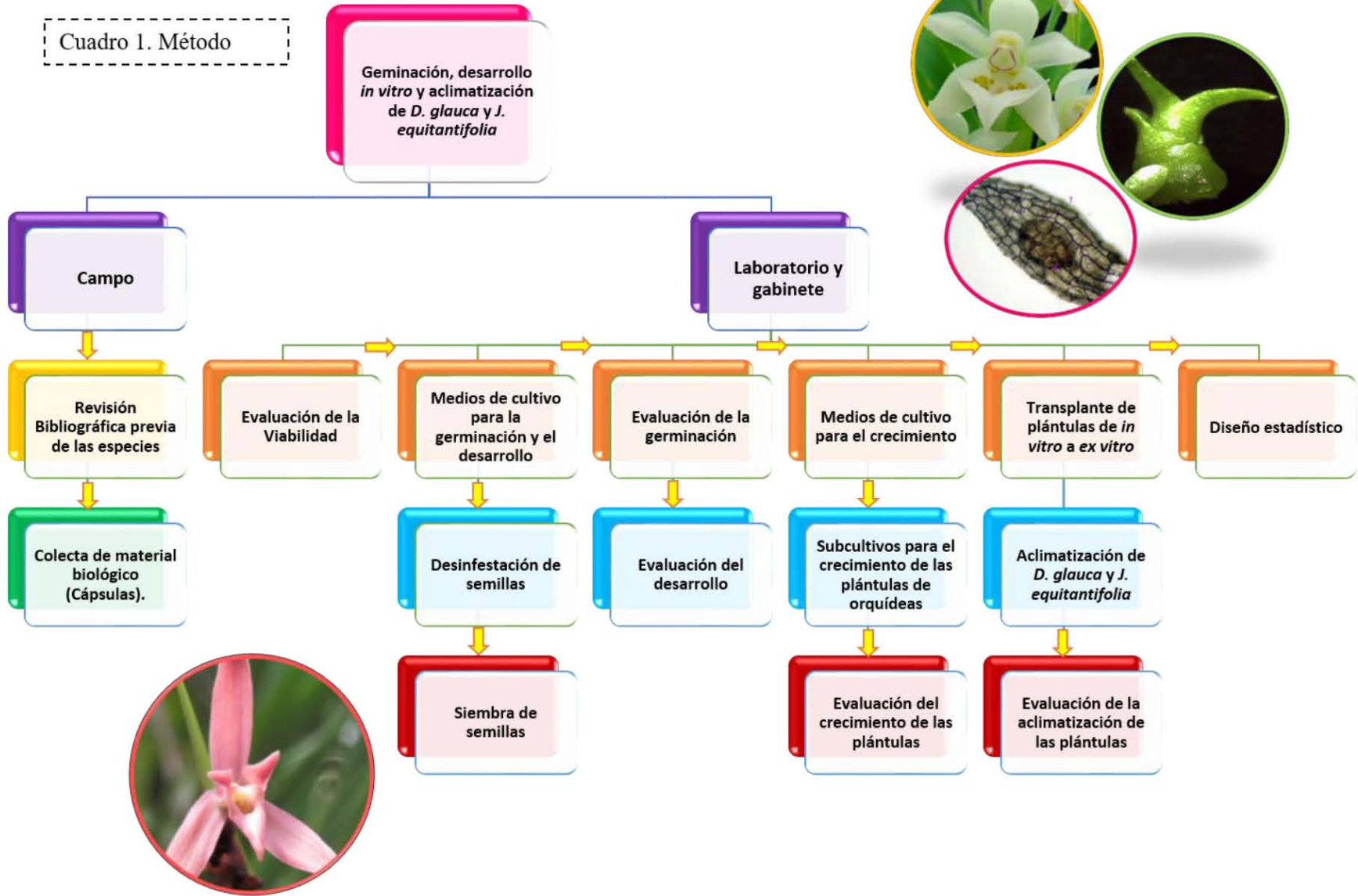
Las plantas fueron evaluadas después de 120 días de ser trasplantadas de in vitro a ex vitro, se consideró que el proceso había sido exitoso cuando fue registrada la formación de nuevas estructuras como raíces u hojas. Todo este proceso fue apoyado por fotografías.

### Diseño estadístico

Para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos para la germinación, desarrollo y crecimiento de las plantas, los datos se analizaron estadísticamente con el programa STATA 11.0 (Data Analysis and Statistical Software), STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.2.04 y Microsoft Excel (Anexo 10 - 17).



Cuadro 1. Método



## Resultados y Análisis de Resultados

### Evaluación de la viabilidad

Al evaluar la viabilidad de las semillas, de cada uno de los lotes, se cuantificaron únicamente aquellas cuyos embriones adquirieron una tonalidad rojiza, obteniendo para *D. glauca* un porcentaje de viabilidad de 0; mientras que, para *J. equitantifolia* el porcentaje de uno de los lotes (2.1) fue de 5% (Figura 32, Tabla 2).

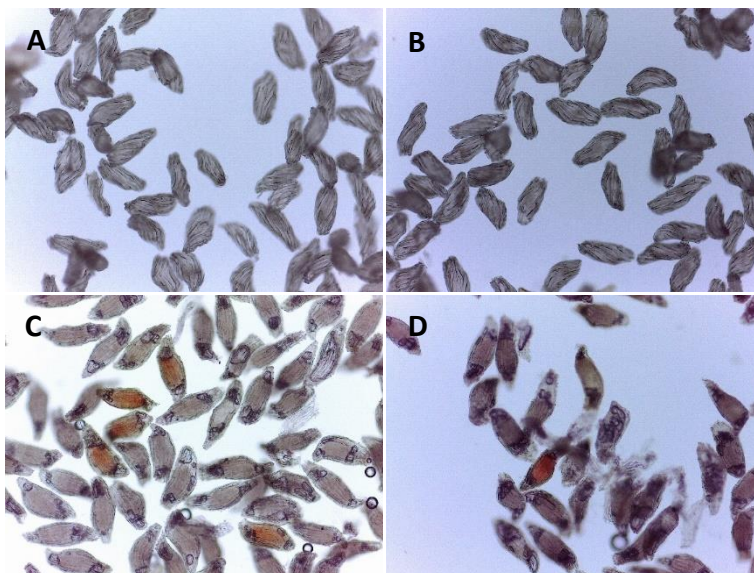


Figura 32. Evaluación de la viabilidad con TTC. (A y B) Semillas de *Dichaea glauca*. (C y D) Semillas de *Jacquiniella equitantifolia*.

Tabla 2. Viabilidad de semillas maduras de *D. glauca* y *J. equitantifolia*.

Nº cápsula	% viabilidad
<i>Dichaea glauca</i>	
1	0
1.1	0
1.2	0
<i>Jacquiniella equitantifolia</i>	
2	0
2.1	5



## Evaluación de la germinación de *Dichaea glauca*

A pesar de que el porcentaje de viabilidad de las semillas, para ambas especies, fue nulo o bajo, se decidió llevar a cabo la germinación como una evaluación directa de la viabilidad; sembrando las semillas en los medios nutritivos MS (Murashige & Skoog, 1962) y KM (Kao & Michayluck, 1975), como tratamientos, con una concentración del 50% con respecto a las sales inorgánicas.

El Análisis de varianza (ANDEVA), para comparar el porcentaje de germinación de *Dichaea glauca*, determinó que existieron diferencias significativas tanto para el tiempo, así como entre los medios (tratamientos) con un 95.0% de nivel de confianza (valor-P = 0.0000) (Anexo 10).

Para esta especie la germinación a través del tiempo e independientemente de los medios se inicia a partir de los 50 días de cultivo, como se puede observar en la Figura 33; ya que, a los 56 días germinaron el 12% de las semillas, incrementándose gradualmente este porcentaje en los días posteriores hasta un 52% a los 77 días resultando estos porcentajes diferentes estadísticamente entre sí y diferentes a los porcentajes alcanzados a partir del día 84 donde el 67% de las semillas germinaron. A partir de este último día de cultivo y hasta los 287 días los porcentajes de germinación fueron iguales estadísticamente entre sí, aun cuando para el día 91 fue de 67% y en los tiempos restantes fue de 69%, son considerados estadísticamente como el mayor porcentaje de germinación obtenido.

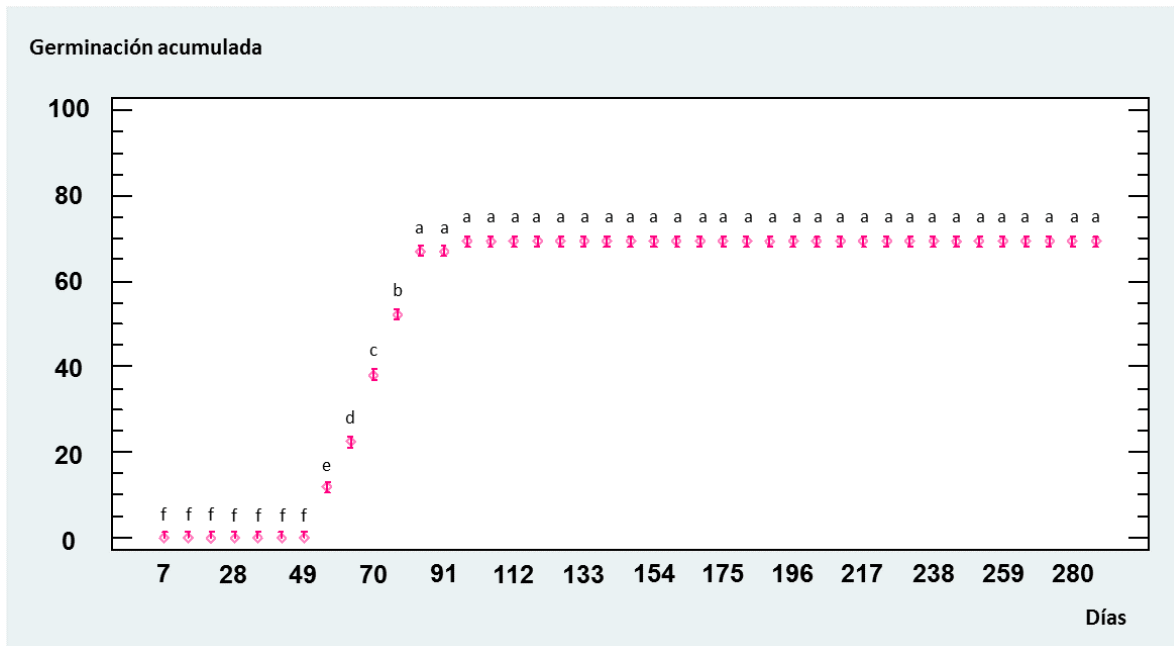


Figura 33. Germinación de *Dichaea glauca*, a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.

En la Figura 34, se aprecia que el mayor porcentaje de semillas germinadas, independientemente del tiempo, fue en el medio nutritivo Kao & Michayluck, con una media de 55%, resultando mayor y diferente estadísticamente al obtenido en el medio Murashige & Skoog con 52%.

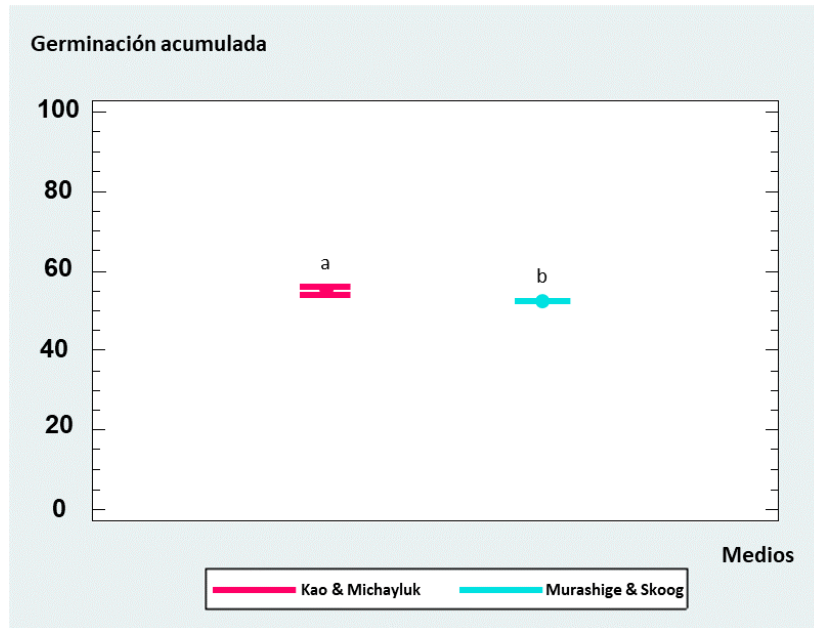


Figura 34. Comparación de medias de los porcentajes de germinación de *D. glauca*, independientemente del tiempo de evaluación.

En la Figura 35, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre la germinación de las semillas de *D. glauca* a través del tiempo. Esta se inicia en ambos medios a los 56 días después de la siembra y se incrementa en los días posteriores. El máximo porcentaje de germinación de las semillas se alcanzó a partir de los 98 días en ambos medios; sin embargo, en el medio KM el porcentaje fue de 71% y en el medio MS de 68%.

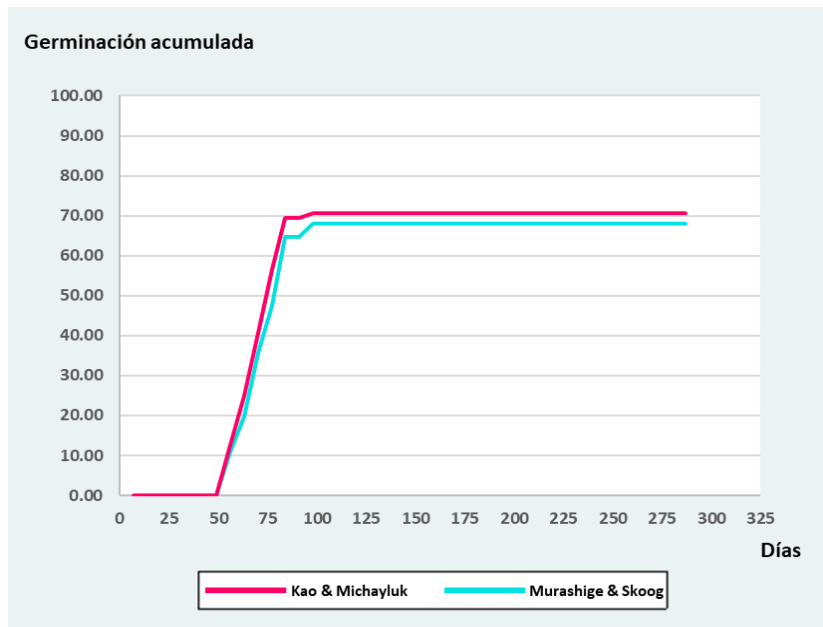


Figura 35. Comparación del porcentaje de germinación de *D. glauca*, a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS.

## Evaluación de la germinación de *Jacquiniella equitantifolia*

El ANDEVA, para comparar el porcentaje de germinación de *Jacquiniella equitantifolia*, determinó que existieron diferencias significativas tanto para el tiempo, así como entre los medios (tratamientos) con un 95.0% de nivel de confianza (valor-P = 0.0000) (Anexo 11).

Para esta especie la germinación a través del tiempo e independientemente de los medios se inicia a partir de los 20 días de cultivo, como se puede observar en la Figura 36; ya que, a los 28 días germinaron el 16% de las semillas, incrementándose gradualmente este porcentaje en los días posteriores hasta un 60% a los 42 días, resultando estos porcentajes diferentes estadísticamente entre sí y diferentes a los porcentajes alcanzados a partir del día 63 donde el 97% de las semillas germinaron, considerado este valor como el mayor porcentaje de germinación obtenido. A partir de este último día de cultivo y hasta los 287 días los porcentajes de germinación fueron iguales estadísticamente entre sí.

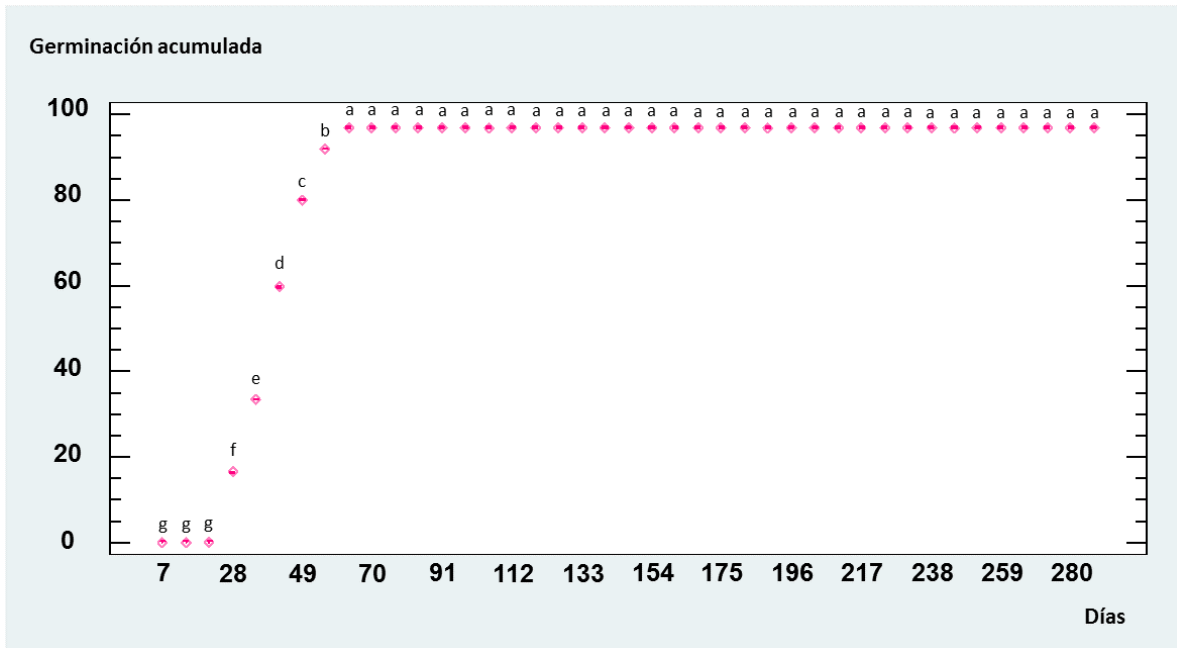


Figura 36. Germinación de *Jacquiniella equitantifolia*, a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.

En la Figura 37, se aprecia que el mayor porcentaje de semillas germinadas, independientemente del tiempo, fue en el medio nutritivo Kao & Michayluck, con una media de 85%, resultando mayor y diferente estadísticamente al obtenido en el medio Murashige & Skoog con 84%.

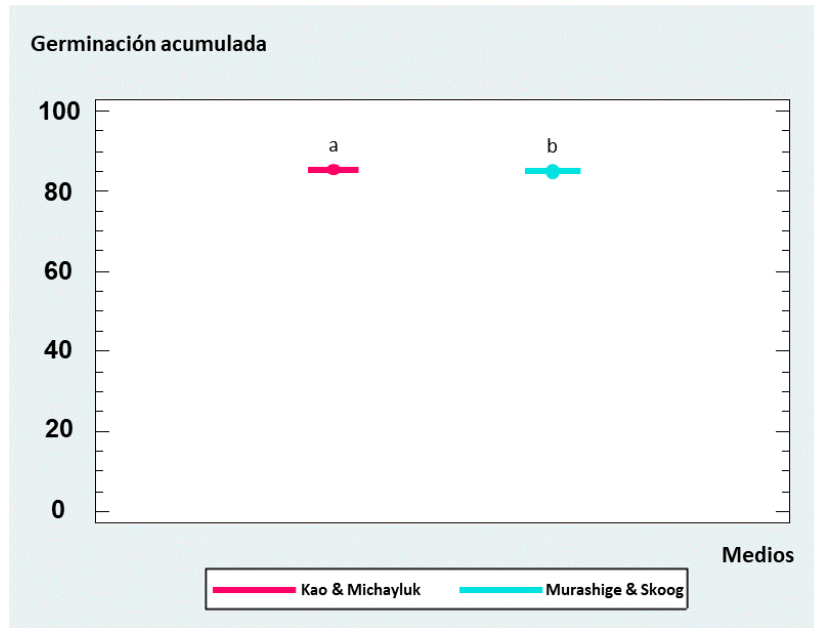


Figura 37. Comparación de medias de los porcentaje de germinación de *J. equitantifolia*, independientemente del tiempo de evaluación.

En la Figura 38, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre la germinación de las semillas de *J. equitantifolia* a través del tiempo. Esta se inicia en ambos medios a los 28 días después de la siembra y se incrementa en los días posteriores. El máximo porcentaje de germinación de las semillas se alcanzó a partir de los 63 días en ambos medios; sin embargo, en el medio KM el porcentaje fue de 97% y en el medio MS de 96%.

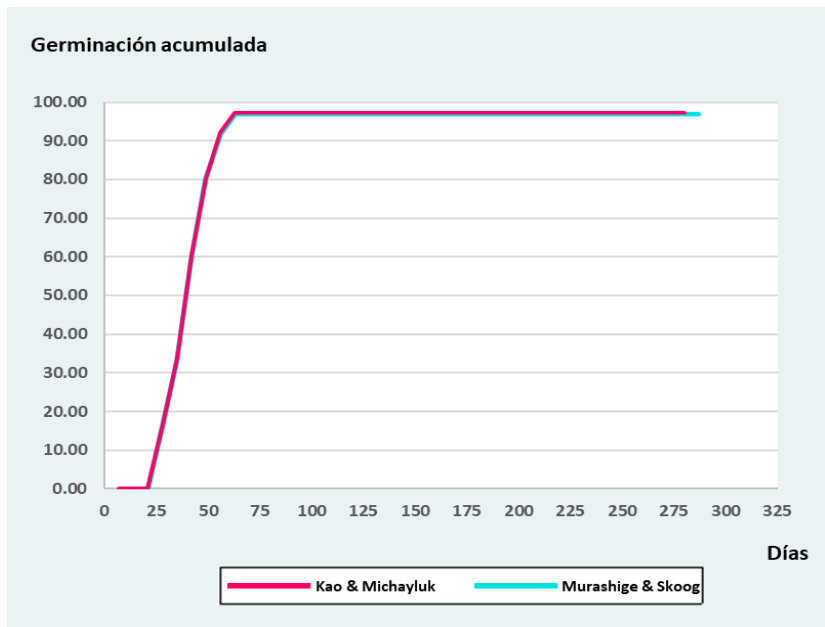


Figura 38. Comparación del porcentaje de germinación de *J. equitantifolia*, a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS.

## Evaluación del desarrollo ontogénico de *Dichaea glauca*

El ANDEVA para comparar los estadios de desarrollo ontogénico de *Dichaea glauca*, determinó que existieron diferencias significativas tanto para el tiempo, así como entre los medios (tratamientos) con un 95.0% de nivel de confianza (valor-P = 0.0000 y valor-P = 0.0016) respectivamente (Anexo 12).

El desarrollo ontogénico a través del tiempo e independientemente de los medios se inicia a partir de los 50 días de cultivo, como se puede observar en la Figura 39; ya que, a los 56 días se observan embriones hinchados y verdes (Estadio 1), incrementándose gradualmente en los días posteriores hasta los 70 días, en los cuales se registró la presencia de la ruptura de la testa de los mismos (Estadio 2). El desarrollo de protocormos con rizoides (Estadio 3) se observó a los 77 días, mientras que algunos protocormos con brotes apicales (Estadio 4) a los 105 días después de iniciado el cultivo. Las plántulas con hojas iniciales (Estadio 5) fueron registradas para los 126 días. Mientras que el estadio 6 (plántulas con hojas y una raíz) fue identificado en los 140 días resultando estos valores diferentes estadísticamente entre sí y diferentes a los valores alcanzados a partir del día 168 en donde ya se presentaba el estadio 7 (plántulas con raíces). A partir de los 196 días de cultivo y hasta los 287, los valores del estadio 8 (plántulas con raíces y pseudobulbos) fueron iguales estadísticamente entre sí.

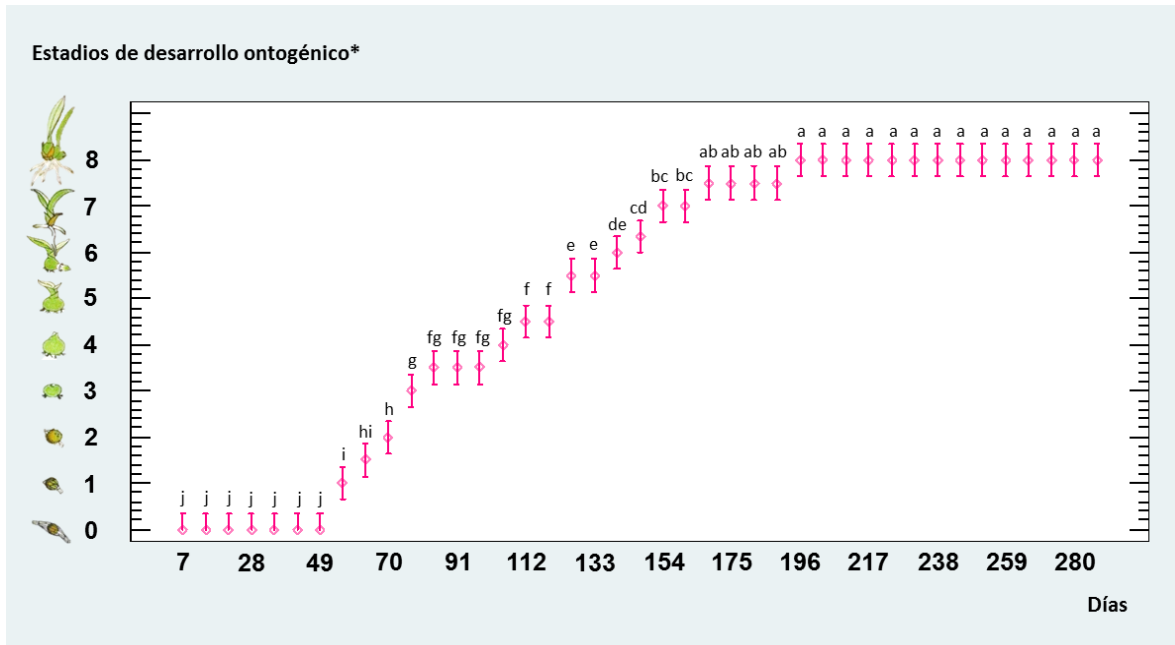


Figura 39. Desarrollo ontogénico de *Dichaea glauca*, a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.

\*0 = Semillas con embrión, 1 = Semilla germinando, 2 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 3 = Protocormo con rizoides, 4 = Protocormo con brote apical, 5 = Plántula con hojas iniciales, 6 = Plántula con hojas y raíz, 7 = Plántula con raíces, 8 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

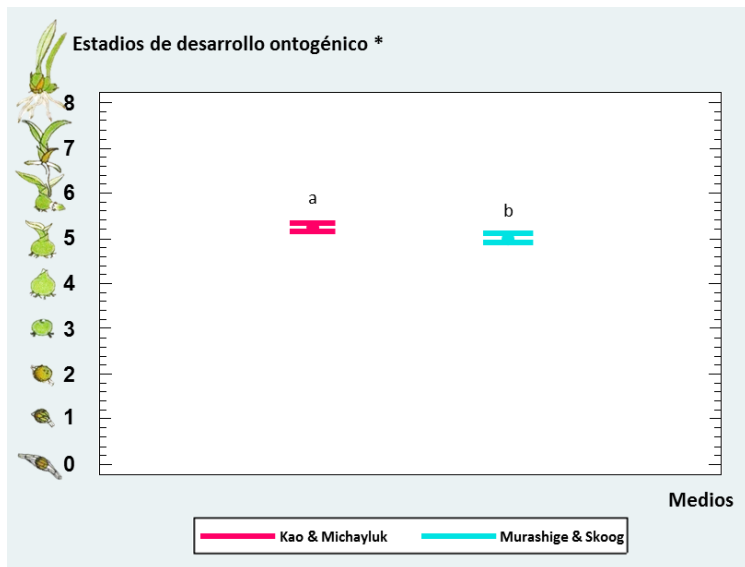


Figura 40. Comparación de las medias de la evaluación del desarrollo de *D. glauca* independientemente del tiempo.

En la Figura 40, se aprecia que el estadio de desarrollo, independientemente del tiempo, fue el de plántula con hojas iniciales (Estadio 5); sin embargo, estadísticamente el valor de la media fue mayor para el medio nutritivo Kao & Michayluk con 5.26 que al obtenido en el medio Murashige & Skoog con 5.

En la Figura 41, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre el desarrollo de los estadios ontogénicos de *D. glauca* a través del tiempo. Para el medio KM el estadio 1 inicia 56 días

después de la siembra de las semillas; ya que, algunos embriones se observaron hinchados y verdes. La ruptura de la testa comenzó a los 70 días, posteriormente a los 77 días fueron registrados protocormos con rizoides; protocormos con brotes apicales se desarrollaron 84 días después de ser sembradas las semillas; de las plántulas con hojas iniciales se tienen registros para los 112 días. Después de 126 días se obtuvieron plántulas con hojas y una raíz. Mientras que para los 154 días ya se tenían plántulas con raíces. El desarrollo de plántula con raíces y pseudobulbo se registraron a los 168 días manteniéndose así hasta el final del cultivo, a los 287 días.

A diferencia del medio nutritivo MS; donde, el estadio 1 inicio 56 días después de la siembra de las semillas. A los 63 días ya se apreció el estadio 2. El estadio 3 se registró a los 77 días; mientras que el estadio 4 a los 105 días desde la siembra y el estadio 5 a los 126 días. Posteriormente se obtuvieron plántulas con hojas y raíz, estadio 6, en los 140 días. Para los 154 días se evidenció la presencia del estadio 7. El estadio 8 fue registrado a los 196 días.

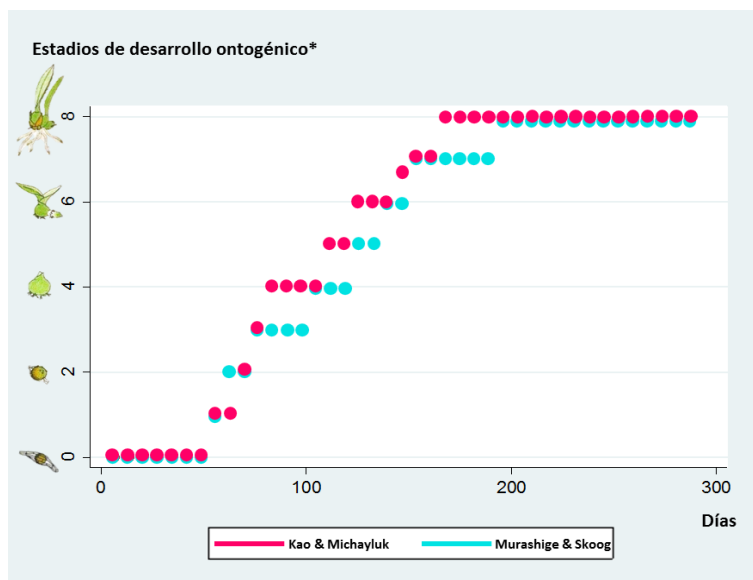


Figura 41. Evaluación del desarrollo de *D. glauca*, a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS.

\*0 = Semillas con embrión, 1 = Semilla germinando, 2 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 3 = Protocormo con rizoides, 4 = Protocormo con brote apical, 5 = Plántula con hojas iniciales, 6 = Plántula con hojas y raíz, 7 = Plántula con raíces, 8 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

## Evaluación del desarrollo ontogénico de *Jacquiiniella equitantifolia*

El ANDEVA para comparar los estadios de desarrollo ontogénico de *Jacquiiniella equitantifolia*, determinó que existieron diferencias significativas para el tiempo (valor-P = 0.0000), a diferencia de los medios (tratamientos) donde no existieron diferencias significativas (valor-P = 0.3252), con un 95.0% de nivel de confianza (Anexo 13).

El desarrollo ontogénico a través del tiempo e independientemente de los medios se inicia a partir de los 20 días de cultivo, como se puede observar en la Figura 42; ya que, a los 28 días se observan embriones hinchados y verdes (Estadio 1), incrementándose gradualmente en los días posteriores hasta los 35 días, en los cuales se registró la presencia de la ruptura de la testa de los mismos (Estadio 2). El desarrollo de protocormos con rizoides (Estadio 3) se observó a los 42 días, mientras que algunos protocormos con brotes apicales (Estadio 4) a los 70 días después de iniciado el cultivo. Las plántulas con hojas iniciales (Estadio 5) fueron registradas para los 91 días. Mientras que el estadio 6 (plántulas con hojas y una raíz) fue identificado en los 126 días resultando estos valores diferentes estadísticamente entre sí y diferentes a los valores alcanzados a partir del día 168 en donde ya se presentaba el estadio 7 (plántulas con raíces). A partir de los 182 días de cultivo y hasta los 287, los valores del estadio 8 (plántulas con raíces y pseudobulbos) fueron iguales estadísticamente entre sí.

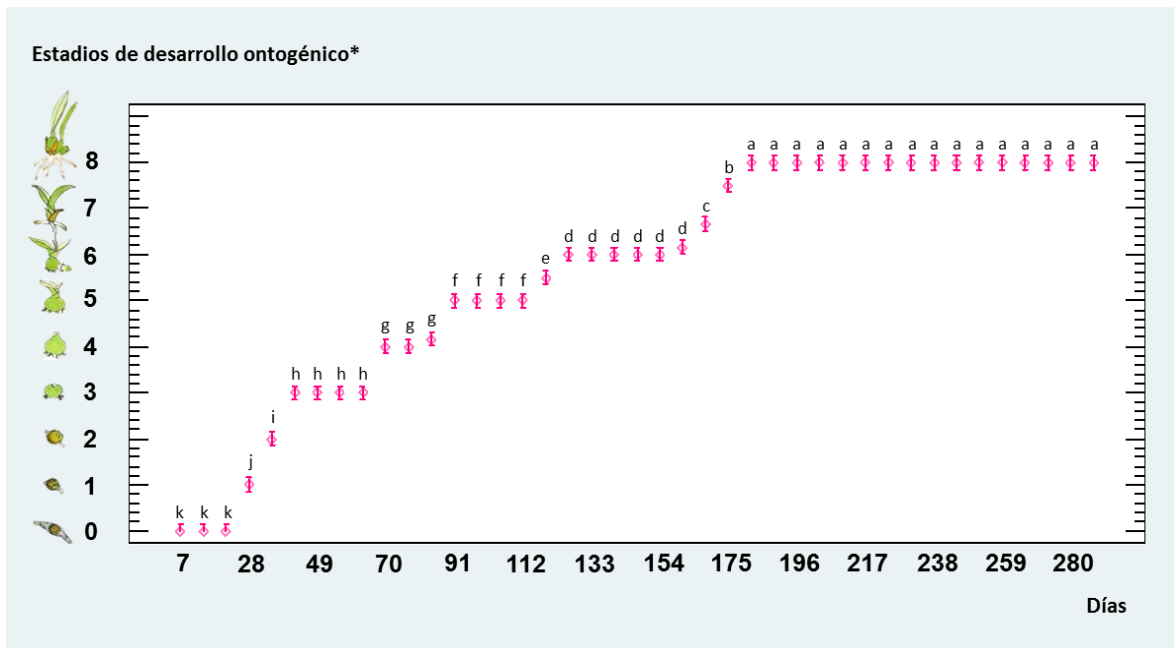


Figura 42. Desarrollo ontogénico de *Jacquiiniella equitantifolia*, a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.

\*0 = Semillas con embrión, 1 = Semilla germinando, 2 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 3 = Protocormo con rizoides, 4 = Protocormo con brote apical, 5 = Plántula con hojas iniciales, 6 = Plántula con hojas y raíz, 7 = Plántula con raíces, 8 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

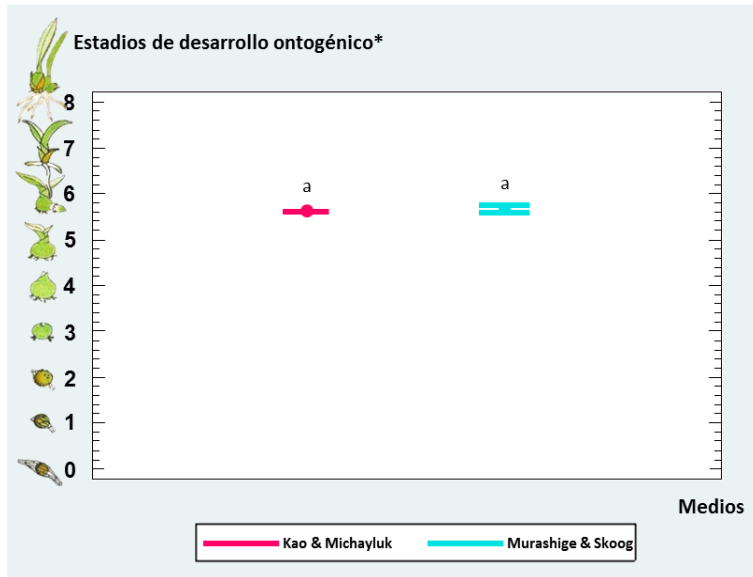


Figura 43. Comparación de medias de la evaluación del desarrollo de *J. equitantifolia* independientemente del tiempo.

En la Figura 43, se aprecia que el estadio de desarrollo, independientemente del tiempo, fue el de plántula con hojas y una raíz (Estadio 6); estadísticamente el valor de las medias fue igual para ambos medios nutritivos.

En la Figura 44, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre el desarrollo de los estadios ontogénicos de *D. glauca* a través del tiempo. Para ambos medios el estadio 1 inicia 28 días después de la siembra de las semillas; ya que,

algunos embriones se observaron hinchados y verdes. La ruptura de la testa comenzó a apreciarse a los 35 días; posteriormente, a los 42 días fueron registrados protocormos con rizoides; los protocormos con brotes apicales se desarrollaron 70 días después de ser sembradas las semillas, de las plántulas con hojas iniciales se tienen registros para los 91 días. Después de 126 días se obtuvieron plántulas con hojas y una raíz. A partir del estadio 7 (plántulas con raíces) para el medio KM, se podía apreciar a los 175 días, mientras que para los 182 días ya se tenían plántulas con raíces y pseudobulbos. A diferencia del medio nutritivo MS; donde, las plántulas con raíces se obtuvieron a los 168 días y las plántulas con raíces y pseudobulbos se evidenciaron a los 175 días, manteniéndose así en ambos medios hasta el final del cultivo, a los 287 días.

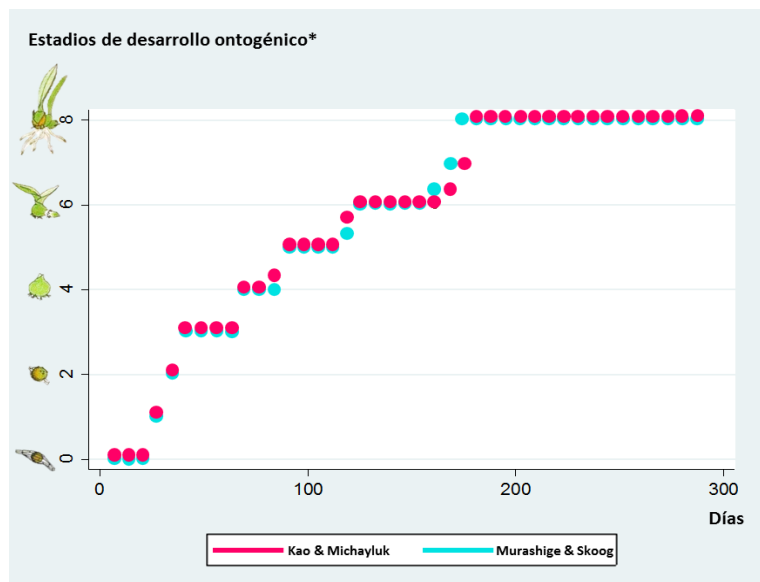


Figura 44. Evaluación del desarrollo de *Jacquiniella equitantifolia*, a través de tiempo, en los medios nutritivos KM y MS.

\*0 = Semillas con embrión, 1 = Semilla germinando, 2 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 3 = Protocormo con rizoides, 4 = Protocormo con brote apical, 5 = Plántula con hojas iniciales, 6 = Plántula con hojas y raíz, 7 = Plántula con raíces, 8 = Plántula con raíz y pseudobulbo.





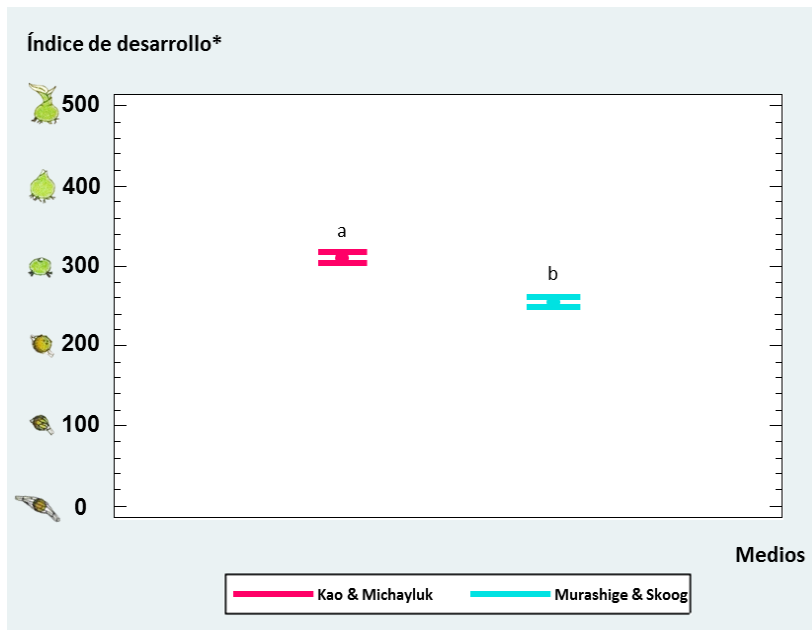


Figura 46. Comparación de medias de la evaluación del índice de desarrollo de *D. glauca*, independientemente del tiempo.

En la Figura 46, se aprecia que el mayor estadio del índice de desarrollo, independientemente del tiempo, fue el de protocormos con brote apical (Estadio 4); sin embargo, estadísticamente el valor de la media fue mayor para el medio nutritivo Kao & Michayluk con 310 donde el 90% estaban en estadio 3 (protocormos con rizoides) y el 10% eran protocormos con brote apical; mientras que el obtenido en el medio Murashige & Skoog fue menor con 254, donde el 46% presentaban estadio 2 (Embrión hinchado rompiendo la testa) y un 54% en estadio 3.

En la Figura 47, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre el Índice de desarrollo de *D. glauca* a través del tiempo. Para el medio Kao & Michayluk el I.D. inicia 63 días después de la siembra de las semillas donde el valor del I.D. fue de 129 esto indica que el 71% se encontraban en el estadio 1 (embrión hinchado y verde) mientras que en un 29% de las semillas ya se podían apreciar con embrión hinchado y ruptura de la testa (Estadio 2). A los 77 días el I.D. tenía un valor promedio de 170, haciendo referencia a que el 30% (un poco menos de la mitad) permanecían aún en el estadio 1

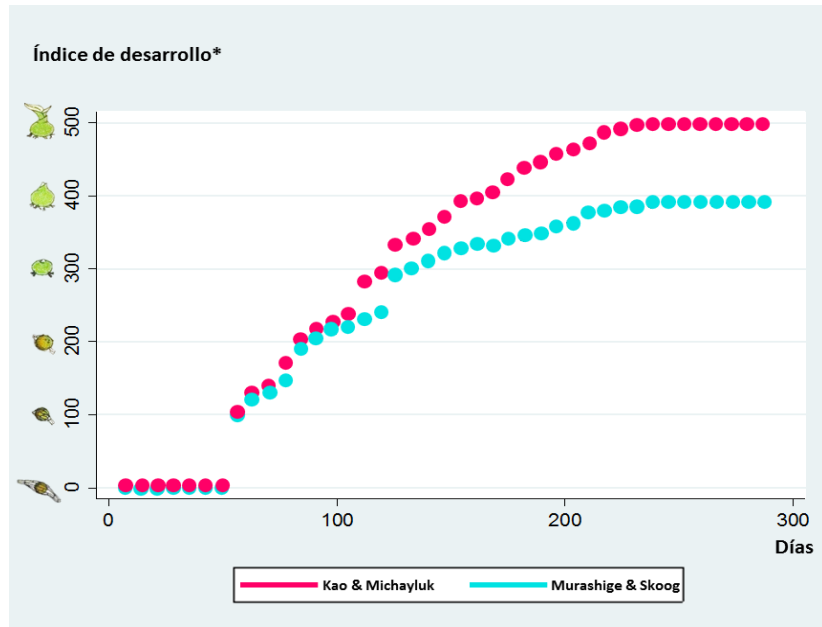


Figura 47. Evaluación del índice de desarrollo de *Dichaea glauca* durante su germinación, a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos.

\*0 = Semillas con embrión, 100 = Semilla germinando, 200 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 300 = Protocormo con rizoides, 400 = Protocormo con brote apical, 500 = Plántula con hojas iniciales, 600 = Plántula con hojas y raíz, 700 = Plántula con raíces, 800 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

y el 70% de las semillas presentaban el estadio 2. Para los 91 días el valor del I.D. fue de 217, este valor reflejaba que el 83% se encontraban en estadio 2 y un 17% ya se podían apreciar los protocormos con rizoides (Estadio 3). Los diferentes estadios continuaron su desarrollo hasta que a los 126 días de evaluación el I.D. fue igual a 333, 67% de los individuos de la evaluación ya habían alcanzado el estadio 3. Posteriormente a los 147 días el I.D. presentaba un valor promedio de 373, el 27% seguía en estadio 3 y el 73% de los protocormos con rizoides ya tenían brote apical (Estadio 4). Para los 196 días el I.D. presentaba un valor promedio de 455; el 45% de los protocormos con rizoides ya tenían brote apical (Estadio 4). Finalmente, el valor del I.D. a los 245 días fue de 497 reflejando que el 3% se quedó en el estadio de protocormos con brote apical (Estadio 4) mientras que el 97% restante de los individuos que consiguieron germinar, alcanzaron el estadio 5 (plántulas con hojas iniciales).

A diferencia del medio nutritivo Murashige & Skoog, que a los 63 días después de la siembra de las semillas el valor del I.D. fue de 122 esto indica que el 78% se encontraban en el estadio 1 (embrión hinchado y verde) mientras que en un 22% de las semillas ya se podía apreciar la ruptura de la testa (Estadio 2). A los 77 días el I.D. tenía un valor promedio de 146, haciendo referencia a que el 54% (un poco más de la mitad) permanecían aún en el estadio 1 y el 46% de las semillas presentaban el estadio 2. Para los 91 días el valor del I.D. fue de 203, este valor reflejaba que el 97% se encontraba en estadio 2 y en el 3% ya se podían apreciar los protocormos con rizoides (Estadio 3). Los diferentes estadios continuaron su desarrollo hasta que a los 126 días de evaluación el I.D. fue igual a 292, 92% de los individuos de la evaluación ya habían alcanzado el estadio 3. Posteriormente a los 147 días el I.D. presentaba un valor promedio de 322; el 78% seguía en estadio 3 y el 22% de los protocormos con rizoides ya tenían brote apical (Estadio 4). Para los 196 días el I.D. presentaba un valor promedio de 359; el 59% de los protocormos con rizoides ya tenían brote apical (Estadio 4). Finalmente, el valor del I.D. a los 245 días fue de 390 reflejando que el 10% se quedó en el estadio de protocormos con rizoides (Estadio 3) mientras que el 90% de los individuos que consiguieron germinar, alcanzaron el estadio 4.

La Figura 48 muestra el porcentaje de los estadios alcanzados en cada uno de los tratamientos para el último día de evaluación (287 días), donde para ambos medios nutritivos el máximo estadio que se alcanzó fue plántula con pseudobulbo y raíces (Estadio 8).

Para el medio Kao & Michayluck, tenemos que el 29% de las semillas no germinaron. El 9% se quedó en estadio 1 (Embrión hinchado y verde). En estadio 2 (embrión hinchado rompiendo la testa) permaneció un 11%. 10% de las semillas sembradas permaneció en estadio 3 (Protocormos). Únicamente 8% se mantuvo en estadio 4 (Protocormo con brote apical). Un 0.3% se conservó en plántulas con hojas iniciales (Estadio 5). Las plántulas con hojas y una raíz (Estadio 6) al igual que las plántulas con raíces (Estadio 7) presentan un porcentaje nulo al final de la evaluación. Y el 32% de las semillas que se colocaron en este medio llegó al estadio 8 (Plántulas con pseudobulbo y raíces).

Para el medio Murashige & Skoog el 32% de las semillas no germinó. El 11% se quedó en estadio 1. Un 15% permaneció en estadio 2. Solo el 13% de las semillas sembradas continuó en estadio 3. Únicamente 12% se mantuvo en estadio 4. Un 0.6% se conservó en plántulas con hojas iniciales. Las plántulas con hojas y una raíz al igual que las plántulas con raíces presentan un porcentaje nulo al final de la evaluación. Y el 17% de las semillas que se colocaron en este medio llegó al estadio 8.

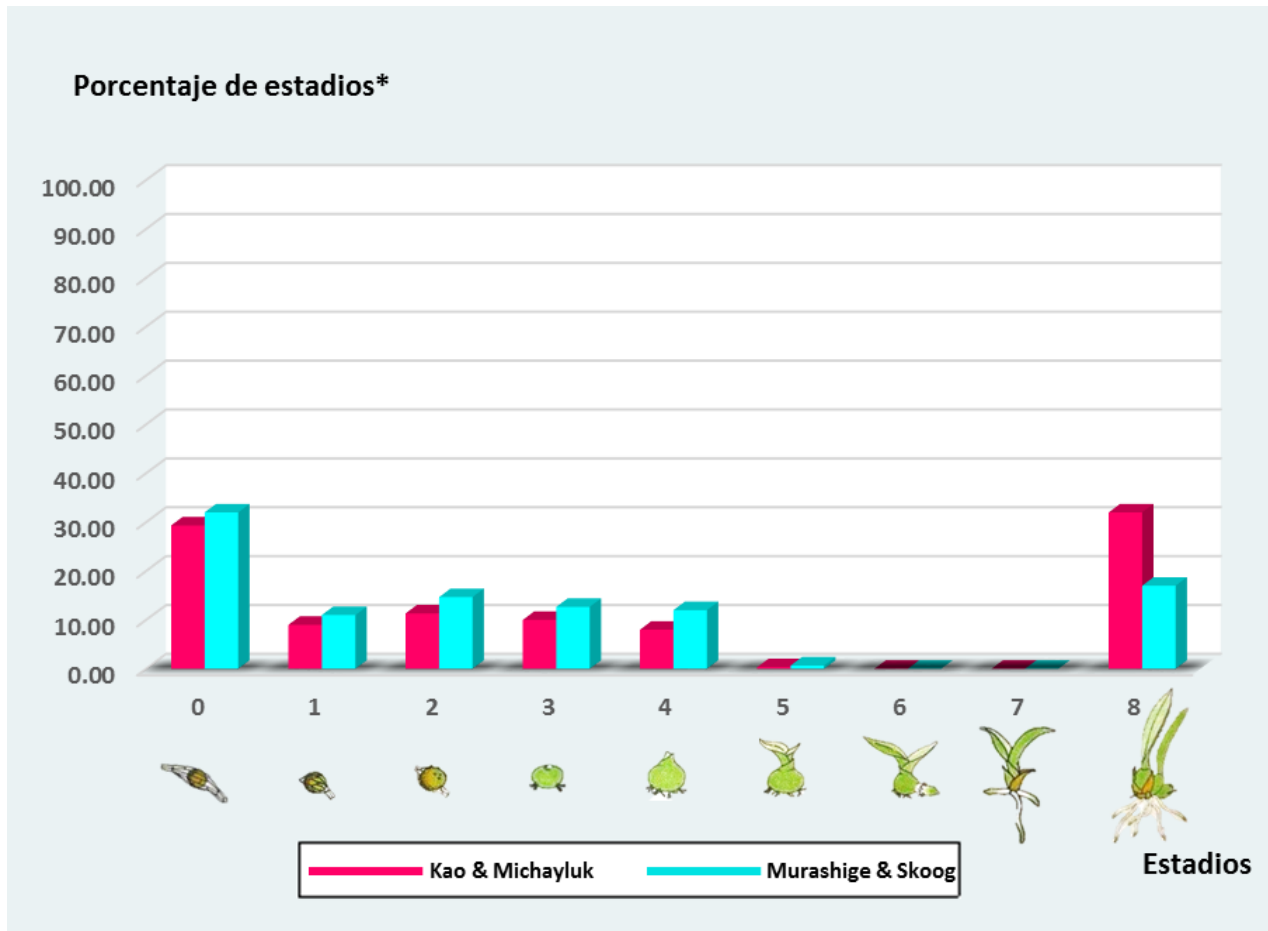


Figura 48. Comparación de los porcentajes de los estadios alcanzados por tratamiento de *D. glauca*, a los 287 días después de la siembra.

\*0 = Semillas con embrión, 1 = Semilla germinando, 2 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 3 = Protocormo con rizoides, 4 = Protocormo con brote apical, 5 = Plántula con hojas iniciales, 6 = Plántula con hojas y raíz, 7 = Plántula con raíces, 8 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

Con los datos obtenidos en la germinación, desarrollo ontogénico e índice de desarrollo, se realizó una lámina ilustrativa de los estadios ontogénicos para *Dichaea glauca* (Figura 49).

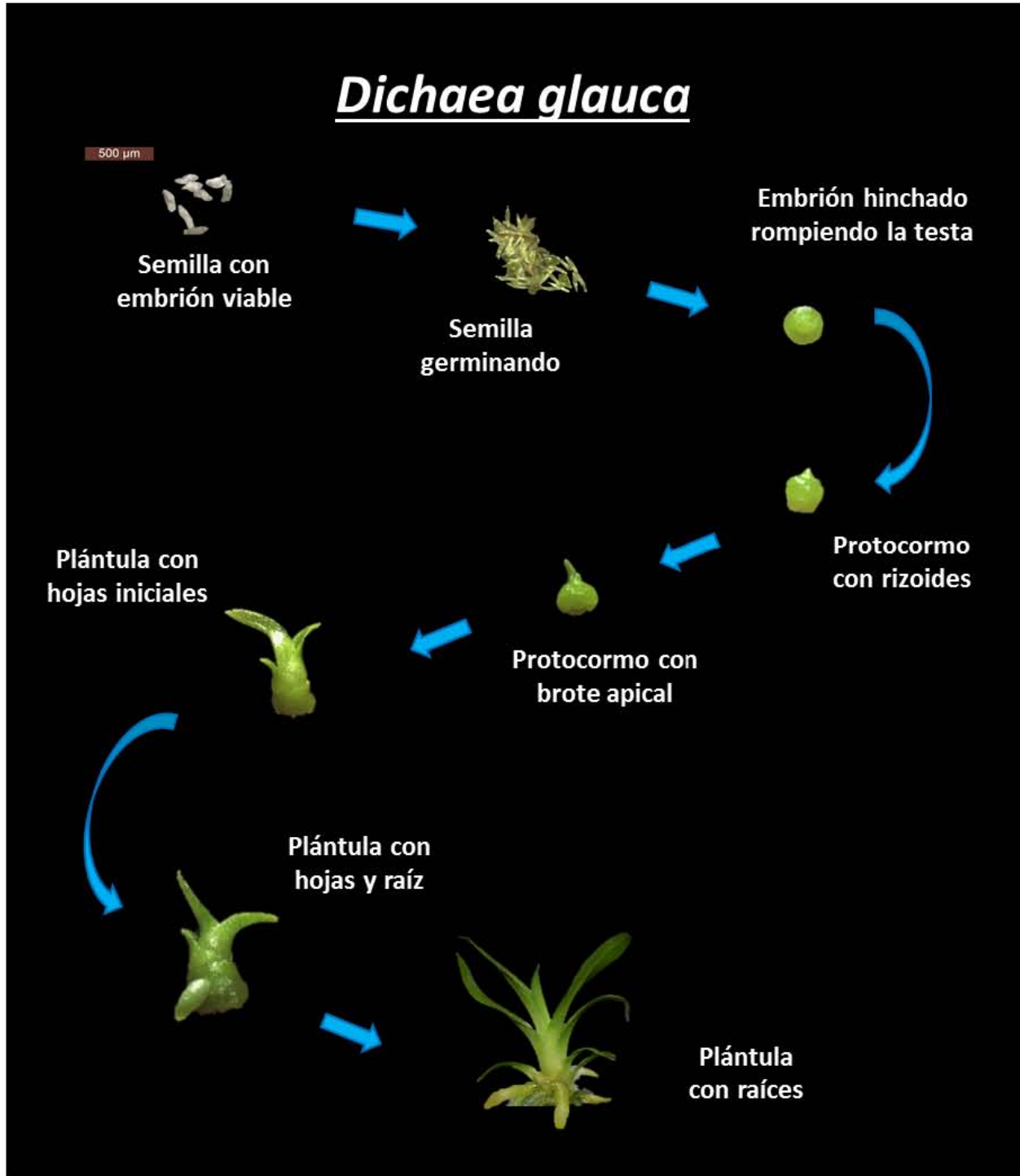


Figura 49. Estadios ontogénicos de *Dichaea glauca*.

## Evaluación del Índice de desarrollo de *Jacquinella equitantifolia*

El ANDEVA para comparar el porcentaje del Índice de desarrollo (I.D.) de *Jacquinella equitantifolia*, determino que existieron diferencias significativas para el tiempo (valor-P = 0.0000), a diferencia de los medios (tratamientos) donde no existieron diferencias significativas (valor-P = 0.9654), con un 95.0% de nivel de confianza (Anexo 15).

El porcentaje del I.D. a través del tiempo e independientemente de los medios se inicia a partir de los 20 días de cultivo, como se puede observar en la Figura 50; ya que, a los 35 días el valor del I.D. fue 136 lo que refleja que el 64% de las semillas estaban hinchadas y verdes, incrementándose gradualmente este valor en los días posteriores hasta un I.D. de 257 a los 84 días, indicándonos que el 43% de los embriones presentaban la ruptura de la testa mientras que el 57% eran protocormos con rizoides resultando estos porcentajes diferentes estadísticamente entre sí y diferentes a los porcentajes alcanzados a partir del día 112 con un valor de I.D. de 373, donde el 73% de los protocormos generaron un brote apical. Para los 133 días el I.D. era igual a 450, el 50% de las semillas que germino se encontraban en el estadio 4 (protocormo con brote apical) mientras que el 50% restante se encontraban en estadio 5 (Plántulas con hojas iniciales). Posteriormente 175 días después de la siembra de las semillas 583 era el valor del I.D. en el cual el 83% ya estaban en estadio 6 (Plántula con hojas y raíz). A los 196 días el I.D. era de 661, donde el 39% eran plántulas con hojas y raíz y el 61% presentaban estadio 7 (Plántulas con raíces). A partir de los 238 días de cultivo y hasta los 287 días los valores del I.D. fueron iguales estadísticamente entre sí, en el que el mayor valor obtenido del I.D fue de 768, en el que el 32% estaban en estadio 7 (Plántulas con raíces) y el 68% se encontraba en estadio 8 (Plántulas con raíz y pseudobulbo).

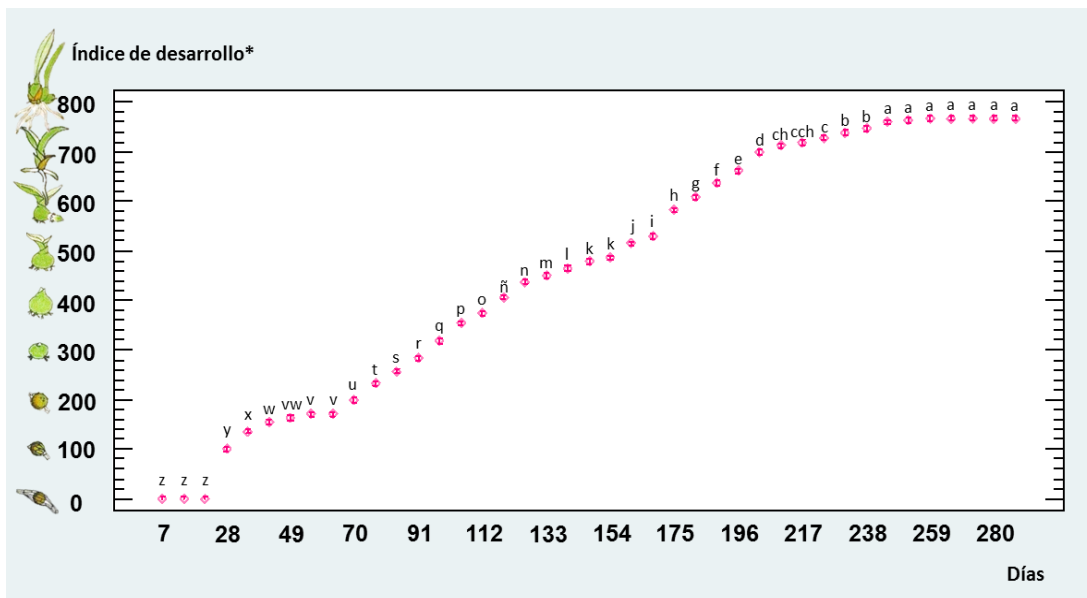


Figura 50. Índice de desarrollo de *Jacquinella equitantifolia*, a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.

\*0 = Semillas con embrión, 100 = Semilla germinando, 200 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 300 = Protocormo con rizoides, 400 = Protocormo con brote apical, 500 = Plántula con hojas iniciales, 600 = Plántula con hojas y raíz, 700 = Plántula con raíces, 800 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

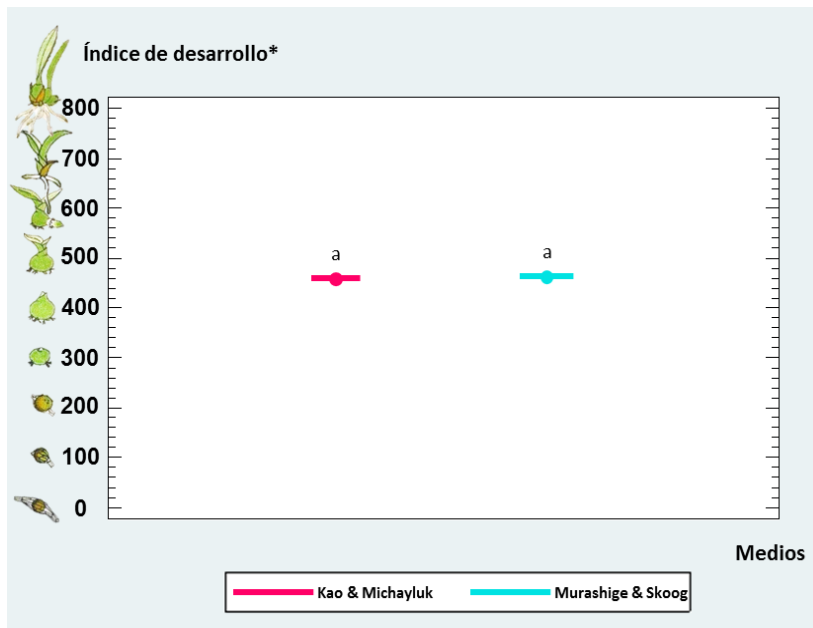


Figura 51. Comparación de medias de la evaluación del índice de desarrollo de *J. equitantifolia*, independientemente del tiempo.

En la Figura 51, se aprecia que el mayor estadio del Índice de desarrollo, independientemente del tiempo, fue el de Plántula con hojas iniciales (Estadio 5); estadísticamente el valor de las medias fue igual para ambos medios nutritivos.

En la Figura 52, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre el Índice de desarrollo de *J. equitantifolia* a través del tiempo. Para Kao & Michayluk el I.D. inicia 35 días después de la siembra de

las semillas donde el valor fue de 136 esto indica que el 64% se encontraban en el estadio 1 (embrión hinchado y verde) mientras que en un 36% de las semillas ya se podían apreciar con el embrión hinchado y ruptura de la testa (Estadio 2). A los 70 días el I.D. tenía un valor promedio de 202, haciendo referencia a que el 98% continuaban en estadio 1 y el 2% de las semillas presentaban el estadio 2. Para los 91 días el valor del I.D. fue de 283, este valor reflejaba que el 17% se hallaban en estadio 2 y en un 83% ya se podían apreciar los protocormos con rizoides (Estadio 3). Los diferentes estadios continuaron su desarrollo hasta que a los 112 días de evaluación el I.D. fue igual a 374, 74% de los individuos ya habían alcanzado el estadio 4 (Protocormos con brote apical). Posteriormente a los 140 días el I.D. demostraba un valor promedio de 466; el 34% seguía en estadio 4 y el

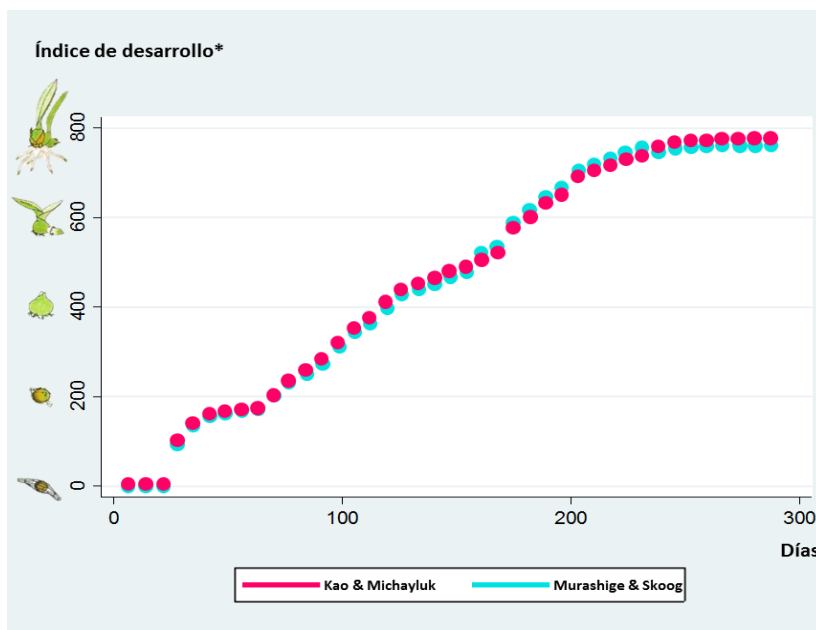


Figura 52. Evaluación del índice de desarrollo de *J. equitantifolia* durante su germinación, a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos.

\*0 = Semillas con embrión, 100 = Semilla germinando, 200 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 300 = Protocormo con rizoides, 400 = Protocormo con brote apical, 500 = Plántula con hojas iniciales, 600 = Plántula con hojas y raíz, 700 = Plántula con raíces, 800 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

66% de los ejemplares ya eran plántulas con hojas iniciales (Estadio 5). Para los 168 días el I.D. presentaba un valor promedio de 528; el 72% seguían en estadio 5. Consecutivamente a los 196 días el valor del I.D. fue de 653, este valor expresaba que el 47% estaban en estadio 6 (Plántula con hojas y raíz) y el 53% restante eran plántulas con raíces (Estadio 7). A los 252 días el I.D. fue igual a 768, expresando que el 68% eran ya plántulas con pseudobulbo y raíces (Estadio 8). Finalmente, el valor del I.D. a los 266 días fue de 772 reflejando que el 28% de los individuos que consiguieron germinar, se mantuvieron en el estadio 7 y el 72% restante alcanzó el estadio 8.

A diferencia del medio nutritivo Murashige & Skoog, que a los 35 días después de la siembra de las semillas el valor del I.D. fue de 136 esto indica que el 64% se encontraban en el estadio 1 (embrión hinchado y verde) mientras que en un 36% de las semillas ya se podía apreciar la ruptura de la testa (Estadio 2). A los 70 días el I.D. tenía un valor promedio de 198, haciendo referencia a que el 2% permanecían aún en el estadio 1 y el 98% de las semillas presentaban el estadio 2. Para los 91 días el valor del I.D. fue de 284, este valor reflejaba que el 16% se encontraba en estadio 2 y en el 84% ya se podían apreciar los protocormos con rizoides (Estadio 3). Los diferentes estadios continuaron su desarrollo hasta que a los 112 días de evaluación el I.D. fue igual a 372, 28% de los individuos de la evaluación ya habían alcanzado el estadio 3. Posteriormente a los 140 días el I.D. demostraba un valor promedio de 463; el 37% seguía en estadio 4 (Protocormo con brote apical) y el 63% de los ejemplares ya eran plántulas con hojas iniciales (Estadio 5). Para los 168 días el I.D. presentaba un valor promedio de 532; el 68% seguían en estadio 5. Consecutivamente a los 196 días el valor del I.D. fue de 669, este valor expresaba que el 31% estaban en estadio 6 (Plántula con hojas y raíz) y el 69% restante eran plántulas con raíces (Estadio 7). A los 252 días el I.D. fue igual a 760, expresando que el 60% eran ya plántulas con pseudobulbo y raíces (Estadio 8). Finalmente, el valor del I.D. a los 266 días fue de 763 reflejando que el 37% de los individuos que consiguieron germinar, se mantuvieron en el estadio 7 y el 63% restante alcanzó el estadio 8.

La Figura 53 muestra el porcentaje de los estadios alcanzados en cada uno de los tratamientos para el último día de evaluación (287 días), donde para ambos medios nutritivos el máximo estadio que se alcanzó fue Plántula con pseudobulbo y raíces (Estadio 8).

Para el medio Kao & Michayluck, tenemos que el 3% de las semillas no germinaron. El 1% se quedó en estadio 1 (embrión hinchado y verde). En estadio 2 (embrión hinchado rompiendo la testa) permaneció un 0.8%. 2% de las semillas sembradas permaneció en estadio 3 (protocormos). Únicamente 0.8% se mantuvo en estadio 4 (Protocormo con brote apical). Un 0.5% se conservó en plántulas con hojas iniciales (Estadio 5). Las plántulas con hojas y una raíz (Estadio 6) al igual que las plántulas con raíces (Estadio 7) presentan un porcentaje nulo al final de la evaluación. Y el 92% de las semillas que se colocaron en este medio llegó al estadio 8 (Plántulas con pseudobulbo y raíces).

Para el medio Murashige & Skoog el 3% de las semillas no germinaron. El 2% se quedó en estadio 1. Un 0.8% permaneció en estadio 2. Solo el 2% de las semillas sembradas continuó en estadio 3.



Únicamente 2% se mantuvo en estadio 4. Un 0.6% se conservó en plántulas con hojas iniciales. Las plántulas con hojas y una raíz al igual que las plántulas con raíces presentan un porcentaje nulo al final de la evaluación. Y el 90% de las semillas que se colocaron en este medio llegó al estadio 8.

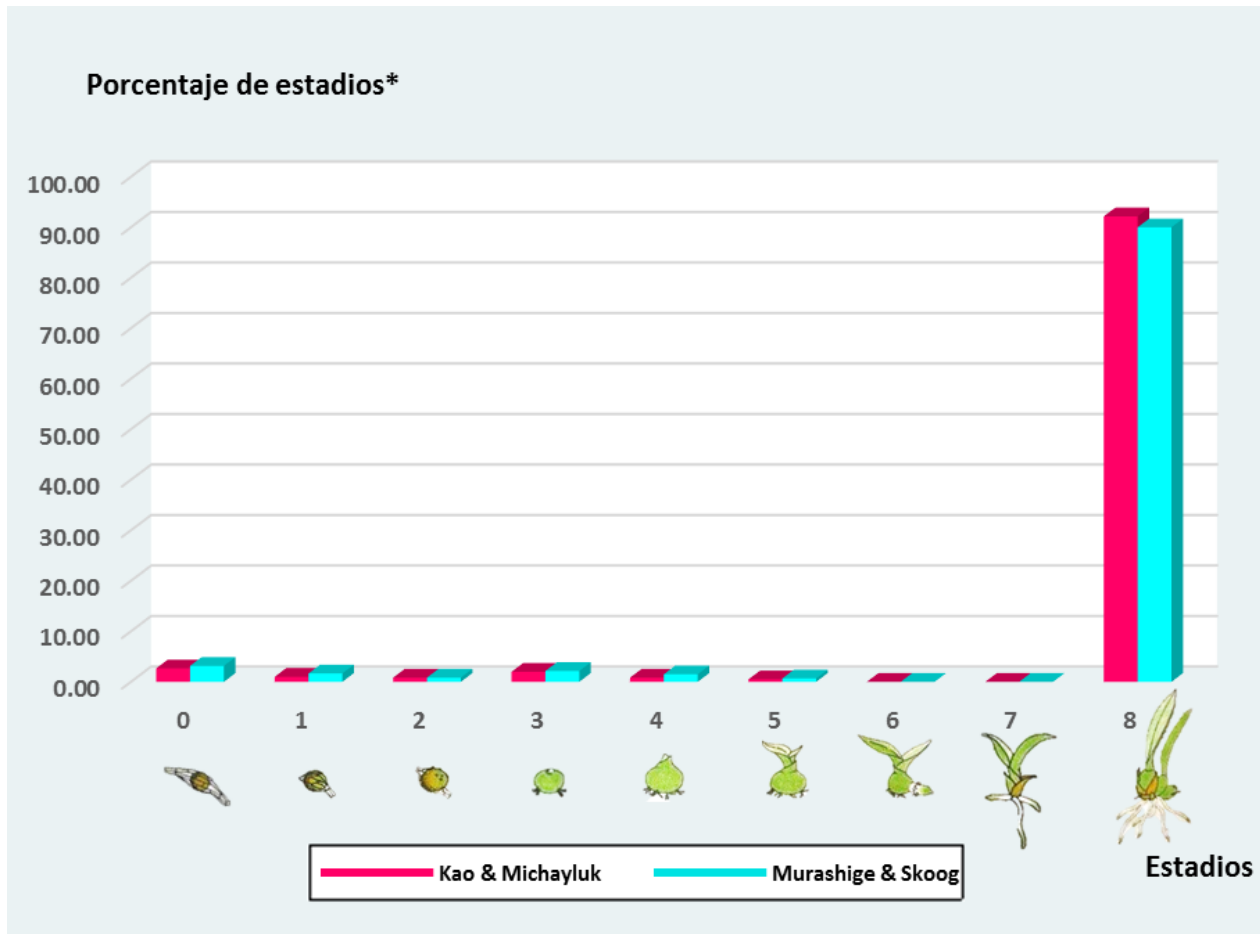


Figura 53. Comparación de los porcentajes de los estadios alcanzados por tratamiento de *J. equitantifolia*, a los 287 días después de la siembra.

\*0 = Semillas con embrión, 1 = Semilla germinando, 2 = Embrión hinchado rompiendo la testa, 3 = Protocormo con rizoides, 4 = Protocormo con brote apical, 5 = Plántula con hojas iniciales, 6 = Plántula con hojas y raíz, 7 = Plántula con raíces, 8 = Plántula con raíz y pseudobulbo.

Con los datos obtenidos en la germinación, desarrollo ontogénico e índice de desarrollo, se realizó una lámina ilustrativa de los estadios ontogénicos para *Jacquiniella equitantifolia* (Figura 54).

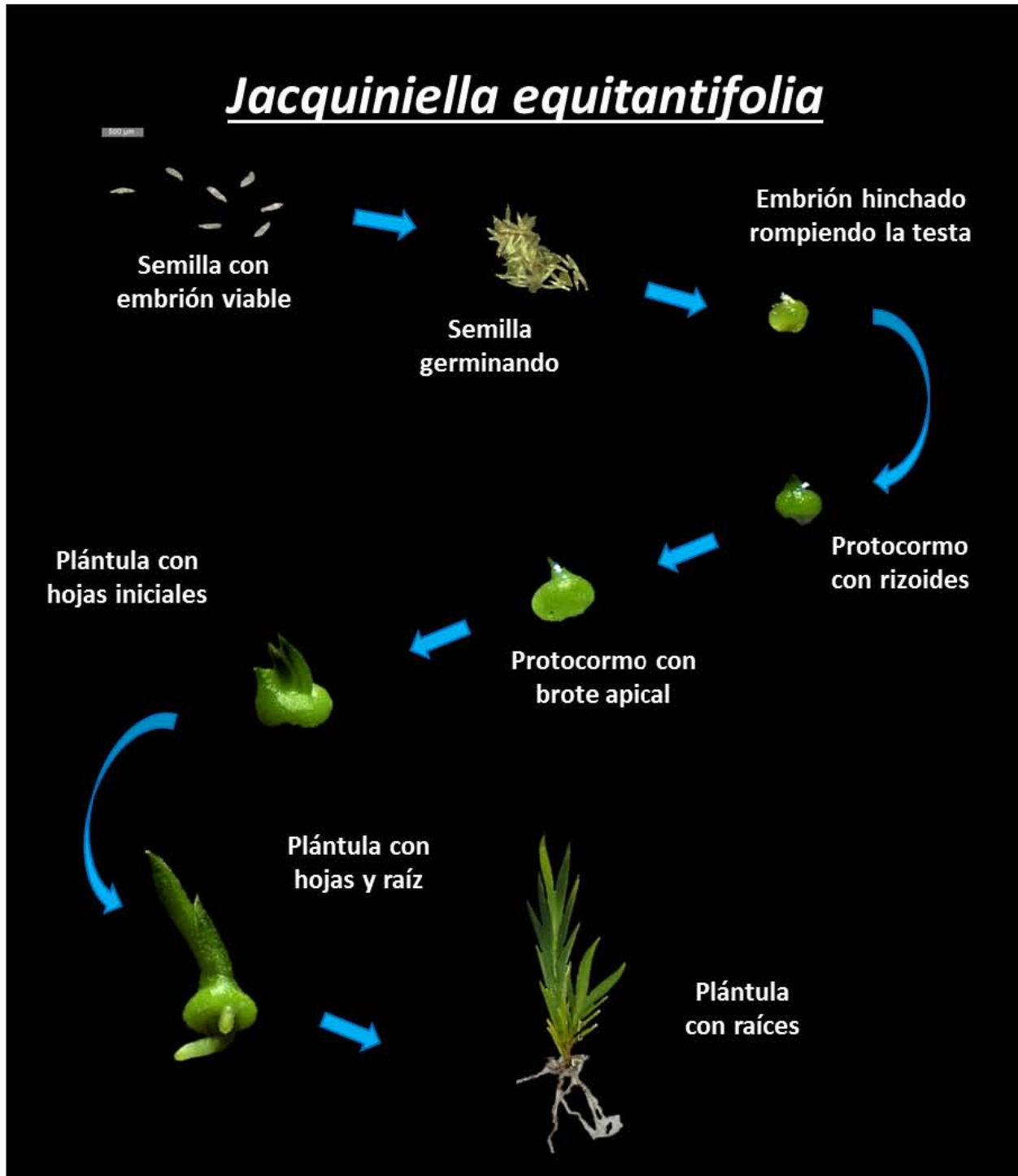


Figura 54. Estadios ontogénicos de *Jacquiniella equitantifolia*.

## Evaluación del crecimiento de las plántulas de *Dichaea glauca*

El ANDEVA para comparar el incremento en cuanto a la talla de *D. glauca*, determinó que existieron diferencias estadísticamente significativas tanto para el tiempo, así como entre los medios (tratamientos) con un 95.0% de nivel de confianza (valor-P = 0.0000) (Anexo 16).

El crecimiento a través del tiempo e independientemente de los medios se inicia a partir de los 10 días de cultivo, como se puede observar en la Figura 55; en donde, a los 14 y 21 días presenta un valor promedio de 0.6 mm, incrementándose gradualmente en los días posteriores hasta los 28 días, en los cuales se registró 1 mm, resultando estos valores diferentes estadísticamente entre sí y diferentes a los valores alcanzados a partir del día 35, 42 y 56 en donde el valor promedio fue de 3 mm. Sin embargo, el incremento de 4 mm obtenido a los 49 días fue mayor y diferente estadísticamente a los demás.

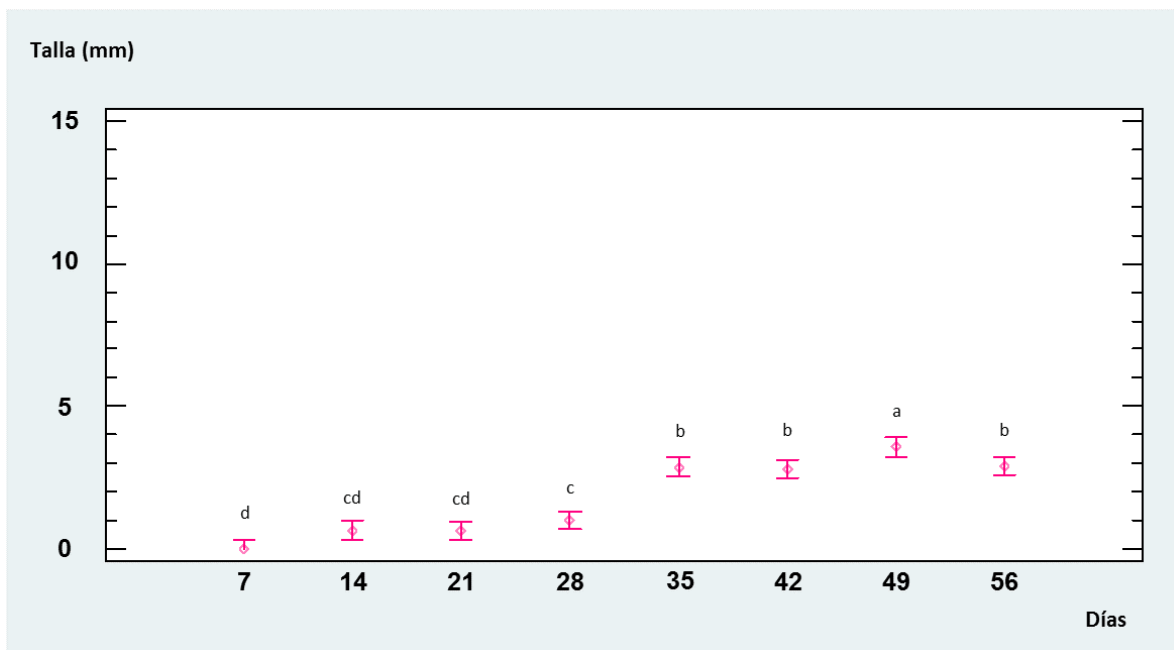


Figura 55. Crecimiento de *Dichaea glauca*, a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.

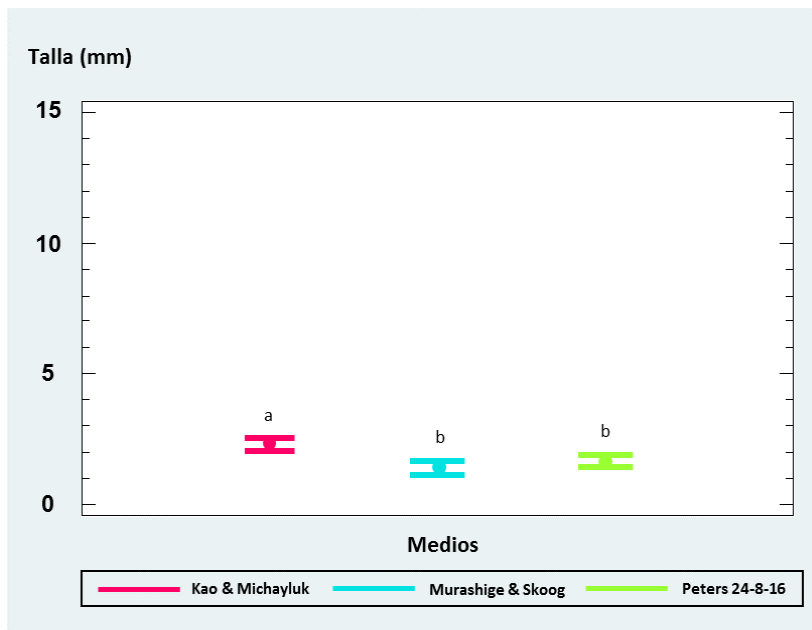


Figura 56. Comparación de medias de la evaluación del crecimiento de *D. glauca*, independientemente del tiempo.

En la Figura 56, se aprecian los valores del crecimiento para cada medio, independientemente del tiempo. En el medio nutritivo Kao & Michayluk el valor de la media de 2 mm fue mayor y diferente estadísticamente al incremento obtenido en los medios Murashige & Skoog y Peters con 1 mm, resultando iguales entre sí.

En la Figura 57, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre el crecimiento de las plántulas de *D. glauca* a través

del tiempo. Para el medio Kao & Michayluk, 7 días después del subcultivo el incremento fue nulo. Para los 14 días el incremento de la media ( $\bar{X}$ ) fue de 0.77 mm, a los 21 días de 0.76 mm. Las tallas continuaron su incremento hasta los 28 días, donde la  $\bar{X}$  fue de 0.99 mm. A los 35, 42 y 49 días las  $\bar{X}$  registradas fueron de 3.7 mm, 3.3 mm y 4.9 mm respectivamente. Finalmente, el incremento a los 56 días de evaluación fue de 3.7 mm. Para el medio Murashige & Skoog (Figura 58), 7 días después del subcultivo el incremento fue nulo. Para los 14 días el incremento de la  $\bar{X}$  fue de 0.39 mm, a los 21 días de 0.39 mm. Las tallas continuaron su incremento hasta los 28 días, donde la  $\bar{X}$  fue de 0.99 mm. A los 35, 42 y 49 días las  $\bar{X}$  registradas fueron de 2.3 mm, 1.9 mm y 2.6 mm respectivamente. Finalmente, el incremento a los 56 días de evaluación fue de 2.3 mm. Para el medio Peters 24:8:16, 7 días después del subcultivo el incremento fue nulo. Para los 14 y 21 días el incremento de la  $\bar{X}$  fue de 0.74 mm. Las tallas continuaron su incremento hasta los 28 días, donde la  $\bar{X}$  fue de 0.93 mm. A los 35, 42 y 49 días las  $\bar{X}$  registradas fueron de 2.4 mm, 2.9 mm y 3.1 mm respectivamente. Finalmente, el incremento a los 56 días de evaluación fue de 2.5 mm.



Figura 58. *D. glauca* en medio MS.

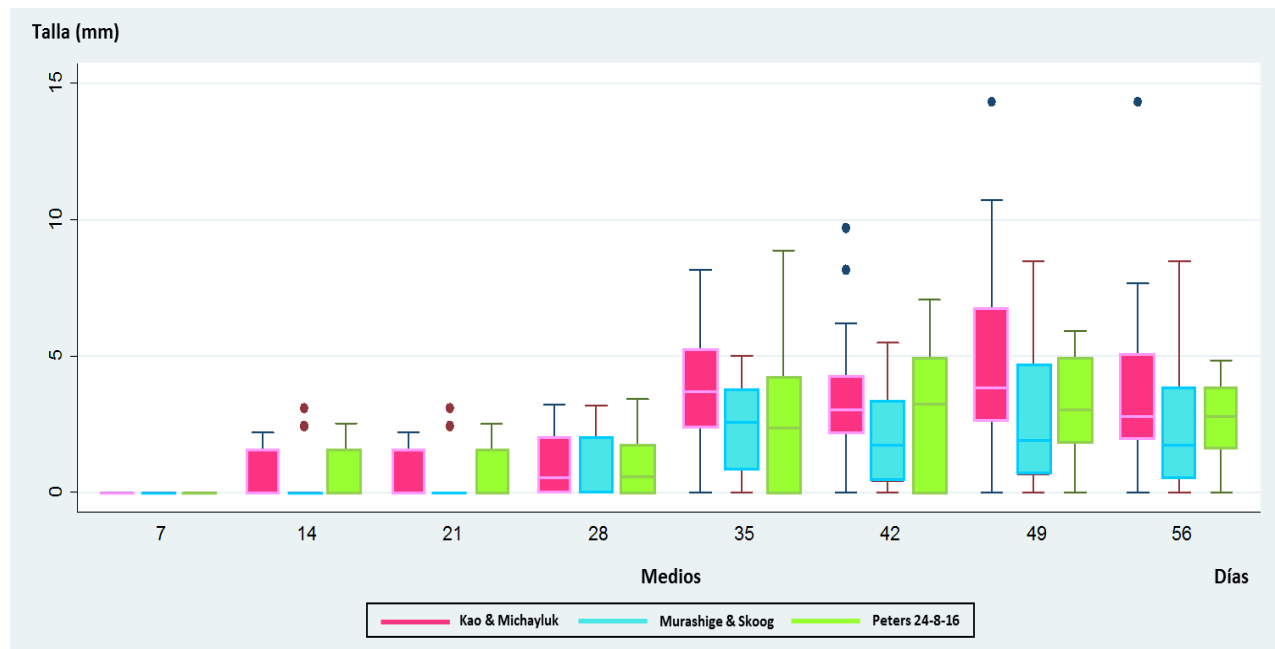


Figura 57. Evaluación del crecimiento de *D. glauca*, a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos.

El medio nutritivo KM fue el óptimo para el crecimiento de *Dichaea glauca*; ya que, se registran los incrementos más altos con respecto a la  $\bar{X}$ , seguido por el medio Peters y por último el medio MS. En la Figura 59 se puede observar que las plántulas del medio KM, presentaban la parte vegetativa elongada y desarrollaron una mayor cobertura de raíces (Figura 59 B). Las plántulas del medio Peters presentaban raíces menos turgentes que las obtenidas en los medios MS y KM, pero la parte vegetativa, además de elongarse, incrementó el ancho de las hojas y adquirió un tono verde opaco característico de esta especie. Por último las plántulas del medio MS generaron raíces pequeñas y en cuanto a su talla fue poca la diferencia con respecto a la talla inicial.

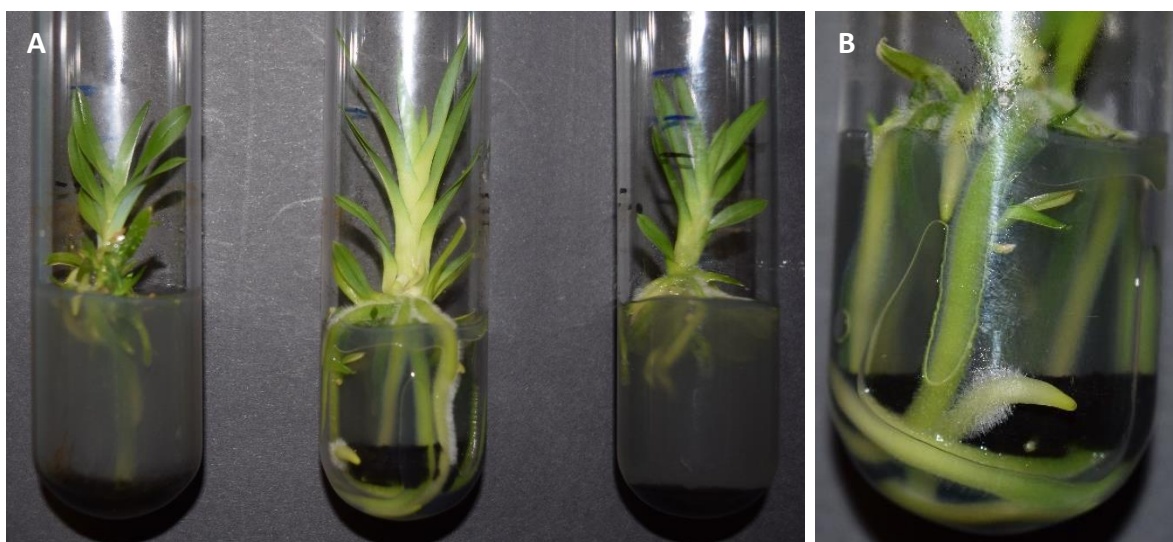


Figura 59. Evaluación del crecimiento de *D. glauca*. (A) De izquierda a derecha medios MS, KM y Peters respectivamente. (B) Raíces del medio nutritivo KM.

## Evaluación del crecimiento de las plántulas de *Jacquinilla equitantifolia*

El ANDEVA para comparar el incremento en cuanto a la talla de *J. equitantifolia*, determino que existieron diferencias estadísticamente significativas tanto para el tiempo, así como entre los medios (tratamientos) con un 95.0% de nivel de confianza (valor-P = 0.0000 y valor-P = 0.0169) respectivamente (Anexo 17).

El crecimiento a través del tiempo e independientemente de los medios se inicia a partir de los 10 días de cultivo, como se puede observar en la Figura 60; en donde, a los 14 días el valor promedio fue de 3.8 mm; en los días posteriores 21, 28 y 42 el incremento fue de 2.8 mm estos valores resultaron ser menores e iguales entre sí, a excepción del día 35 donde se obtuvo un incremento de 3 mm, el cual fue igual estadísticamente a los valores anteriores pero diferente estadísticamente a los valores alcanzados a partir del día 49, con 6.1 mm y al de los 56 días con 8.4 mm.

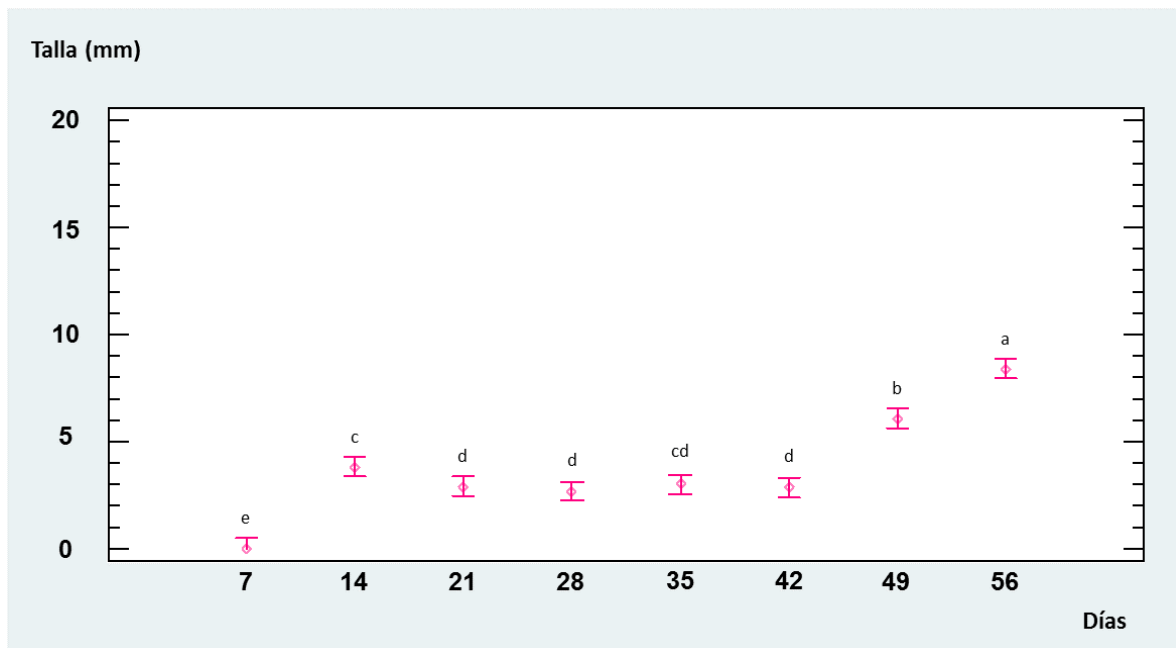


Figura 60. Crecimiento de *Jacquinilla equitantifolia*, a través de tiempo, independientemente de los medios nutritivos.

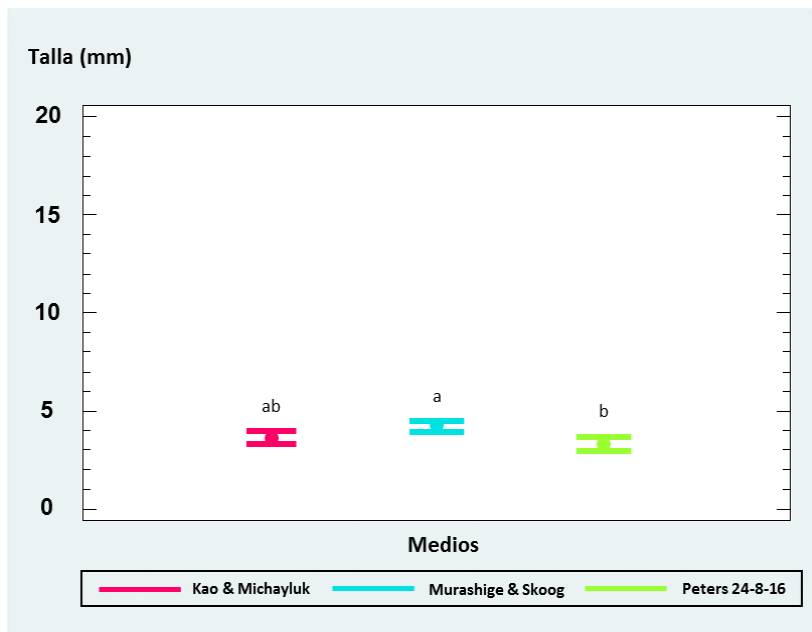


Figura 61. Comparación de medias de la evaluación del crecimiento de *J. equitentifolia*, independientemente del tiempo.

En la Figura 61, se aprecian los valores del crecimiento para cada medio, independientemente del tiempo. El incremento de 3.6 mm obtenido en el medio Kao & Michayluk resultó estadísticamente igual a los obtenidos en el medio Murashige & Skoog con 4.1 mm y Peters con 3.3 mm. Sin embargo, estos últimos valores resultaron estadísticamente diferentes entre ellos, pero mayor el de MS.

En la Figura 62, se observa el efecto de los medios nutritivos empleados como tratamientos sobre el crecimiento de las plántulas de *J. equitentifolia* a través del tiempo. Para el medio Kao & Michayluk, 7 días después del subcultivo el incremento fue nulo. Para los 14 días el incremento de la media ( $\bar{X}$ ) fue de 3.6 mm, a los 21 días de 2.6 mm. Las tallas continuaron su incremento hasta los 28 días, donde la  $\bar{X}$  fue de 2.6 mm. A los 35, 42 y 49 días las  $\bar{X}$  registradas fueron de 3.9 mm, 3.5 mm y 6.4 mm respectivamente. Finalmente, el incremento a los 56 días de evaluación fue de 6.3 mm. Para el medio Murashige & Skoog (Figura 63), 7 días después del subcultivo el incremento fue nulo. Para los 14 días el incremento de la  $\bar{X}$  fue de 4.4 mm, a los 21 días de 3.2 mm. Las tallas continuaron su incremento hasta los 28 días, donde la  $\bar{X}$  fue de 2.9 mm. A los 35, 42 y 49 días las  $\bar{X}$  registradas fueron de 2.5 mm, 2.6 mm y 7.04 mm respectivamente. Finalmente, el incremento a los 56 días de evaluación fue de 10.3 mm. Para el medio Peters 24:8:16, 7 días después del subcultivo el incremento fue nulo. Para los 14 días el incremento de la  $\bar{X}$  fue de 3.3 mm, a los 21 días de 2.7 mm. Las tallas continuaron su incremento hasta los 28 días, donde la  $\bar{X}$  fue de 2.3 mm. A los 35, 42 y 49 días las  $\bar{X}$  registradas fueron de 2.6 mm, 2.4 mm y 4.7 mm respectivamente. Finalmente, el incremento a los 56 días de evaluación fue de 8.5 mm.



Figura 63. Raíces de *J. equitentifolia* en medio MS.



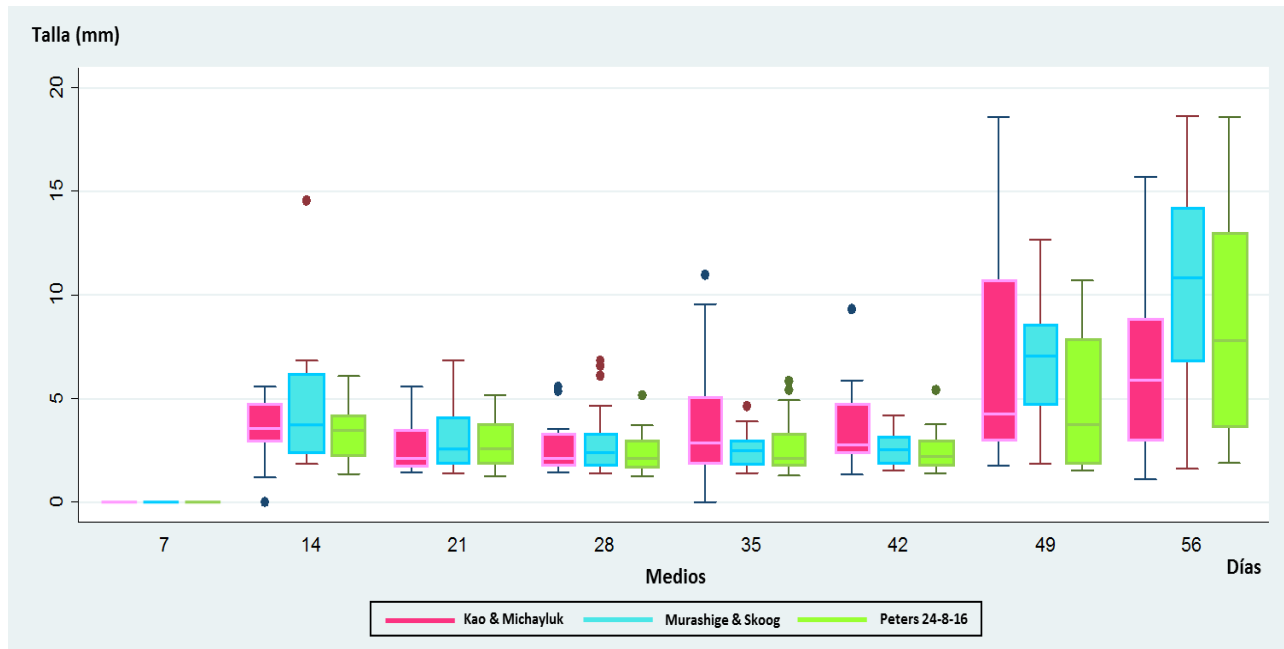


Figura 62. Evaluación del crecimiento de *J. equitantifolia*, a través del tiempo, en los diferentes medios nutritivos.

El medio nutritivo MS fue el óptimo para el crecimiento de *Jacquiniella equitantifolia* (Figura 64 C); ya que, se registran los incrementos más altos con respecto a la  $\bar{X}$ , seguido por el medio KM y por último el medio Peters. En la Figura 64 se puede observar que las plántulas del medio MS, presentaban la parte vegetativa elongada y desarrollaron una mayor cobertura de raíces (Figura 64 B y C). Las plántulas del medio KM presentaban raíces menos turgentes que las obtenidas en el medio MS (Figura 64 B), pero la parte vegetativa, además de elongarse, incrementó el ancho de las hojas (Figura 64 A). Las plántulas del medio Peters generaron pocas raíces, comparadas con las del medio KM y MS (Figura 64 B) y en cuanto a su talla fue poca la diferencia obtenida con respecto a la talla inicial (Figura 64 A).

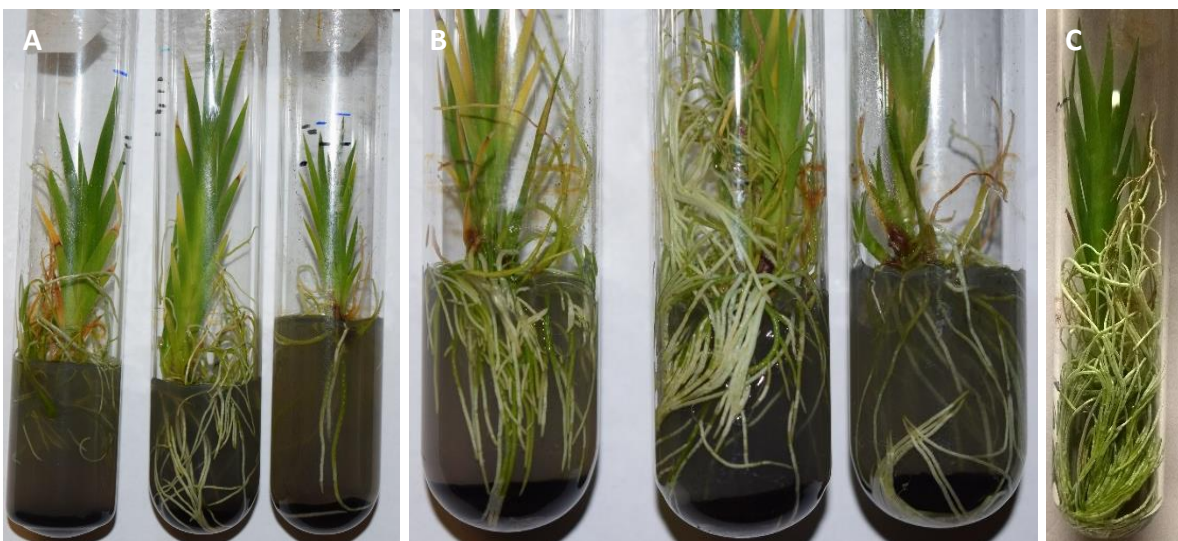


Figura 64. Evaluación del crecimiento de *J. equitantifolia*. (A) De izquierda a derecha medios KM, MS y Peters. (B) Desarrollo de Raíces en los medios KM, MS y Peters, de izquierda a derecha respectivamente. (C) Plántula de *Jacquiniella equitantifolia* en medio MS.



## Evaluación de la aclimatización de *Dichaea glauca*

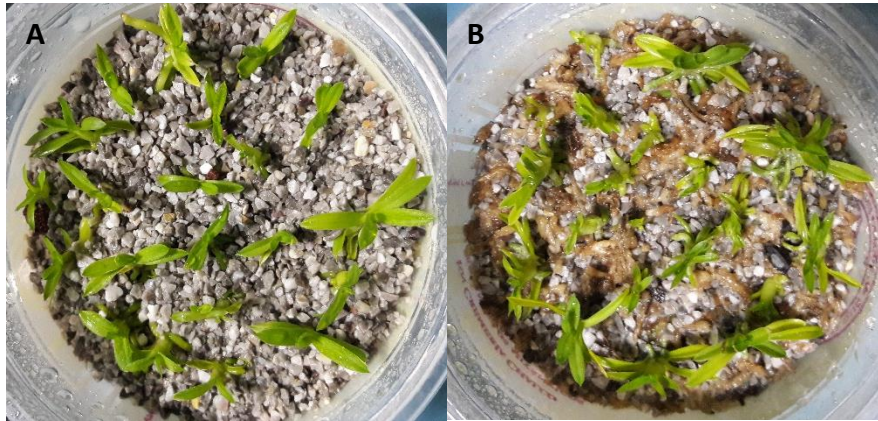


Figura 65. Plantas de *D. glauca* recién trasplantadas y en proceso de aclimatización. (A) Sustrato Cero grueso (B) Mezcla Cero grueso + *Sphagnum*.

Las plantas de *D. glauca*, trasplantadas para su aclimatización (ver Figura 65), después de 50 días comenzaron a perder clorofila en el ápice de la hoja que se extendió hasta las raíces, esto sucedió en cada una de las hojas hasta que la plántula finalmente moría. Ocurriendo en cada uno de los tratamientos

empleados (Figura 66 y Tabla 3).

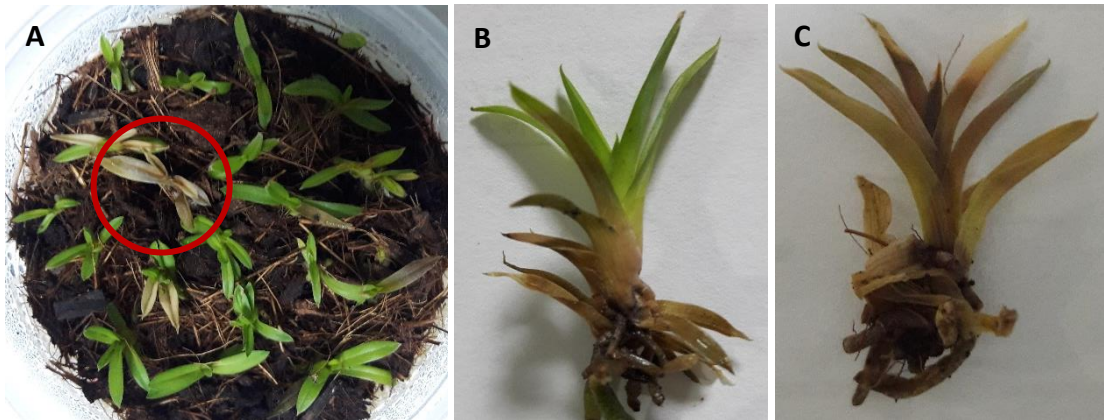


Figura 66. (A) Plantas de *Dichaea glauca* en corteza de pino-encino + fibra de coco (2:1) a los 40 días. (B) Plántula con hojas y raíces dañadas a los 45 días. (C) Plántula 50 días después del trasplante

Tabla 3. Supervivencia de *D. glauca* durante la aclimatización después de 50 días.

Tratamientos		Plantas por tratamiento	Porcentaje de supervivencia
<b>Sustratos</b>			
1	Fibra de coco	25	0 %
2	Corteza de pino-encino	25	0 %
3	Cero grueso	25	4 %
<b>Mezclas</b>			
4	Corteza de pino-encino + fibra de coco (2:1)	25	0 %
5	Cero grueso + <i>Sphagnum</i> (3:1)	25	0 %

## Evaluación de la aclimatización de *Jacquinilla equitantifolia*

Durante la aclimatización de plantas de *J. equitantifolia* se presentó la formación de nuevas estructuras, como hojas, raíces y nuevos brotes; sin embargo, al comparar los sistemas empleados se obtuvieron mejores resultados en el Sistema 2 con respecto a la sobrevivencia y la generación de las nuevas estructuras (Tabla 4 y Figura 67).

Tabla 4. Sobrevivencia de *J. equitantifolia* durante la aclimatización después de 120 días.

Sistema	Tratamientos	Plantas por tratamiento	Porcentaje de sobrevivencia
<b>Sin tezontle</b> (Sistema 1)	<b>Sustrato</b>		
	Fibra de coco	100	38 %
	<b>Mezcla</b>		
	Corteza de pino-encino + fibra de coco	100	16 %
<b>Con tezontle</b> (Sistema 2)	<b>Sustrato</b>		
	Fibra de coco	100	50 %
	<b>Mezcla</b>		
	Corteza de pino-encino + fibra de coco	100	65 %

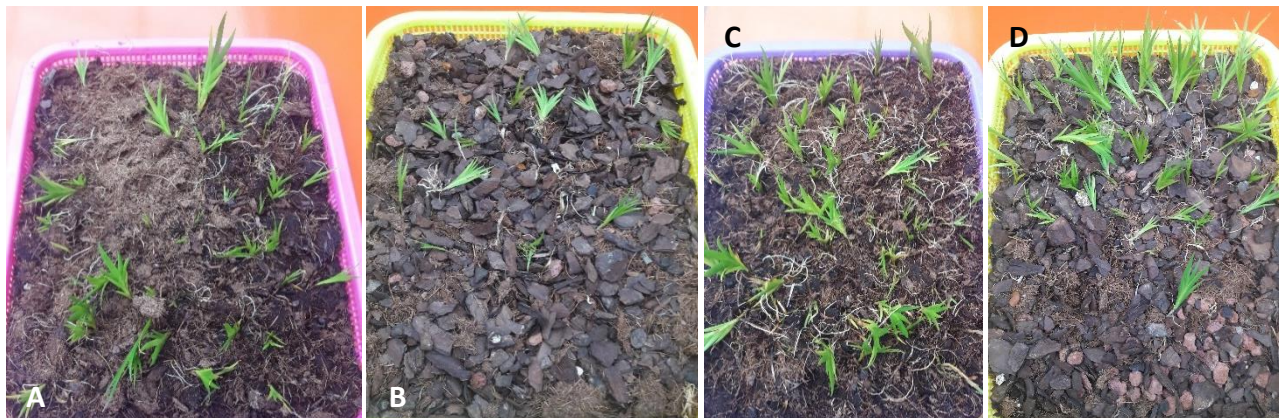


Figura 67. Plantas de *J. equitantifolia* 120 días después del trasplante. Sistema 1 (S1): (A) Fibra de coco. (B) Corteza de pino-encino + fibra de coco. Sistema 2 (S2): (C) Fibra de coco. (D) Corteza de pino-encino + fibra de coco.



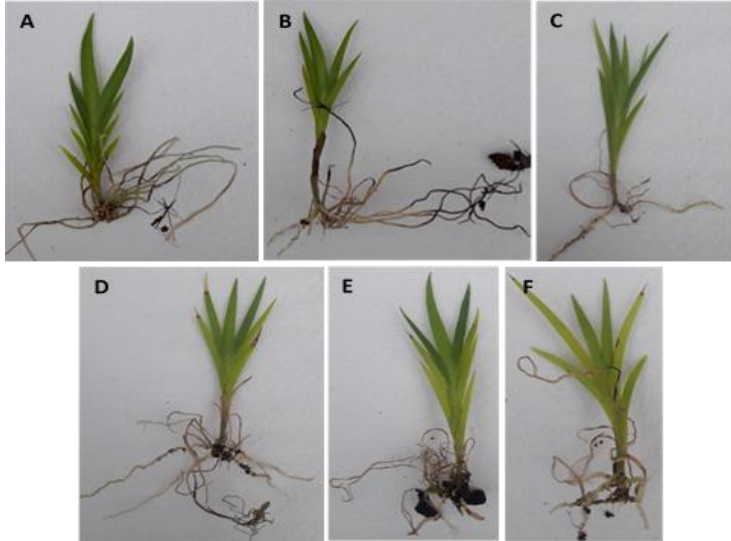


Figura 68. Sistema 1: (A, B y C) Plantas en fibra de coco donde se puede apreciar parte de las raíces deshidratadas y necrosadas. (D, E y F) Plantas en corteza de pino-encino + fibra de coco, son poco vigorosas y con un tono verde-amarillento en la parte vegetativa.

## Sistema 1

Este sistema tuvo un bajo porcentaje de plantas aclimatizadas, esto se debió a que el sustrato y la mezcla por sí solos no fueron capaces de retener la humedad suficiente que las plantas requerían. Las plantas, en ambos tratamientos de este sistema (fibra de coco y corteza de pino – encino + fibra de coco), generaron raíces y hojas; sin embargo, la retención de la humedad tanto en el sustrato y la mezcla fue insuficiente, aun cuando se humedecían una o dos veces por semana, y al ir perdiendo esta humedad, las raíces de las plantas

presentaron deshidratación y necrosis desde el ápice de la raíz hasta un punto medio hacia la base de la planta; además la parte vegetativa se apreciaba poco vigorosa y con pérdida de clorofila (hojas verde claro) (Figura 68).

## Sistema 2

En este sistema, a diferencia del sistema 1, al estar constantemente húmedo por el contenido de tezontle en la base del contenedor, permitió que el sustrato y la mezcla se mantuvieran húmedos por capilaridad, promoviendo así el desarrollo de las plantas. Las plantas, en ambos tratamientos de este sistema (fibra de coco y corteza de pino – encino + fibra de coco), generaron raíces, hojas y brotes vigorosos y sin pérdida de clorofila. Las raíces presentaban una amplia cobertura sobre el sustrato o la mezcla (Figura 69).

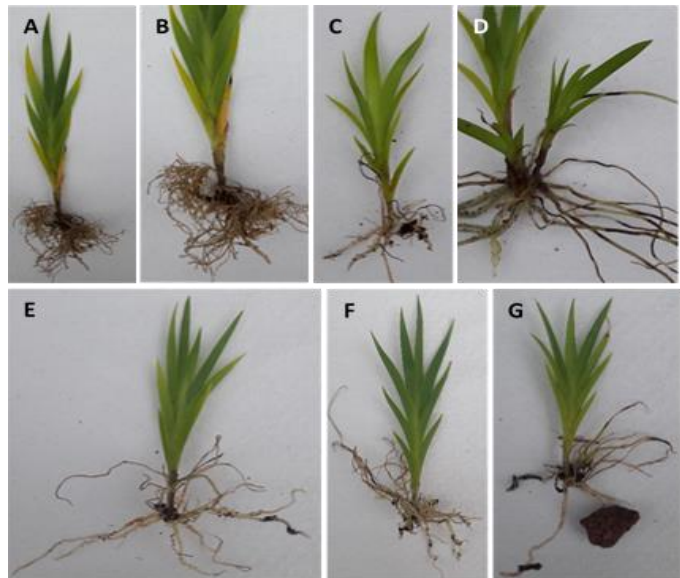


Figura 69. Sistema 2: (A, B y C) Plantas en fibra de coco donde se puede apreciar la generación de hojas y raíces. (D) Generación de brote. (E, F y G) Plantas en corteza de pino-encino + fibra de coco, vigorosas, con una cobertura mayor raíces.

Cuando las plantas de *J. equitantifolia* alcanzaron una talla homogénea (aproximadamente de 6.5 a 7 cm) para el trasplante de *in vitro* a *ex vitro*, una

parte de las mismas fueron llevadas a la U.M.A Jardín botánico XOXOCTIC (SEMARNAT-UMA-IN-0035-PUE/15), donde se entregaron al Biólogo Raúl Álvarez Mora, encargado del Orquídario, el Biólogo nos facilitó un espacio para poder trasplantar y colocar las plantas (Figura 70 - 72). Una vez que las plantas se encuentren aclimatizadas, el jardín las podrá vender ofreciendo una alternativa para adquirir estas plantas de manera legal.



Figura 70. Alumnos de la UIBV, preparándose para el trasplante.



Figura 71. Plantas de *J. equitantifolia*, ordenadas por tamaño, para ser colocadas en el sustrato.



Figura 72. (A) Plantas de *J. equitantifolia* en el sustrato. (B) Área de recuperación e individualización de pseudobulbos.



Un año después se regresó a XOXOCTIC para darles seguimiento a las plantas (Figura 73), obteniendo un porcentaje de aclimatización alto (Tabla 5).

Tabla 5. Supervivencia de *J. equitantifolia* durante la aclimatización en XOXOCTIC.

Sustrato		Plantas	Porcentaje de supervivencia
<b>Sustratos</b>			
<b>1</b>	Fibra de coco	200	75%



Figura 73. Plantas de *J. equitantifolia*. (A y B) Sistema de bambú en el “Área de recuperación e individualización de pseudobulbos”. (C y D) Sistema de vasos para la conservación de la humedad.



La otra parte de las plantas que ya habían alcanzado una talla homogénea (de un rango aproximado de 6.5 a 7 cm) para el trasplante de *in vitro* a *ex vitro*, fueron ingresadas al Invernadero del Herbario AMO, ubicado en Montañas Calizas # 490 Colonia Lomas de Chapultepec, Delegación Miguel Hidalgo, CDMX, cuyo director es el Ing. Eric Hágsater Gartenberg. Donde se entregaron al Psic. Ángel Andrade, encargado de esta área, el Psic. recibió y montó las plantas en un tronco temperizado para ubicarlas en la colección de ejemplares vivos. Un año después se regresó al herbario para darles seguimiento a las plantas (Figura 74 y 75), obteniendo un porcentaje de aclimatización exitoso (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de aclimatización de *J. equitantifolia* en el herbario AMO

Sustrato		Plantas	Porcentaje de sobrevivencia
<b>Sustratos</b>			
<b>1</b>	Tronco de árbol temperizado	10	100%



Figura 74. Planta adulta de *J. equitantifolia* que forma parte de la colección de plantas vivas del herbario AMO (A). Plantas de *J. equitantifolia*, propagadas desde semilla en la UIBV que ahora forman parte de la colección, primera visita (B y C).





Figura 75. (A, B y C) Plantas de *J. equitantifolia*, propagadas desde semilla en la UIBV que ahora forman parte de la colección de plantas vivas del herbario A.M.O. segunda visita.

## **Discusión**

En orquídeas, la prueba más utilizada para evaluar la viabilidad de las semillas de manera rápida es la de tetrazolio (Billard, Dalzotto y Lallana, 2014b; Muñoz & Jiménez, 2008; Ossenbach *et al.*, 2007; Vujanovic, Arnaud, Barabé & Thibeault, 2000), la cual es aprobada por el I.S.T.A. (1985). França y colaboradores, en 1998, menciona que: La prueba de tetrazolio se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas (A.O.S.A., 1983; Bulat, 1961; Canuto, 2012; Copeland, Bruce & Midyette, 1959; Lauzer, Renaut, Arnaud & Barabé, 2007; Moore, 1973; Smith & Throneberry, 1951; Smith, 1952; Soares, Chaim, Bento, Sorgato y Soares, 2014) las cuales catalizan las reacciones respiratorias en las mitocondrias, durante la glicólisis y el ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente las deshidrogenasas del ácido málico reducen la sal de tetrazolio (2, 3,5-cloruro de trifenil tetrazolio o TTC) en los tejidos vivos.

Cuando la semilla es inmersa en la solución incolora de tetrazolio, esta se difunde a través de los tejidos, produciéndose en las células vivas la reacción de reducción que da como resultado la formación de un compuesto rojo, estable y que no se difunde, llamado trifenilformazán.

Cuando el TTC se reduce, formando el trifenilformazán, indica que existe actividad respiratoria en las mitocondrias, esto significa que hay viabilidad celular y del tejido. El color resultante de la reacción es un indicador positivo de la viabilidad a través de la detección de la respiración a nivel celular. Tejidos no viables no reaccionan y consecuentemente no se tiñen (Chen & Chen, 2007).

Cuando el tejido es vigoroso, se formará el color rojo carmín claro; si el tejido está en proceso de deterioro, un rojo más intenso será formado, en virtud de la mayor intensidad de difusión de la solución de tetrazolio por las membranas celulares comprometidas de tales tejidos. Si el mismo no es viable, la reducción de la sal no ocurrirá, y el tejido muerto contrastará, blanco (no teñido) con el tejido teñido, viable (Moore, 1973).

Al evaluar la viabilidad de cada uno de los lotes de semillas de *Dichaea glauca* y *Jacquinella equitantifolia*, fueron nulas y/o escasas las semillas que presentaron tejido teñido, lo cual no corresponde a los resultados obtenidos con la germinación *in vitro*. Esto puede estar relacionado a que el tiempo y la concentración de hipoclorito de sodio (0.6%), al cual estuvieron expuestas las semillas antes de ser colocada la solución de TTC, fue insuficiente para que la testa se hidratara y estuviera permeable para que permitiera la adecuada absorción del tetrazolio. Este pretratamiento puede estar estrechamente relacionado con el tamaño de las semillas, la estructura y la ornamentación de la pared (testa) de la semilla que se presenta en algunas especies como *D. glauca* (Milanese, 1997).

Álvarez y colaboradores en el 2006, asocian que el tiempo y la concentración de cloro activo para la desinfección afecta el porcentaje de viabilidad de las semillas de las especies *Brassavola tuberculata*, *Cattleya intermedia* y *Cattleya intermedia pallida*; en donde disminuyó en un 29% con respecto a la viabilidad de la semillas cuando éstas fueron sometidas a una dosis de 0.4% de cloro durante 15 min, mientras que para la misma dosis durante 5 min no afectó a la viabilidad; y



para una dosis de 0.8% la viabilidad disminuyó significativamente para los diferentes tiempos de exposición. El hipoclorito de sodio escarifica la cubierta de las semillas permitiendo con ello que la solución de tetrazolio penetre fácilmente hacia el embrión (Rännbäck, 2007; Vasudevan & Staden, 2010).

Salazar (2012), somete semillas de *Cattleya mendelii* a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%, 2.6%, 3.0%) antes de llevar a cabo la prueba de TTC. Obteniendo que el mayor porcentaje de viabilidad se observó en las semillas tratadas con una menor concentración de hipoclorito de sodio que aquellas que se trataron con una mayor concentración y concluyen que el hipoclorito de sodio influye moderadamente en la viabilidad de las semillas.

Lallana y García (2013), evalúan la viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* mediante la prueba de tetrazolio con y sin pretratamiento con agua y sacarosa. Los valores de viabilidad más altos se obtuvieron al colocar las semillas 24 h de imbibición con agua destilada para luego reemplazarla por TTC y al colocar las semillas 24 h de imbibición en sacarosa al 10% y para luego reemplazar la solución por TTC durante 24 h. Presentando el menor porcentaje de viabilidad en el pretratamiento con hipoclorito de sodio al 0.1% para posteriormente ser inmersas en TTC por 24 h.

Por esta razón, la prueba de viabilidad con TTC, debe ser validada con una prueba directa de germinación *in vitro* en el laboratorio (Johnson, Stewart, Dutra, Kane & Larry, 2007; Muñoz & Jiménez, 2008).

Pese a que la concentración y el tiempo de exposición en el hipoclorito de sodio no fueron los apropiados para la prueba de viabilidad, si fueron los adecuados para la desinfección realizada antes de la siembra de las semillas, pues el porcentaje de contaminación fue de 0%, para ambas especies (*D. glauca* y *J. equitantifolia*) la germinación ocurrió en un lapso de 20 a 60 días después de la siembra y la obtención de plántulas completas (hojas, raíces y pseudobulbos) se obtuvo en un rango de 180 a 200 días. Se reporta 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). Comparado con este dato la germinación y desarrollo de estas especies se encuentra dentro de lo reportado en la literatura.

El porcentaje de germinación para las semillas de *D. glauca* y *J. equitantifolia* en el cultivo *in vitro* se encuentra entre 70 y 98%. Menchaca y Moreno (2011), dicen que; el porcentaje de germinación de una semilla en la naturaleza es muy bajo, logrando que sólo 10 o 15 semillas germinen de un total de 1 millón, de las semillas que logran germinar, sólo una o dos llegan a ser plantas adultas después de dos o tres años. La técnica de cultivo *in vitro* se considera exitosa ya que se obtienen más individuos de los que se esperaba obtener de manera natural.

El medio nutritivo Kao & Michayluck favoreció la germinación y el desarrollo en ambas especies, este medio ha sido ampliamente estudiado, en la Unidad de Investigación en Biología Vegetal, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Rodríguez (2013), induce la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Epidendrum radicans* empleando como uno de los tratamientos las variaciones del medio KM, obteniendo 87% de plántulas con hojas y raíz a los 56 días. Duarte (2014), obtiene para *Barkeria uniflora* a los 56 días de cultivo plántulas con una hoja en este medio.

Las orquídeas según la especie presentan diferentes necesidades nutrimentales para su crecimiento. Por esto es importante estudiar el medio de cultivo *in vitro* más adecuado para cada una de ellas (Ruíz, Laguna, Iglesias, Damon, Marín *et al.*, 2008). A través del tiempo se han implementado diferentes medios de cultivo para la preservación de orquídeas (Basker & Narmatha, 2010; Dutra, Kane & Richardson, 2009; Kauth, Kane & Vendrame, 2011). El medio de cultivo realizado por Murashige & Skoog se ha utilizado con éxito en casi todas las especies de orquídeas (Asghar, Ahmad, Ahmad & Yaseen, 2011; Thompson, Trevor & Van, 2006). Y para *Jacquinilla equitantifolia* ocurrió algo similar; pues, de los diferentes medios empleados para el crecimiento de las plántulas, fue el medio MS donde se obtuvieron plantas vigorosas, así como los incrementos de talla más altos, comparado con los otros medios, el MS contiene mayor cantidad de macronutrientes y también, contiene una alta concentración de nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$  (Hurtado y Merino, 1987) una forma asimilable para las plántulas.

A diferencia de *J. equitantifolia* y su preferencia por el medio nutritivo MS; *Dichaea glauca*, obtuvo los incrementos más altos con respecto a la talla en el medio KM, desarrollando plantas vigorosas y turgentes.

Considerando que la mayoría de las orquídeas son plantas epifitas, están habituadas a recibir nutrientes diluidos en pequeñas cantidades, pero de forma constante (Menchaca y Moreno, 2011); es así que, se decide probar en este estudio, diferentes concentraciones de las sales inorgánicas. Es importante mencionar que, si bien el medio nutritivo Peters no presentó resultados estadísticamente relevantes, comparados con los medios MS y KM, las plantas de ambas especies se desarrollaron adecuadamente; los fertilizantes comerciales, cada vez son más empleados para la elaboración de medios de cultivo obteniendo resultados favorables, dando una alternativa para aminorar los altos costos que conlleva el cultivo *in vitro*.

Romero (2008), emplea fertilizantes comerciales como sustitutos en el cultivo *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps*, obteniendo que el fertilizante Peters 24:8:16, favorece el desarrollo y la vigorosidad de las plantas aun sobre el medio MS.

Billard y colaboradores en el 2014a, seleccionan plantas de *Polystachya concreta* y realizan subcultivos en medios, constituidos por concentraciones de sales básicas de MS, suplementadas con sacarosa y fertilizantes comerciales (Peters 20: 20: 20), determinando el peso seco total por

tratamiento; obteniendo que, el agregado de fertilizantes inorgánicos al medio de cultivo básico o fertilizantes más MS a la mitad de su concentración, permite un crecimiento de las plantas de *P. concreta*, con predominio de mayor biomasa radical y menor porcentaje de materia seca.

Las plantas bajo cultivo *in vitro* desarrollan una nutrición heterótrofa, predominando la adquisición de carbohidratos de manera directa en el medio de cultivo y limitando al mínimo el proceso fotosintético, el cual además no es inducido debido a la baja intensidad luminosa que predomina en las condiciones de incubación (Ortega, Martínez y Chávez, 2009). Las plantas dentro de los frascos se mantienen en condiciones de alta humedad relativa (>90 %) y asepsia absoluta, lo que produce estomas poco funcionales (Ziv, Schwartz & Fleminger, 1987) y láminas foliares sin un recubrimiento ceroso que permita regular la elevada evapotranspiración cuando son sujetas al ambiente natural (Sutter, 1988). Al ser trasplantadas en sustratos, bajo condiciones de invernadero o campo, su nutrición pasa a ser estrictamente autótrofa al estar expuestas a mayor intensidad lumínica, a cambios en la humedad y al ataque de patógenos (George, 1993). Por estas razones, la aclimatización es considerada la etapa más crítica en este proceso.

*Dichaea glauca* y *Jacquinella equitantifolia*, al ser especies de bosque de niebla (Hágsater *et al.*, 2005), fue necesario considerar para su aclimatización la presencia de una alta humedad relativa; por esa razón, para *J. equitantifolia* el mejor sistema (independientemente del sustrato y/o la mezcla empleados) fue el sistema 2, obteniendo un promedio del 60% de plantas aclimatizadas, debido a la capa de tezontle que le aportaba al sistema la humedad suficiente.

Para *Jacquinella* la mezcla de corteza de pino-encino + fibra de coco, empleados en este sistema 2, favoreció la aclimatización de las plantas; ya que, los diferentes compuestos de esta mezcla la vuelven porosa permitiendo una adecuada aireación para las raíces, a diferencia del sustrato de fibra de coco el cual al ir perdiendo humedad comenzaba a compactarse dañando las raíces que las plantas generaban. En contraste con lo ocurrido en el jardín botánico XOXOCTIC, donde el sustrato que favoreció la aclimatización de *J. equitantifolia* fue “fibra de coco”, debido a que la humedad relativa (97 – 99 %) evita que el sustrato pierda humedad y así las raíces se establecieran adecuadamente.

De la Cruz (2006), probó tres diferentes mezclas para la aclimatización de plantas de *Prosthechea vitellina*, 1° Sphagnum + agrolita + carbón activado (1:1:1). 2° Sphagnum + agrolita + corteza de encino (1:1:1). 3° Sphagnum + corteza de encino + carbón activado (1:1:1). Obteniendo que las plantas de *P. vitellina* presentaron un mejor desarrollo y adaptación en las mezclas que contenían corteza de encino y Sphagnum ya que en estos sustratos las raíces crecían mejor. Concluyendo que la utilización de mezclas de sustratos permite agrupar de manera práctica una serie de características que se acercan a las más adecuadas para favorecer el desarrollo de una especie, cada mezcla presenta un comportamiento distinto, el cual se tiene que conocer y aprovechar.

Billard y colaboradores en el 2014a, someten plantas de *Polystachya concreta* a un proceso de aclimatización probando como sustratos, P1: corteza de pino, Sphagnum, tierra fértil y perlita (1:1:1:1), P2: Corteza de pino, cáscara de arroz carbonizada y perlita (2:1:1), C1: Compost orgánico, Sphagnum, acícula de pino, resaca de río y perlita y C2: Compost orgánico, acícula de pino y resaca de río. Obteniendo para los 60 días de iniciado el proceso de aclimatización una supervivencia de 0 % para el sustrato P1 y P2; mientras que, a los 90 días se tenía una supervivencia de 100 % para el sustrato C1 y 91,6 % en el C2.

Por otra parte, el establecimiento de las plantas de *Dichaea glauca* a condiciones *ex vitro* requiere de mayores cuidados como la intensidad lumínica, los cambios en la humedad tanto del sustrato como la humedad relativa, el ataque de patógenos y el sustrato adecuado.

## **Conclusiones**

- La evaluación de la viabilidad de las semillas de *Dichaea glauca* y *Jacqiniella equitantifolia* vía indirecta con TTC fue ineficaz a diferencia de la evaluación directa en cultivo *in vitro*.

### ***Dichaea glauca***

- El medio nutritivo KM al 50% promueve significativamente la germinación de semillas, el desarrollo de embriones y crecimiento de plántulas *in vitro* de *Dichaea glauca*.
- Las semillas de *D. glauca* inician el proceso de germinación *in vitro* a los 56 días de cultivo y a los 98 días alcanzan el máximo porcentaje con 71%.
- Los embriones de *D. glauca* se desarrollan en plántulas con raíz y pseudobulbo a los 168 días de cultivo como estadio más avanzado.
- El máximo valor del I.D. para *D. glauca* es 497 a los 245 días de cultivo, momento en que predominan plántulas con hojas iniciales.
- El medio nutritivo óptimo para el crecimiento de *D. glauca* es el KM, registrando los incrementos más altos con respecto a la talla.
- La aclimatización de plántulas de *D. glauca* obtenidas *in vitro* fue imposible bajo las condiciones experimentadas. Se requiere tomar en cuenta el control de factores como la humedad ambiental, el pH de los sustratos entre otros, para su adecuado establecimiento.
- Se establece un protocolo para la germinación, desarrollo fenológico y ontogénico, crecimiento *in vitro* para *Dichaea glauca* con el cual se logró la micropropagación de esta especie.

### ***Jacqiniella equitantifolia***

- El medio nutritivo KM al 50% promueve significativamente el proceso de germinación *in vitro* de las semillas de *J. equitantifolia* a los 28 días de cultivo y a los 63 días alcanzan el máximo porcentaje con 97%. El medio nutritivo MS al 50% promueve significativamente el desarrollo de embriones y crecimiento de plántulas.
- El mayor estadio de desarrollo alcanzado por los embriones de *J. equitantifolia* es el de plántulas con raíz y pseudobulbo a los 175 días de cultivo.
- El máximo valor del I.D. para *J. equitantifolia* es 772 a los 266 días de cultivo, momento en el que la minoría son plántulas con raíces y la mayoría plántulas con raíz y pseudobulbo.
- El medio nutritivo óptimo para el crecimiento de *J. equitantifolia* es el MS, registrando los incrementos más altos con respecto a la talla.
- Las plántulas de *J. equitantifolia* para su aclimatización requieren alta humedad relativa y sustratos porosos para un adecuado establecimiento.
- Se establece un protocolo para la germinación, desarrollo fenológico y ontogénico, crecimiento *in vitro* y aclimatización para *Jacqiniella equitantifolia* con el cual se logró la micropropagación de esta especie.

## Referencias

- A.O.S.A (Association of Official Seed Analysts). (1983). *The Seed Vigor Test Committee. Seed vigor testing handbook*. 88.
- Abad, M., Noguera, P., Puchades, R., Maquieiria, A. & Noguera, N. (2002). Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dists for use as a peat substitute for containerised ornamental plants. *Biosource Technology*, 82: 241-245.
- Abdelnour, E. A. y Escalant, J. V. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Costa Rica: Catie.
- Ackerman, J. D. (1986). Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana 1*: 108-113.
- Ackerman, J. D. (1995). Orchid flora of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 73.
- Albores, O. O. y Sosa, V. (2006). Polinización de dos especies simpátricas de *Stelis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta Botánica Mexicana 74*:155–168.
- Alvarez, P. V. M., Ferreira, A. G. & Nunes, V. F. (2006). Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Hortic. Bras.* 24:217 - 220.
- Andrade, R. M., Vargas, A. J., Villegas, T. G. O., Lopez, M. V., Guillen, S. D. & Alia, T. I. (2015). Seed germination and seedlings growth of *cattleya (Brassolaeliocattleya) in vitro*. *Interciencia*, 40(8), 549-553.
- Arditti, J. & Ernst R. (1981). Physiology of Germinating Orchids Seeds. En: J. Arditti (ed) *Orchid Biology, Reviews and Perspectives, II*. Cornell Univ: Press, Ithaca.
- Arditti, J. & Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 145:367 - 421.
- Arditti, J. & Krikorian, A.D. (1996). Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society 122*: 183-241.
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1-97.
- Arditti, J. (1984). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press. USA: Ithaca.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of orchid biology*. Department of Developmental and Cell Biology. New York: Ed. John Wiley and Sons.
- Arditti, J. (1993). *Micropropagación of orchids*. New York: Ed. John Wiley and Sons.
- Arriaga, L., Espinoza, J. M., Aguilar, C., Martínez, E., Gómez, L. y Loa, E. (2000). *Regiones terrestres prioritarias de México. Escala de trabajo 1:1 000 000*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.

- Asghar, S., Ahmad, T., Ahmad, I. & Yaseen, M. (2011). *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology*. 10(16): 3097-3103.
- Barba, A; Luna, S. y Romero J. (2002). Micropropagación de plantas. México: Trillas.
- Basker, S. & Narmatha, B. (2010). *In vitro* propagation of an epiphytic and rare orchid *Eria bambusifolia* Lindl. *Research in Biotechnology. I*: 15-20.
- Bastida, T. A., Flores, E. G., Vázquez, I. G. y Navarro, L. E. R., (2007). *Introducción a la reproducción y manejo de orquídeas mexicanas* (No. 635.9344 I5).
- Bechtel, H., Cribb, P. & Launert, E. (1980). *The Manual of Cultivated Orchid Species*. Cambridge, Massachusetts: The MIT Press.
- Bell, A.D. & Bryan, A. (1991). *Plant Form – An Illustrated Guide to Flowering Plant Morphology*. Oxford University: Press, Oxford.
- Bernard, N. (1899). Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *C R Hebd. Seances Acad. Sci.* 128:1253 - 1255.
- Billard, C., Barsanti, V. y Lallana, V. H. (2014a). Cultivo “*in vitro*” y aclimatación de plantas de *Polystachya concreta* (Orchidaceae). *Revista FABICIB* 18:95-106.
- Billard, C., Dalzotto, C. y Lallana, V. (2014b). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, 38, 145-157.
- Borba, E. L., Semir, J. & Shepherd, G. J. (2001). Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Ann. Bot.* 88: 89-99.
- Bulat, H. (1961). Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. Proceedings of the International Seed Testing Association, *Copenhagen*, v.26, 686-696.
- Burns, B. P. (1989). *A reference guide to orchidology*. Germany: Koeltz Scientific Books.
- Canuto, R. (2012). *Dehydrogenases*. Zagreb, Croatia: In Tech Design Team.
- Cavalcante, M.P., Willadino, L., Dias, A.G. y Tenório, S.D.V.M. (2001). Propagacao de orquídea *Góngora quinquenervis* por *semeadura in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 1319-1324.
- Cetzal-Ix, W., Álvarez, M. R., Basu, S. K., Cosme, P. J. & Noguera, S. E. (2014). Orchid fruit diversity at Puebla Mexico: A new insight into the biodiversity of a fragmented ecosystem with need for conservation and potential for horticultural exploitations in future. In: Nandwani, D. Role of horticulture in biodiversity conservation. *Springer International Publishing Switzerland*. 207–220.
- Chase, M. W. (1985). Pollination of *Pleurothallis endosthachys*. *Am. Orch. Soc. Bull.* 54: 431-434.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L. & Freudenstein, J. V. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP,

- Barrett RL, Cribb PJ (eds) Orchid conservation. *Natural History Publications, Kota Kinabalu*, 69–89.
- Chen, W. & Chen, H. (2007). *Orchid Biotechnology*. World Scientific. Editorial: World Scientific Pub Co Inc.
  - Copeland, T.G., Bruce, C.F. & Midyette, J.W. (1959). The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts, *East Lansing*, v. 49, 134-141.
  - Cozzolino, S. & Windmer, A., (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *TREE* 20: 487-494.
  - Currah, R.S. (1991). Taxonomic and developmental aspects of the fungal endophytes of terrestrial orchid mycorrhizae. *Lindleyana* 6: 211-213.
  - Curtis, J. T. (1947). Studies on the nitrogen metabolism of orchid embryos. I. Complex nitrogen sources. *Bull. Amer. Orchid Soc.* 16:654-660.
  - Dafni, A. (1984). Mimicry and deception in pollination. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 259-278.
  - Damon, A., Aguilar, G.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: 195-203.
  - De la Cruz, R. R. M. (2006). Micropropagación y adaptación a condiciones ambientales de: *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins (Orchidaceae). (Tesis de Licenciatura). Unidad de Investigación en Biología Vegetal. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
  - De Macedo, M. C., Rosa, D. B. C. J., Soares, J. S., Tatará, M. B., Hofmann, N. T. K. & Rosa, Y. B. C. J. (2014). Seed storage and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)*, 35(6), 2883-2894.
  - Debergh, P. & Zimmerman, R.H. (1991). Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. *Dordrecht, The Netherlands* 71-93.
  - Dewir, Y. H., El Mahrouk, M. E., Murthy, H. N. & Paek, K. Y. (2015). Micropropagation of *Cattleya*: Improved *in vitro* rooting and acclimatization. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(1), 89-93.
  - Díaz, A. E. A., Torres, G. C., Rojas, C. Á. P. & De La Barrera, E. (2015). *In vitro* germination and development of two endangered endemic Colombian orchids *Cattleya mendelii* and *Cattleya quadricolor*. *Gayana. Botanica*, 72(2), 213.
  - Díaz, L. P., Namur, J. J., Bollati, S. A. & Arce, O. E. A. (2010). Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 27-40.
  - Dodson, C. H. (1962). The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *Am. Orch. Soc. Bull.* 31: 525-534, 641-649, 731-735.



- Dorneles, L. T. y Trevelin, V. (2014). Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. *Iheringia Série Botânica*, 66(2).
- Dressler, R. L. (1966). *Jacquinella equitantifolia*. *Epidendrum equitantifolium* Ames, Nomenclatural Notes on the Orchidaceae III. *Taxon* 15(6): 241-243.
- Dressler, R. L. (1981). *The orchids – natural history and classification*. Harvard University: Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland, Oregon: Dioscorides Press.
- Dressler, R. L. (2005). How many orchid species?. *Selbyana*, pp 155-158.
- Duarte, S. I. J. (2014). Germinación *in vitro* de *Barkeria uniflora* lex. dressler & halbinger, una orquídea endémica de México. (Tesis de Licenciatura). Unidad de Investigación en Biología Vegetal. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Dutra, D., Kane, M. & Richardson, L. (2009). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 96:235-243.
- Ellis, A. G. & Johnson, S. D. (1999). Do pollinators determine hybridization patterns in sympatric *Satyrium* (Orchidaceae) species? *Pl. Syst. Evol.* 219: 137-150.
- Espejo, S. A. y López, F. A. R. (1997). *Las monocotiledóneas mexicanas, una sinopsis florística. I. Lista de referencia. Parte VII. Orchidaceae 1*. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C., México, D.F: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Espejo, S. A. y López, F. A. R. (1998). *Las monocotiledóneas mexicanas, una sinopsis florística. I. Lista de referencia. Parte VIII. Orchidaceae 2*. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C., México, D.F: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Faria, R.T., Assis, A.M., Unemoto, L. K. y Roble, J.F.R.P. (2012). *La producción de orquídeas en el laboratorio*. Londres: Mecenas. 124.
- Folsom, J. P. (1996). An introduction to the genus *Dichaea* and a synopsis of section *Dichaea*. *Orchid Digest*, 60, 148-155.
- França, N. J., Kryzanowski, F.C. y Pereira da Costa, N. (1998). El Test de Tetrazolio en Semillas de Soja. Embrapacnpso. *Documentos*, 117. 72.
- Freuler, M. J. (2006). *Orquídeas: Una guía esencial para el cuidado y el cultivo de estas increíbles y sofisticadas epifitas*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros.
- Freuler, M. J. (2011). *Orquídeas una guía para el cultivo de estas increíbles y sofisticadas epifitas*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros.
- Galdiano, J. R. F., Mantovani, C., De Faria, R. T. & Lemos, E. D. M. (2013). Sucrose concentrations *in vitro* development and acclimatization of *Cattleya loddigesii* Lindley. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)*, 34(2), 583-591.

- García, C. J., Sánchez, L. M., Jiménez, R. y Solano, R. (1998). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Orchidaceae, tribu Maxillarieae*. México, CDMX: Herbario AMO, Fascículo, 67.
- García, M. y Cuevas, M. (2000). *Abonos, fertilizantes y aplicación*. En: *García, D.; J. Arceo e I. Miranda, Apuntes de agronomía II*. Capítulo 6. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Gaudig, G., Fengler, F., Krebs, M., Prager, A., Schulz, J., Wichmann, S. & Joosten, H. (2014). Sphagnum farming in Germany - a review of progress. *Mires and Peat*, 13: 1-11.
- George, E. F. (1993). *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology*. London Inglaterra: Exegetics Ltd.
- Gobierno del Estado de Puebla. (1988). *Los Municipios de Puebla*. México. CDMX: Secretaría de Gobernación.
- Haddix, M., Kamp, G. M. y Raczkowski, C. (2006). *In vitro* Shoot and leaf proliferation of *Encyclia tampensis* (Lind.) Orchidaceae. Abstracts of the ASHS Southern Region 66th Annual Meeting. 2-4 February. *HortScience Vol. 40*(3).
- Hadley, G. (1982). *Orchid mycorrhizae*. Nueva York: In J. Arditti (ed.). *Orchid Biology: reviews and perspectives II*. Cornell University, Ithaca.
- Hágsater, E., Soto Arenas, M. A., Salazar Chávez, G. A., Jiménez Machorro, R., López Rosas, M. A. y Dressler, R. L. (2005). *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México, D.F.
- Harley, J. L. & Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Londres: Academic.
- Harrison, C. R. & Arditti, J. (1978). Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 139(2), 180-189.
- Hartmann, H. & Kester, D. (2002). *Plant propagation. Principles and practices*. New Jersey. Prentice Hall.
- Hills, H. G., Norris, H. W. & Dodson, C. H. (1972). Floral fragrances and isolating mechanisms in the genus *Catasetum* (Orchidaceae). *Biotropica* 4: 61-76.
- Hurtado, M. D. V. (1987). *Adaptación de plantas obtenidas in vitro a condiciones naturales*. En: *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Editorial Trillas.
- Hurtado, M. D. V. y Merino, M. M. E. (1987). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Editorial Trillas.
- I.N.E.G.I. (1985). *Cuetzalan del Progreso, estado de Puebla: cuaderno estadístico municipal*. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- I.S.T.A. (International Seed Testing Association). (1985). International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 13:300 - 520.
- Johnson, S. D. & Edwards, T. J. (2000). The structure and function of orchid pollinaria. *Pl. Syst. Evol.* 222: 243-269.
- Johnson, S. D. & Nilsson, L. A. (1999). Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination systems in orchids. *Ecology*. 80: 2607-2619.

- Johnson, T. & Kane, M. (2007). Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: *in vitro* germination and development of three hybrids. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 91:251–261.
- Johnson, T., Stewart, L., Dutra, D., Kane, M. & Larry, R. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)— preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 90:313 – 323.
- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D. Č. V. & Schafer, C. (2001). "Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth". *Plant Science*, 161: 695-701.
- Kämpf, A. N. (2005). *La producción comercial de plantas ornamentales 2*. Ed Guaíba: Agrolivros.
- Kao, K. N. & Michayluk, M. R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplast at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-110.
- Kauth, P., Kane, M. & Vendrame, W. (2011). Comparative *in vitro* germination ecology of *Calopogon tuberosus var. tuberosus* (Orchidaceae) across its geographic range *in vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 47:148-156.
- Knudson, L. (1921). La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. *Bol Soc Esp Hist Nat*. 21:250 - 260.
- Lallana, V. y Garcia, L. (2013). Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). *Investigación Agraria*, 15(2), 129-132.
- Lauzer, D., Renaut, S., Arnaud & Barabé, D. (2007). *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. Ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 134(3), 344-348.
- Leroy, T. & Pike L. M. (1976). Flasking orchid seeds-A method for the novice grower. *Amer. Orchid Soc. Bull*. 45: 800-803.
- Liu, H., Luo, Y. B. y Liu, Z. J. (2013). El uso de modelos de cultivo comercializado guiado para promover la conservación de especies y la utilización sostenible: un ejemplo de las orquídeas medicinales chinas. *La ciencia de la biodiversidad* 21: 132-135.
- Mariat, F. (1952). Recherches sur la physiologie des embryons d'orchidees. *Rev. Gen. Bot*, 59, 324-377.
- Mc Donald, E. (1999). *Orthos. All About Orchids*. Des Moines, USA: Meredith Book.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Universidad San Francisco de Quito: Ceiba Fundación para la Conservación Tropical.
- Menchaca, R. y Moreno, D. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas*. CONAFOR – 2003-CO310703. Jalisco. México: Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico.
- Milaneze, M. A. (1997). *Estudos em orquídeas nativas do Brasil: Morfologia de sementes e cultivo assimiótico*. (Tese Doutorado em Biología Vegetal). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

- Mittermeier, R. A. (1988). *Primate diversity and the tropical forest*. Washington, DC: En Wilson EO (Ed.) Biodiversity. National Academy Press.
- Moore, R. P. (1973). *Tetrazolium staining for assessing seed quality*. In: Heydecker, W. ed. Seed ecology. London: Butterworth.
- Mora, G. E. (2004). *Orquídeas de la región de Apulco, perteneciente a los municipios de Xochiapulco y Zacapoaxtla, Puebla*. (Reporte de servicio social). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Morales, A. G. (2008). *Diversidad de la familia Orchidaceae en el municipio de Jalpan, Puebla, México*. (Tesis de licenciatura). Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Morrone, J. J. (2001). *Biogeografía de América Latina y el Caribe, vol 3*. Zaragoza: M&T-Manuales & Tesis SEA.
- Muñoz, M. & Jiménez, V. (2008). Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana* 8(2):23 – 31.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nilsson, L. A. (1992). Orchid pollination biology. *Trends Ecol. Evol.* 7: 255-259.
- Northen, R. T. (1970). *Home Orchid Growing*. Third Edition. 95-113
- Ortega, L. M. P., Martínez, P. A. y Chávez, A. V. M. (2009). *Conservación y propagación de orquídeas*. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel.
- Ossenbach, C., Arce, J. y Warner, J. (2007). Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. *Tierra Tropical*. 3(1):47-59.
- Otero, O. J. T. y Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270-276.
- Pasqual, M., Chalfun, N. N. J. y Ramos, J. D. (2001). Cultivo de tejidos: tecnología y aplicaciones - aplicaciones en la propagación de la planta. *Lavras: UFLA / FAEPE*, 81 p.
- Pedroza, J. & Micán, Y. (2006). Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 42: 543-54.
- Pedroza, M. J., Fernández, L. Ch. & Suarez, S. A. (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcate* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 38-843.
- Pérez, B. R., Salazar, G. A. y Mora, G. E. (2010). Orquídeas de Las Lomas-La Manzanilla, Sierra Madre Oriental, Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (87), 125-129.
- Pierik, R. L. (1990). *Cultivo in vitro de las Plantas Superiores*. Madrid, España: Ed. Mundi-Prensa.

- Pijl, L. V. D. & Dodson, C. H. (1969). *Orchid flowers. Their pollination and evolution*. University of Miami Press: Coral Gables.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. & Plzánková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biología Plantarum*, 42(4); 481-497.
- Pupulin, F. (1998). *Orchids of Manuel Antonio National Park*. San José, Costa Rica: Mesoamerican Press.
- Pupulin, F. (2007). Contributions toward a reassessment of Costa Rican *Zygopetalinae* (Orchidaceae). 3. A systematic revision of *Dichaea* in Costa Rica. *Harvard Papers in Botany*, 12(1), 15-153.
- Rännbäck, L. (2007). Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium spp.* Dept. of Crop Science, SLU. Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme. 2007:1.
- Rasmussen, H. N. (1995). *Terrestrial orchids: From seeds to mycotrophic plants*. Cambridge: University Press.
- Raveschot, V. V. G. (2009). *Acclimatación de plántulas de Chloraea virescens (Willd.) Lindl. cultivadas in vitro*. Universidad Austral de Chile.
- Richardson, K. A., Currah, R. S. y Hambleton, S. (1993). Basidiomycetous endophytes from the roots of Neotropical epiphytic Orchidaceae. *Lindleyana* 8: 127-137.
- Rodrigues, D. T., Novais, R. F., Dias, J. M. M., Otoni, W. C. y de Albuquerque, V. E. M. (2015). Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. *Ceres*, 59(1).
- Rodríguez, F. A. B. (2013). *Inducción de la germinación in vitro de Epidendrum radicans Pav. Ex Lindl.* (Tesis de Licenciatura). Unidad de Investigación en Biología Vegetal. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Romero, G. C. (2000). *Orquídeas de la Sierra Norte de Puebla*. En: Sarmiento-Fradera M. y Romero-Giordano C. Eds. *Orquídeas mexicanas*. México, D.F: Editorial Porrúa.
- Romero, T. R. (2008). *Fertilizantes comerciales como sustitutos en el cultivo in vitro de Laelia anceps subsp. anceps (Orchidaceae). Especie mexicana*. (Tesis de Licenciatura). Unidad de Investigación en Biología Vegetal. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H. *et al.* (2008). *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) seeds. *Revista Internacional De Botánica Experimental Python*. 77: 203-215.
- Rzedowski, J. y Calderón. G. (1989). Sinopsis numérica de la flora fanerogámica del Valle de México. *Acta Botánica Mexicana* 8: 15-30.
- Salazar, G. A. (2009). *Orquídeas*. Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 153-169 p.
- Salazar, M. S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii Dombroin* (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 61(1), 69-78.

- Salazar, M. S. A. y Cancino, G. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 53-59.
- Santos, M. N. y Teixeira, F. M. L. (2010). Semilla de Almendra (*Terminalia catappa*) (Combretaceae) como sustrato para el cultivo de orquídeas epifitas. *Acta Scientiarum* 32: 339-343.
- Sasamori, M. H., Endres, J. D. & Droste, A. (2015). Asymbiotic culture of *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae): the influence of macronutrient salts and sucrose concentrations on survival and development of plantlets. *Acta Botanica Brasílica*, 29(3), 292-298.
- Scheffknecht, S., Winkler, M., Hülber, K., Rosas, M.M. & Hietz, P. (2010). Seedling establishment of epiphytic orchids in forests and coffee plantations in Central Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 26: 93–102.
- Schmilewski, G. (2008). The role of peat in assuring the quality of growing media. *Mires and Peats*, 3: 1-9.
- Schneiders, D., Pescador, R., Booz, M. R. y Suzuki, R. M. (2015). Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya spp.*, Orchidaceae). *Ceres*, 59(2).
- Schofield, W. B. (1985). *The peat mosses-subclass Sphagnidae*. En: *Introduction to Bryology*. Caldwell, New Jersey-EE. UU: The Blackburn Press.
- Seaton, P. & Ramsay, M. (2005). *Growing Orchids from Seed, Kew plants people possibilities*. Kew. Royal Botanic Gardens.
- Segretín, M. E. (2006). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)*. Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.
- Seidel, J. D. & Venturieri, G. A. (2011). *Ex vitro* acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedlings in a selection of substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(1), 97-103.
- Serna, A. L. (1999). *Propagación in vitro de orquídeas a partir de semilla sexual*. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas.
- Sheehan, T. J. (1983). Recent advances in botany, propagation, and physiology of orchids. *Hort. Rev.* 5: 279-315.
- Singer, R. B. & Cocucci, A. A. (1999). Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lindleyana* 14: 47-56.
- Singer, R. B. & Sazima, M. (1999). The pollination mechanism in the "*Pelexia alliance*" (Orchidaceae: Spiranthinae). *Bot. J. Linn. Soc.* 131: 249-262.
- Smith, F. G. & Throneberry, G. O. (1951). The tetrazolium test and seed viability. *Proceedings of the Association Official Seed Analysts, East Lansing*, v.40, 105-109.
- Smith, F. G. (1952). The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. *Plant Physiology, Bethesda*, v.27, 445-456.

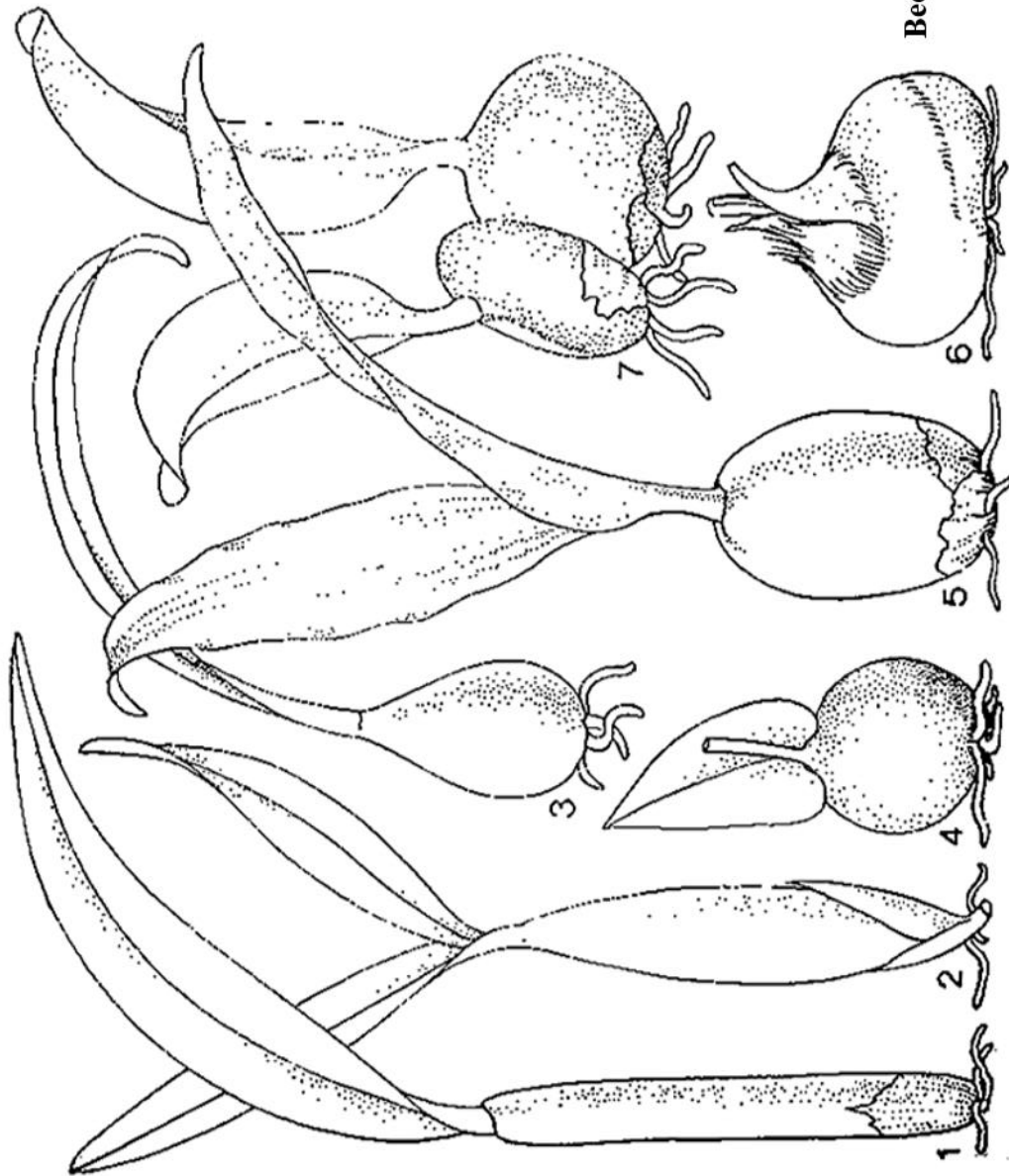
- Soares, J., Chaim, Y., Bento, M., Sorgato, J. y Soares, C. (2014). Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(5), 2275-2284.
- Soto, A. M. A. (1988). Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea* 11: 233-272.
- Soto, A. M. A. (1996). *Status survey and conservation action plan México*. Gland y Cambridge: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids.
- Sousa, G. G., Rosa, Y. B., Macedo, M. C. & Soares, J. S. (2015). Acclimatization of *Brassavola tuberculata* submitted to immersion in NAA on different substrates. *Horticultura Brasileira*, 33(2), 208-215.
- Spoerl, E. (1948). Amino Acids as Sources of Nitrogen for Orchid Embryos. *American Journal of Botany*, Vol. 35, No. 2, 88-95.
- St Arnaud, M., Lauzer, D. & Barabe, D. (1992). *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 7(1), 22-27.
- Steele, W. K. (2007). Propagation protocol for ram's head lady's slipper (*Cypripedium arietinum*). *Native Plants Journal* 8: 58-64.
- Sutter, E. (1988). Stomatal and cuticula water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *Journal of American Society of Horticulture Science*. 113: 234-238.
- Suzuki, R. M., Almeida, V., Pescador, R. y Ferreira, W. M. (2010). Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea*, 37, 731-742.
- Thompson, D., Trevor, J. & Van, J. (2006). Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulation*. 49:269-284.
- Tremblay, R. L. (1991). Trends of pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Can. J. Bot.* 70: 624-650.
- Valsko, J. J., Krahl, A. H., Holanda, A. S. S. D. & Zartman, C. E. (2014). A new species of *Dichaea* (Orchidaceae) for northern Brazil. *Acta Amazonica, Volumen: 44*, Número: 3. 397-401.
- Vasudevan, R. & Staden, J. (2010). *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Sci Hort.* 123:496 -504.
- Vázquez, V. S. (1994). *Cambios Morfológicos, Anatómicos y Fisiológicos en Plantas Aclimatizadas de Anturio y Orquídeas*. (Tesis de Maestría) Colegio de Posgraduados.
- Venturieri, G. A. y Arbieto, E. A. M. (2011). Establecimiento *ex vitro* de *Phalaenopsis amabilis* plántulas en diferentes sustratos. *Acta Scientiarum* 33: 495-501.
- Villaseñor, J. L. (2003). Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28: 160-167.
- Vujanovic, V., Arnaud, M., Barabé, D. & Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*. 86:79-86.

- Williams, L. O. (1951). The Orchidaceae of Mexico. *Ceiba*, 2: 1-321. 1956. An enumeration of the Orchidaceae of Central America. British Honduras and Panama. *Ibid*, 5, 1-256.
- Yamakami, J. K., Faria, R. T., Assis, A. M. y Rego L. V. O. (2006). El cultivo de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae) en sustratos alternativos a helecho arborescente. *Acta Scientiarum* 28: 523-526.
- Yamamoto, L. Y., Stegani, V., Faria, R. T., Fonseca, L. P. I. y Angelis, B. L. D. (2009). La aclimatación de híbrido de sustratos a base de orquídeas bagazo de la caña de azúcar en polvo. *Plant Cell Cultura y micropropagación* 5: 60-64.
- Yamazaki, J. & Kazumitsu, M. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 98: 1197-1206.
- Zettler, L. W. & McInnis, T. M. (1994). Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). *Plant Sci.* 102:133 - 138.
- Ziv, M., Schwartz, A. & Fleminger, D. (1987). Malfunctioning stomata *in vitro* leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*: implications for hardening. *Plant Science.* 52: 124- 127.



Anexo 1

**Tipos de pseudobulbos**

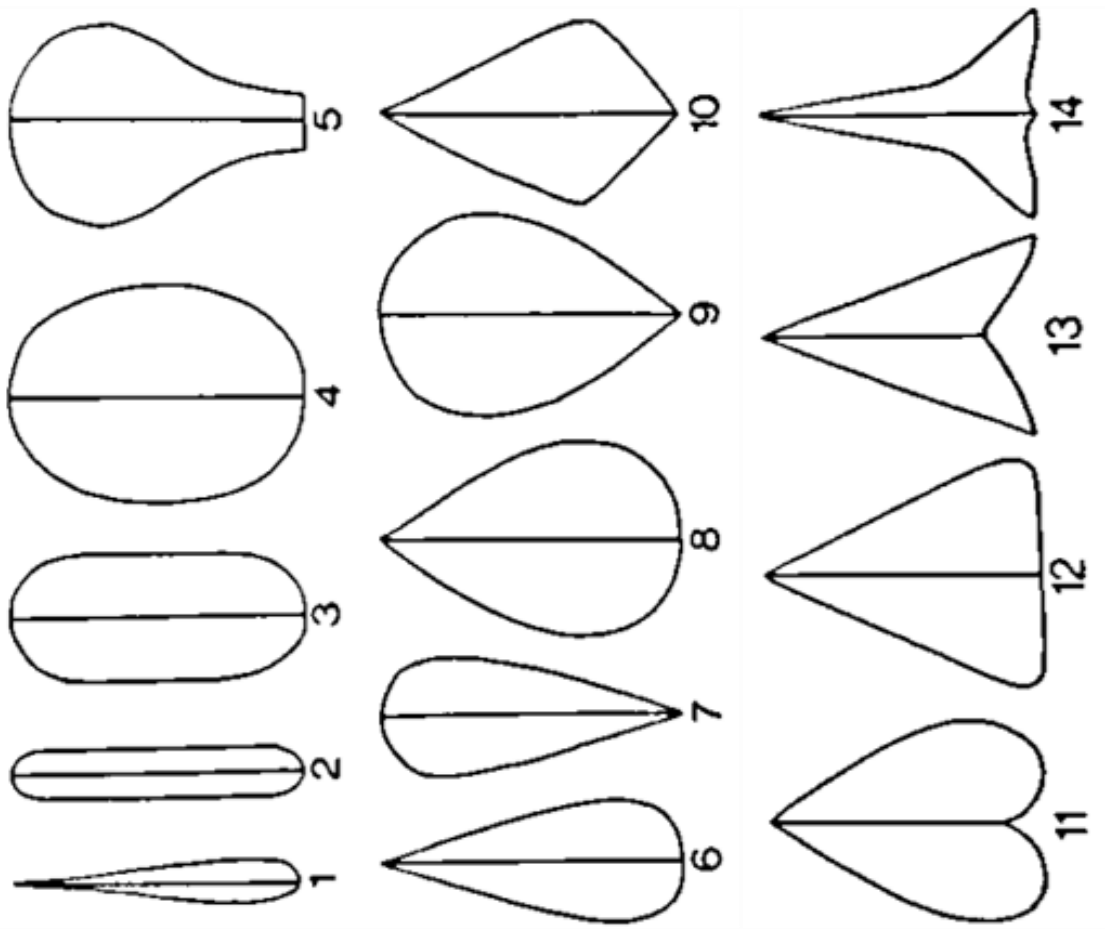


1. Cilíndricos
2. Fusiformes
3. Ovoides
4. Forma globosa
5. Elipsoides
6. Comprimidos bilateralmente
7. Comprimidos dorso lateralmente.

Bechtel, Cribb & Launert, 1980.

Anexo 2

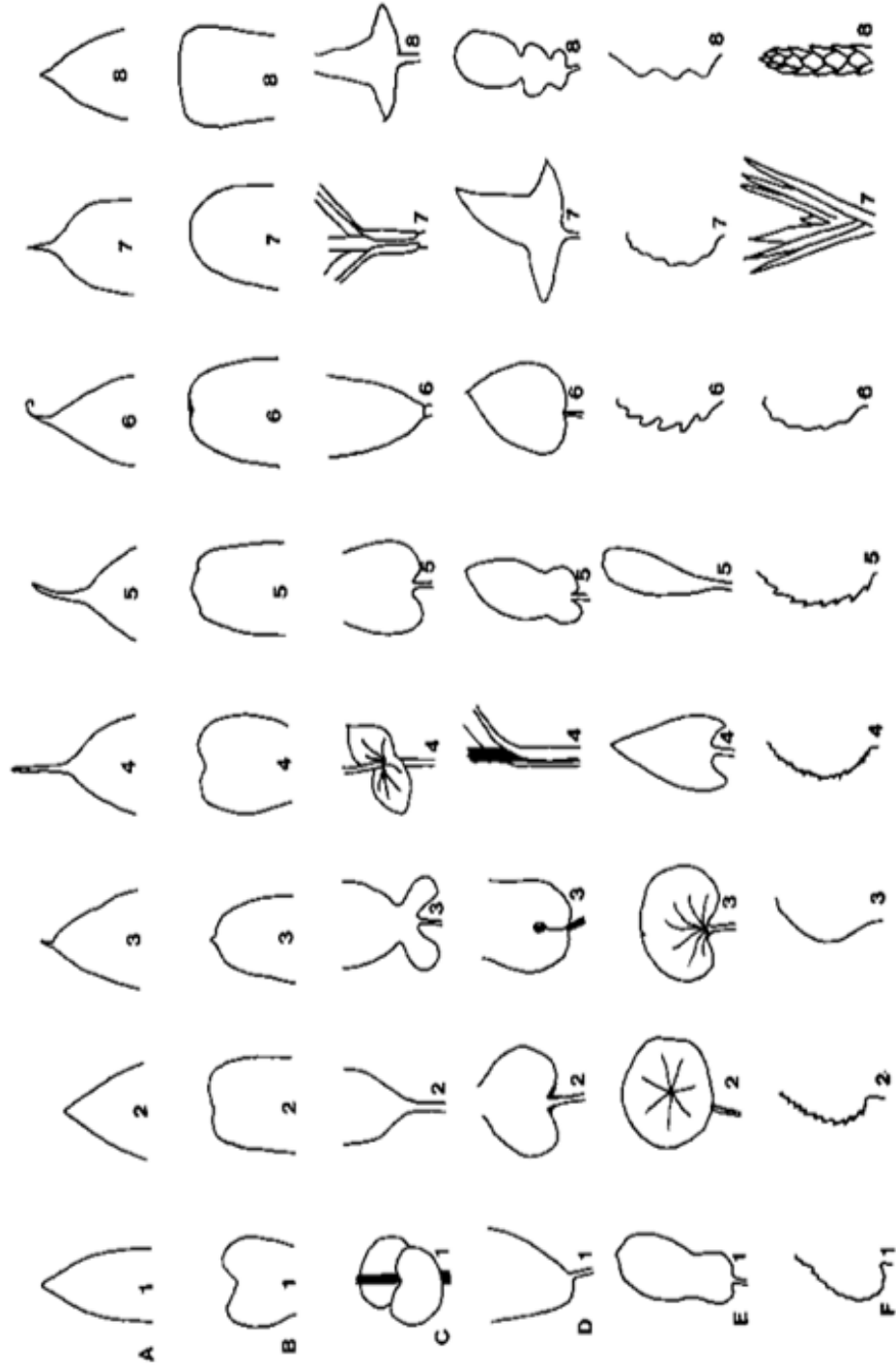
**Tipos de hojas**



1. Acicular
2. Lineal
3. Oblonga
4. Elíptica
5. Espatulada
6. Lanceolada,
7. Oblanceolada
8. Ovada
9. Obovada
10. Romboidal
11. Cordada
12. Triangular
13. Sagitada
14. Hastada

**Burns, 1989.**

**Formas de ápices, bases y márgenes de hojas presentes  
en orquídeas**



**Burns, 1989.**

## Formas de ápices, bases y márgenes de hojas presentes en orquídeas, Burns, 1989.

### Ápices

#### Fila A:

- |              |              |
|--------------|--------------|
| 1. Acuminado | 5. Caudado   |
| 2. Aguda     | 6. Crispado  |
| 3. Apiculado | 7. Cuspidado |
| 4. Aristado  | 8. Mucronada |

#### Fila B:

- |                      |                |
|----------------------|----------------|
| 1. Hendido           | 5. Obtuso      |
| 2. Emarginada        | 6. Retuso      |
| 3. Mucronada         | 7. Redondeadas |
| 4. Corazón invertido | 8. Truncadas.  |

### Bases

#### Fila C

- |                 |                |
|-----------------|----------------|
| 1. Amplexicaule | 5. Cordados    |
| 2. Atenuado     | 6. Cuneados    |
| 3. Auriculados  | 7. Decurrentes |
| 4. Coalescente  | 8. Hastado     |

#### Fila D:

- |                  |  |
|------------------|--|
| 1. Oblicua       | 6. Cordiforme  |
| 2. Cordadas      | 7. Hastiforme  |
| 3. Sagitadas     | 8. Espátula y oblonga, con pequeños lóbulos hacia la base. |
| 4. Revestimiento |  |
| 5. Auriculiforme |  |

### Márgenes

#### Fila E:

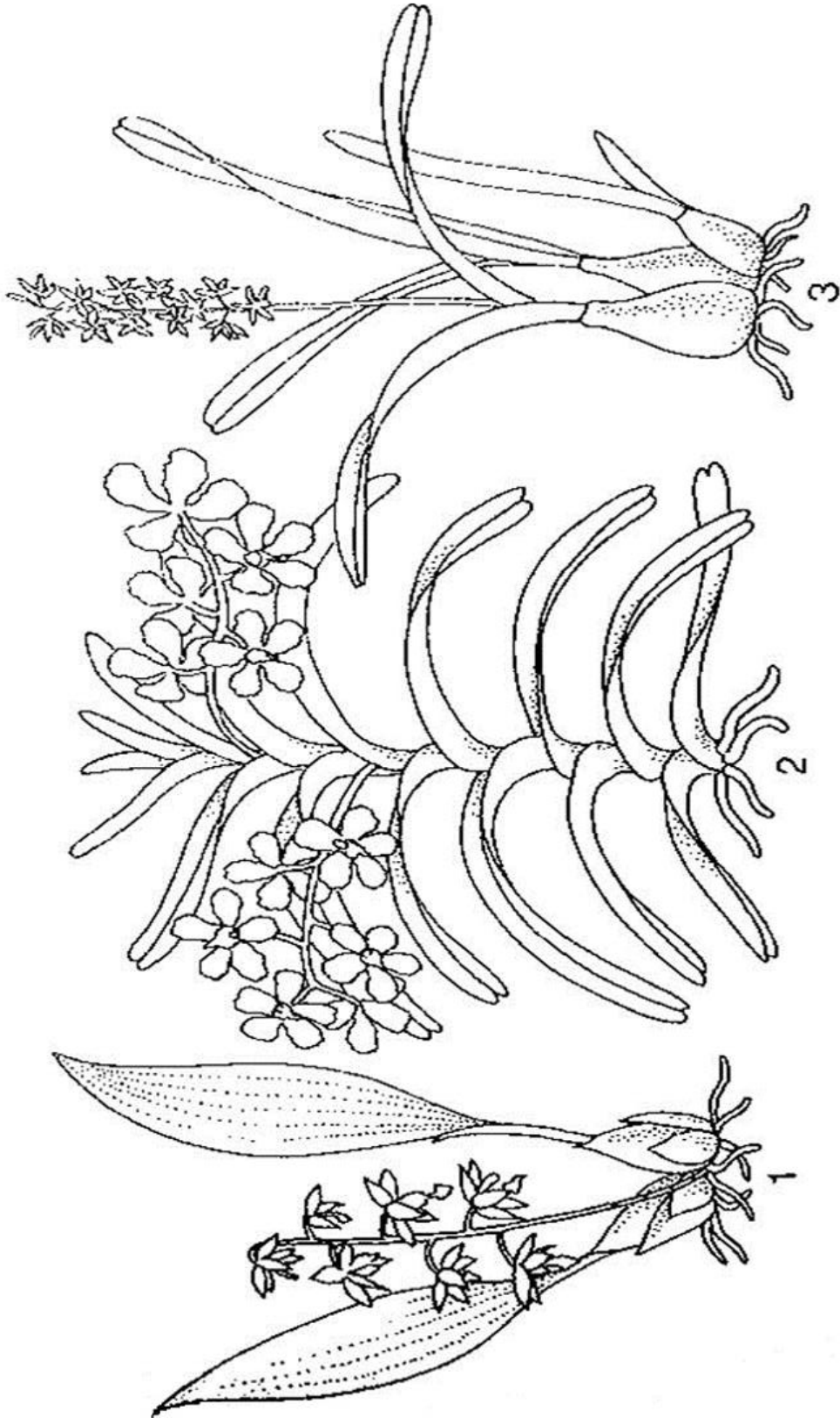
- |  |               |
|--|---------------|
| 1. Obovadas, con una concavidad en cada lado | 5. Espatulado |
| 2. Peltiforme                                | 6. Hendido    |
| 3. Reniforme                                 | 7. Lobulado   |
| 4. Sagitiforme                               | 8. ondulado.  |

#### Fila F:

- |                                    |                           |
|------------------------------------|---------------------------|
| 1. Crenado                         | 5. Aserrado               |
| 2. Dentado                         | 6. Sinuoso                |
| 3. Entero                          | 7. Superposición entre sí |
| 4. Irregular con muescas o dentada | 8. Imbricados             |

**Anexo 4**

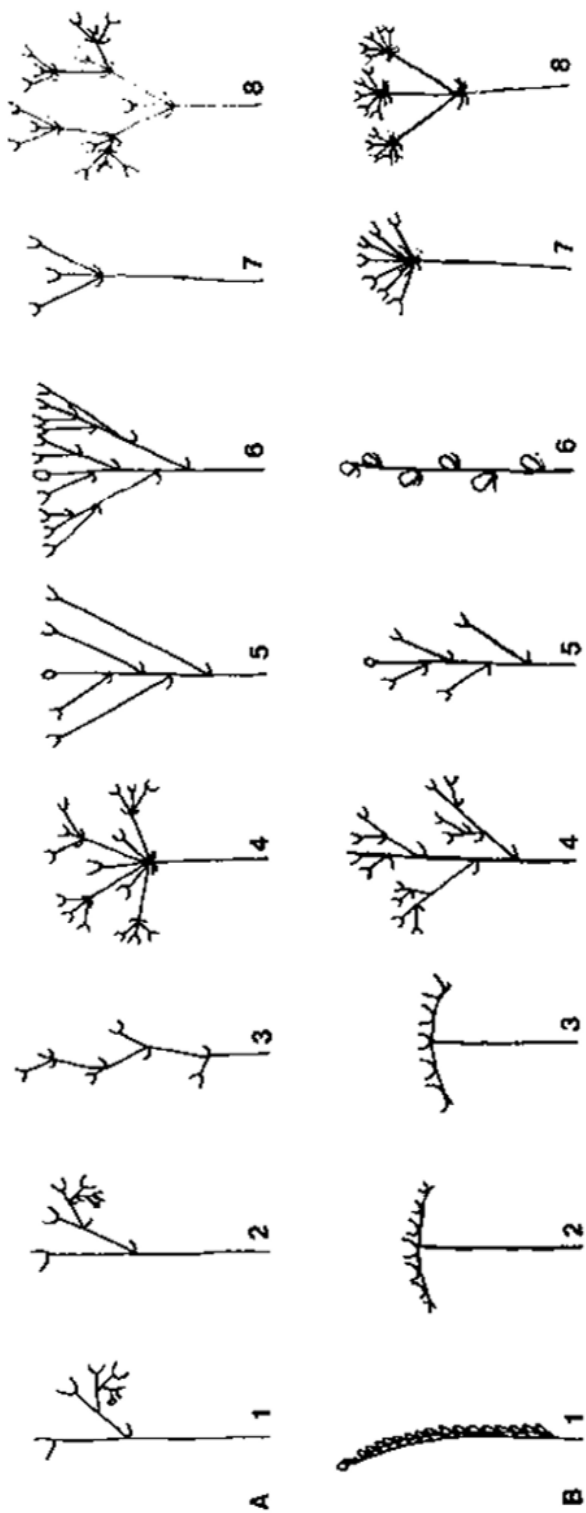
**Origen de la inflorescencia**



**1. Basal, 2. Axilar, 3. Apical**

**Freuler, 2011.**

**Tipos de inflorescencias**



**Fila A:**

1. Cima circinada
2. Cima helicoides
3. Cima curvas o circinada al final
4. Cima compuesta
5. Convexa simple
6. Convexa compuesta
7. Cima bipar simple
8. Cima bipar compuesta

**Fila B:**

1. Espiguillas
2. Cabeza determinada
3. Cabeza indeterminada
4. Panícula
5. Racimo
6. Espiga
7. Sombrilla simple
8. Sombrilla compuesta

**Burns, 1989.**

## Anexo 6

<b>Composición del medio de cultivo Murashige &amp; Skoog (MS) al 100%</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>FORMULA</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>
<b>CONSTITUYENTES INORGANICOS</b>		
<b>Macronutrientes para MS sin Ca</b>		
<b>Sulfato de magnesio</b>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
<b>Nitrato de amonio</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Fosfato ácido de potasio</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Nitrato de potasio</b>	KNO <sub>3</sub>	1900
<b>Solución de Ca</b>		
<b>Cloruro de calcio</b>	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
<b>Micronutrientes sin Fe</b>		
<b>Sulfato de zinc</b>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
<b>Ácido bórico</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
<b>Sulfato de manganeso</b>	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.3
<b>Molibdato de sodio</b>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
<b>Yoduro de potasio</b>	KI	0.83
<b>Solución de Fe</b>		
<b>Cloruro de cobalto</b>	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Sulfato de cobre</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
<b>CONSTITUYENTES ORGANICOS</b>		
<b>Vitaminas</b>		
<b>Tiamina</b>	HCl (B1)	0.4
<b>Niacina</b>		0.5
<b>Piridoxina</b>	HCl (B6)	0.1
<b>Myo-Inositol</b>		100
<b>Carbohidratos</b>		
<b>Sacarosa</b>		30,000.00
<b>Preparaciones naturales complejas</b>		
<b>Gerber de plátano</b>		20,000.00
<b>Materiales inertes y de soporte</b>		
<b>Agar-Gel</b>		5,000.00
<b>Carbón activado</b>		1,000.00

**Anexo 7**

<b>Composición del medio de cultivo Kao &amp; Michayluk (KM) al 100%</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>FORMULA</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>
<b>CONSTITUYENTES INORGANICOS</b>		
<b>Macronutrientes para KM sin Ca</b>		
<b>Sulfato de magnesio</b>	MgSO <sub>4</sub>	146.55
<b>Nitrato de amonio</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	600
<b>Fosfato ácido de potasio</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Nitrato de potasio</b>	KNO <sub>3</sub>	190
<b>Cloruro de potasio</b>	KCl	300
<b>Solución de Ca</b>		
<b>Cloruro de calcio</b>	CaCl <sub>2</sub>	453
<b>Micronutrientes sin Fe</b>		
<b>Sulfato de zinc</b>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2
<b>Ácido bórico</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
<b>Sulfato de manganeso</b>	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10
<b>Molibdato de sodio</b>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
<b>Yoduro de potasio</b>	KI	0.75
<b>Cloruro de cobalto</b>	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Sulfato de cobre</b>	CuSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Solución de Fe</b>		
<b>EDTA sódico</b>	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37.3
<b>Sulfato ferroso</b>	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
<b>CONSTITUYENTES ORGANICOS</b>		
<b>Vitaminas</b>		
<b>Tiamina</b>	HCl (B1)	0.4
<b>Niacina</b>		0.5
<b>Piridoxina</b>	HCl (B6)	0.1
<b>Myo-Inositol</b>		100
<b>Carbohidratos</b>		
<b>Sacarosa</b>		30,000.00
<b>Preparaciones naturales complejas</b>		
<b>Gerber de plátano</b>		20,000.00
<b>Materiales inertes y de soporte</b>		
<b>Agar-Gel</b>		5,000.00
<b>Carbón activado</b>		1,000.00



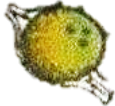








## Anexo 8

<b>Composición del medio de cultivo Peters 24:8:16 al 100%</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>FORMULA</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>
<b>CONSTITUYENTES INORGANICOS</b>		
<b>Fertilizante</b>		
<b>Peters</b>	24:8:16	5,000.0
<b>Contenido</b>		
<b>Nitrógeno Total (N)</b>		1200.0
<b>Amoniacal</b>		270.0
<b>Nitrato</b>		240.0
<b>Urea</b>		700.0
<b>Fosfato disponible (P205)</b>		400.0
<b>Potasio soluble (K2O)</b>		800.0
<b>Magnesio total (Mg)</b>		20.0
<b>Azufre (S)</b>		235.0
<b>Boro (B)</b>		0.17
<b>Cobre (Cu)</b>		1.0
<b>Manganeso quelado (Mn)</b>		1.0
<b>Molibdeno (Mo)</b>		0.045
<b>Zinc (Zn)</b>		10
<b>CONSTITUYENTES ORGANICOS</b>		
<b>Vitaminas</b>		
<b>Tiamina</b>	HCl (B1)	0.4
<b>Niacina</b>		0.5
<b>Piridoxina</b>	HCl (B6)	0.1
<b>Myo-Inositol</b>		100
<b>Carbohidratos</b>		
<b>Sacarosa</b>		30,000.00
<b>Preparaciones naturales complejas</b>		
<b>Gerber de plátano</b>		20,000.00
<b>Materiales inertes y de soporte</b>		
<b>Agar-Gel</b>		5,000.00
<b>Carbón activado</b>		1,000.00

Romero, 2008.

**Anexo 9**

Estadios de germinación para orquídeas		
Estadio	Característica	Esquema
0	Semillas con embrión	
1	Semilla germinando	
2	Embrión hinchado rompiendo la testa	
3	Protocormo con rizoides	
4	Protocormo con brote apical	
5	Plántula con hojas iniciales	
6	Plántula con hojas y raíz	
7	Plántula con raíces	
8	Plántula con raíz y pseudobulbo	

Estadios descritos para las semillas de orquídeas durante el proceso de germinación (adaptado de Johnson & Kane, 2007; Seaton & Ramsay 2005).

## Anexo 10

- **Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de *Dichaea glauca*.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	60728.4	40	1518.21	1094.94	0.0000
B:Medios	134.656	1	134.656	97.11	0.0000
RESIDUOS	55.4629	40	1.38657		
TOTAL (CORREGIDO)	60918.5	81			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias de germinación por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	2	0	0.832638	X
14	2	0	0.832638	X
21	2	0	0.832638	X
28	2	0	0.832638	X
35	2	0	0.832638	X
42	2	0	0.832638	X
49	2	0	0.832638	X
56	2	11.835	0.832638	X
63	2	22.335	0.832638	X
70	2	38.17	0.832638	X
77	2	52.17	0.832638	X
84	2	67.0	0.832638	X
91	2	67.0	0.832638	X
98	2	69.335	0.832638	X
105	2	69.335	0.832638	X
112	2	69.335	0.832638	X
119	2	69.335	0.832638	X
126	2	69.335	0.832638	X
133	2	69.335	0.832638	X
140	2	69.335	0.832638	X
147	2	69.335	0.832638	X
154	2	69.335	0.832638	X
161	2	69.335	0.832638	X
168	2	69.335	0.832638	X
175	2	69.335	0.832638	X
182	2	69.335	0.832638	X
189	2	69.335	0.832638	X
196	2	69.335	0.832638	X
203	2	69.335	0.832638	X
210	2	69.335	0.832638	X
217	2	69.335	0.832638	X
224	2	69.335	0.832638	X
231	2	69.335	0.832638	X
238	2	69.335	0.832638	X
245	2	69.335	0.832638	X
252	2	69.335	0.832638	X
259	2	69.335	0.832638	X
266	2	69.335	0.832638	X
273	2	69.335	0.832638	X
280	2	69.335	0.832638	X
287	2	69.335	0.832638	X

- Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias de germinación por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MS	41	52.3744	0.183899	X
KM	41	54.9373	0.183899	X

## **Anexo 11**

- **Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de *Jacquinilla equitantifolia***

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	69121.3	40	1728.03	81290.72	0.0000
B:Medios	4.64195	1	4.64195	218.37	0.0000
RESIDUOS	0.850298	40	0.0212574		
TOTAL (CORREGIDO)	69126.8	81			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias de germinación por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	2	0	0.103096	X
14	2	0	0.103096	X
21	2	0	0.103096	X
28	2	16.42	0.103096	X
35	2	33.415	0.103096	X
42	2	59.83	0.103096	X
49	2	80.17	0.103096	X
56	2	92.0	0.103096	X
63	2	97.08	0.103096	X
70	2	97.08	0.103096	X
77	2	97.08	0.103096	X
84	2	97.08	0.103096	X
91	2	97.08	0.103096	X
98	2	97.08	0.103096	X
105	2	97.08	0.103096	X
112	2	97.08	0.103096	X
119	2	97.08	0.103096	X
126	2	97.08	0.103096	X
133	2	97.08	0.103096	X
140	2	97.08	0.103096	X
147	2	97.08	0.103096	X
154	2	97.08	0.103096	X
161	2	97.08	0.103096	X
168	2	97.08	0.103096	X
175	2	97.08	0.103096	X
182	2	97.08	0.103096	X
189	2	97.08	0.103096	X
196	2	97.08	0.103096	X
203	2	97.08	0.103096	X
210	2	97.08	0.103096	X
217	2	97.08	0.103096	X
224	2	97.08	0.103096	X
231	2	97.08	0.103096	X
238	2	97.08	0.103096	X
245	2	97.08	0.103096	X
252	2	97.08	0.103096	X
259	2	97.08	0.103096	X
266	2	97.08	0.103096	X
273	2	97.08	0.103096	X
280	2	97.08	0.103096	X
287	2	97.08	0.103096	X

- Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias de germinación por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>MS</b>	41	84.7737	0.02277	X
<b>KM</b>	41	85.2495	0.02277	X

## Anexo 12

- **Análisis de varianza para el desarrollo ontogénico de *Dichaea glauca*.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	772.176	40	19.3044	159.67	0.0000
B:Medios	1.3884	1	1.3884	11.48	0.0016
RESIDUOS	4.83605	40	0.120901		
TOTAL (CORREGIDO)	778.4	81			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del desarrollo ontogénico por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	2	0	0.245867	X
14	2	0	0.245867	X
21	2	0	0.245867	X
28	2	0	0.245867	X
35	2	0	0.245867	X
42	2	0	0.245867	X
49	2	0	0.245867	X
56	2	1.0	0.245867	X
63	2	1.5	0.245867	XX
70	2	2.0	0.245867	X
77	2	3.0	0.245867	X
84	2	3.5	0.245867	XX
91	2	3.5	0.245867	XX
98	2	3.5	0.245867	XX
105	2	4.0	0.245867	XX
112	2	4.5	0.245867	X
119	2	4.5	0.245867	X
126	2	5.5	0.245867	X
133	2	5.5	0.245867	X
140	2	6.0	0.245867	XX
147	2	6.335	0.245867	XX
154	2	7.0	0.245867	XX
161	2	7.0	0.245867	XX
168	2	7.5	0.245867	XX
175	2	7.5	0.245867	XX
182	2	7.5	0.245867	XX
189	2	7.5	0.245867	XX
196	2	8.0	0.245867	X
203	2	8.0	0.245867	X
210	2	8.0	0.245867	X
217	2	8.0	0.245867	X
224	2	8.0	0.245867	X
231	2	8.0	0.245867	X
238	2	8.0	0.245867	X
245	2	8.0	0.245867	X
252	2	8.0	0.245867	X
259	2	8.0	0.245867	X
266	2	8.0	0.245867	X
273	2	8.0	0.245867	X
280	2	8.0	0.245867	X
287	2	8.0	0.245867	X

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias de desarrollo ontogénico por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>MS</b>	41	5.0	0.0543029	×
<b>KM</b>	41	5.26024	0.0543029	×



## **Anexo 13**

- **Análisis de varianza para el desarrollo ontogénico de *Jacqiniella equitantifolia***

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	523.69	40	13.0923	602.24	0.0000
B:Medios	0.021572	1	0.021572	0.99	0.3252
RESIDUOS	0.869578	40	0.0217395		
TOTAL (CORREGIDO)	524.582	81			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del desarrollo ontogénico por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	2	0	0.104258	X
14	2	0	0.104258	X
21	2	0	0.104258	X
28	2	1.0	0.104258	X
35	2	2.0	0.104258	X
42	2	3.0	0.104258	X
49	2	3.0	0.104258	X
56	2	3.0	0.104258	X
63	2	3.0	0.104258	X
70	2	4.0	0.104258	X
77	2	4.0	0.104258	X
84	2	4.165	0.104258	X
91	2	5.0	0.104258	X
98	2	5.0	0.104258	X
105	2	5.0	0.104258	X
112	2	5.0	0.104258	X
119	2	5.5	0.104258	X
126	2	6.0	0.104258	X
133	2	6.0	0.104258	X
140	2	6.0	0.104258	X
147	2	6.0	0.104258	X
154	2	6.0	0.104258	X
161	2	6.165	0.104258	X
168	2	6.665	0.104258	X
175	2	7.5	0.104258	X
182	2	8.0	0.104258	X
189	2	8.0	0.104258	X
196	2	8.0	0.104258	X
203	2	8.0	0.104258	X
210	2	8.0	0.104258	X
217	2	8.0	0.104258	X
224	2	8.0	0.104258	X
231	2	8.0	0.104258	X
238	2	8.0	0.104258	X
245	2	8.0	0.104258	X
252	2	8.0	0.104258	X
259	2	8.0	0.104258	X
266	2	8.0	0.104258	X
273	2	8.0	0.104258	X
280	2	8.0	0.104258	X
287	2	8.0	0.104258	X

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias de desarrollo ontogénico por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
KM	41	5.6178	0.0230267	X
MS	41	5.65024	0.0230267	X

## Anexo 14

- **Análisis de varianza para el índice de desarrollo de *Dichaea glauca*.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	2.13919E6	40	53479.6	55.52	0.0000
B:Medios	65131.9	1	65131.9	67.61	0.0000
RESIDUOS	38533.0	40	963.325		
TOTAL (CORREGIDO)	2.24285E6	81			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del Índice de desarrollo por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homógenos</i>
7	2	-1.64846E-12	21.9468	X
14	2	0	21.9468	X
21	2	0	21.9468	X
28	2	0	21.9468	X
35	2	0	21.9468	X
42	2	0	21.9468	X
49	2	0	21.9468	X
56	2	100.0	21.9468	X
63	2	125.67	21.9468	X
70	2	134.68	21.9468	XX
77	2	158.06	21.9468	XXX
84	2	196.33	21.9468	XXX
91	2	209.685	21.9468	XXX
98	2	219.15	21.9468	XXX
105	2	229.39	21.9468	XX
112	2	257.0	21.9468	XXX
119	2	267.975	21.9468	XXX
126	2	312.75	21.9468	XXX
133	2	320.235	21.9468	XXX
140	2	332.67	21.9468	XXX
147	2	347.245	21.9468	XXXX
154	2	359.86	21.9468	XXXXX
161	2	364.185	21.9468	XXXXXX
168	2	368.425	21.9468	XXXXXX
175	2	380.22	21.9468	XXXXXX
182	2	390.795	21.9468	XXXXXX
189	2	396.76	21.9468	XXXXXX
196	2	406.755	21.9468	XXXXXX
203	2	412.96	21.9468	XXXX
210	2	423.21	21.9468	XXX
217	2	432.61	21.9468	XX
224	2	437.49	21.9468	XX
231	2	441.29	21.9468	XX
238	2	443.255	21.9468	X
245	2	443.745	21.9468	X
252	2	443.745	21.9468	X
259	2	443.745	21.9468	X
266	2	443.745	21.9468	X
273	2	443.745	21.9468	X
280	2	443.745	21.9468	X
287	2	443.745	21.9468	X

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del Índice de desarrollo por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>MS</b>	41	254.131	4.84724	X
<b>KM</b>	41	310.497	4.84724	X

## Anexo 15

- **Análisis de varianza para el índice de desarrollo de *Jacquiniella equitantiifolia***

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	5.29321E6	40	132330.	5785.92	0.0000
B:Medios	0.0435622	1	0.0435622	0.00	0.9654
RESIDUOS	914.842	40	22.8711		
TOTAL (CORREGIDO)	5.29412E6	81			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del Índice de desarrollo por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	2	0	3.38165	X
14	2	0	3.38165	X
21	2	0	3.38165	X
28	2	100.0	3.38165	X
35	2	135.92	3.38165	X
42	2	154.875	3.38165	X
49	2	162.575	3.38165	XX
56	2	170.655	3.38165	X
63	2	170.13	3.38165	X
70	2	200.08	3.38165	X
77	2	232.53	3.38165	X
84	2	256.815	3.38165	X
91	2	283.35	3.38165	X
98	2	318.37	3.38165	X
105	2	353.73	3.38165	X
112	2	373.215	3.38165	X
119	2	406.925	3.38165	X
126	2	437.93	3.38165	X
133	2	450.285	3.38165	X
140	2	464.455	3.38165	X
147	2	479.14	3.38165	X
154	2	486.18	3.38165	X
161	2	514.425	3.38165	X
168	2	529.79	3.38165	X
175	2	582.575	3.38165	X
182	2	607.825	3.38165	X
189	2	637.605	3.38165	X
196	2	661.215	3.38165	X
203	2	699.155	3.38165	X
210	2	712.105	3.38165	X
217	2	718.71	3.38165	XX
224	2	728.235	3.38165	X
231	2	738.45	3.38165	X
238	2	747.71	3.38165	X
245	2	760.79	3.38165	X
252	2	763.925	3.38165	X
259	2	766.68	3.38165	X
266	2	767.875	3.38165	X
273	2	767.875	3.38165	X
280	2	767.875	3.38165	X
287	2	767.875	3.38165	X

- Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del índice de desarrollo por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>MS</b>	41	460.412	0.746881	X
<b>KM</b>	41	460.459	0.746881	X

## **Anexo 16**

- **Análisis de varianza para el crecimiento de *Dichaea glauca*.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	778.688	7	111.241	33.95	0.0000
B:Medios	67.4131	2	33.7065	10.29	0.0000
RESIDUOS	1540.14	470	3.27689		
TOTAL (CORREGIDO)	2386.24	479			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del crecimiento por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	60	0	0.233698	X
14	60	0.639333	0.233698	XX
21	60	0.633667	0.233698	XX
28	60	0.9735	0.233698	X
35	60	2.8625	0.233698	X
42	60	2.77317	0.233698	X
56	60	2.8795	0.233698	X
49	60	3.56267	0.233698	X

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del crecimiento por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MS 50%	160	1.39475	0.14311	X
Pet 12%	160	1.68319	0.14311	X
KM 50%	160	2.29369	0.14311	X

## **Anexo 17**

- **Análisis de varianza para el crecimiento de *Jacquinilla equitantifolia***

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	2658.39	7	379.77	59.31	0.0000
B:Medios	52.703	2	26.3515	4.12	0.0169
RESIDUOS	3009.53	470	6.40325		
TOTAL (CORREGIDO)	5720.62	479			

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del crecimiento por tiempo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	60	0	0.326682	X
21	60	2.89417	0.326682	X
28	60	2.66217	0.326682	X
42	60	2.86467	0.326682	X
35	60	3.003	0.326682	XX
14	60	3.8165	0.326682	X
49	60	6.07167	0.326682	X
56	60	8.39783	0.326682	X

- **Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias del crecimiento por medio nutritivo son significativamente diferentes de otras.**

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>Pet 12%</b>	160	3.35194	0.200051	X
<b>KM 50%</b>	160	3.63675	0.200051	XX
<b>MS 50%</b>	160	4.15256	0.200051	X



## **Anexo 18**

### **Protocolo de cultivo *in vitro* para *Dichaea glauca***

#### **Colecta y transporte**

Es recomendable coleccionar el material biológico en los meses de noviembre a diciembre.

Para transportar las cápsulas se deben colocar de manera individual en sobres de papel y cubrirlos con deshumidificante, con la finalidad de absorber la humedad y evitar la proliferación de hongos.

#### **Desinfestación de las cápsulas**

Lavar la cápsula, con ayuda de un cepillo y jabón, bajo el chorro de agua corriente, para posteriormente ser llevada a condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar previamente desinfectada con hipoclorito de sodio y etanol al 70%.

Iniciar el proceso de desinfestación sumergiéndola en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% y una gota de jabón líquido (para romper la tensión superficial) durante 15 minutos, para después enjuagarla con agua destilada estéril hasta eliminar los rastros de jabón. Acto seguido debe ser sumergida en etanol al 70% e inmediatamente pasarla por la flama (el etanol tiene que consumirse en su totalidad hasta apagarse). Con ayuda de una caja de Petri y una navaja de bisturí se realizan cortes que dejan expuestas las semillas listas para su siembra.

#### **Siembra de semillas**

Con pinzas y agujas de disección, colocar una muestra de semillas en los frascos con medio de cultivo KM 50% con respecto a las sales inorgánicas, adicionado con  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de niacina,  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de piridoxina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de myo-inositol,  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa,  $5 \text{ gL}^{-1}$  de agar gel,  $1 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado y suplementado con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de papilla de plátano Gerber®.

#### **Desinfestación de las semillas**

Se elaboran sobres de papel filtro, donde se colocarán con ayuda de una aguja de disección un aproximado de 200 semillas, para posteriormente ser asegurados con un clip. Se colocan en un vaso de precipitados con agua destilada para permitir que estos se humedezcan y así poder eliminar las burbujas de aire que pudieran tener, y se inicia el proceso de desinfestación, para ello se transfieren a etanol al 70% durante 5 minutos, transcurrido el tiempo, se mueven a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% y una gota de jabón líquido durante 15 minutos. Para concluir, enjuagar tres veces con agua destilada estéril. Todo este procedimiento se maneja en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar previamente desinfectada con hipoclorito de sodio y etanol al 70%.

### **Siembra de semillas**

Concluida la desinfestación, se retira el clip de los sobres, para introducirlos en los frascos con medio de cultivo KM 50% con respecto a las sales inorgánicas, adicionado con  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de niacina,  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de piridoxina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de myo-inositol,  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa,  $5 \text{ gL}^{-1}$  de agar gel,  $1 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado y suplementados con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de papilla de plátano Gerber®. Se extienden los sobres para que las semillas queden expuestas y en contacto con el medio.

### **Para después de la siembra**

Una vez terminada la siembra, los frascos con semillas, se colocan en la sala de incubación a una temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y a una intensidad luminosa de 1076.39 lux. Después de 168 días de cultivo es necesario subcultivar e individualizar las plántulas en medio nutritivo Kao & Michayluk fresco con las características antes mencionadas donde deben permanecer al menos un periodo de 60 días o más antes de ser llevadas a *ex vitro*.

## **Anexo 19**

### **Protocolo de cultivo *in vitro* para *Jacquiniella equitantifolia***

#### **Colecta y transporte**

Es recomendable coleccionar el material biológico en los meses de noviembre a diciembre.

Para transportar las cápsulas se deben colocar de manera individual en sobres de papel y cubrirlos con deshumidificante, con la finalidad de absorber la humedad y evitar la proliferación de hongos.

#### **Desinfestación de las cápsulas**

Lavar la cápsula, con ayuda de un cepillo y jabón, bajo el chorro de agua corriente, para posteriormente ser llevada a condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar, previamente desinfectada con hipoclorito de sodio y etanol al 70%.

Iniciar el proceso de desinfestación sumergiéndola en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% y una gota de jabón líquido (para romper la tensión superficial) durante 15 minutos, para después enjuagarla con agua destilada estéril hasta eliminar los rastros de jabón. Acto seguido debe ser sumergida en etanol al 70% e inmediatamente pasarla por la flama (el etanol tiene que consumirse en su totalidad hasta apagarse). Con ayuda de una caja de Petri y una navaja de bisturí se realizan cortes que dejan expuestas las semillas listas para su siembra.

#### **Siembra de semillas**

Con pinzas y agujas de disección, colocar una muestra de semillas en los frascos con medio de cultivo KM 50% con respecto a las sales inorgánicas, adicionado con  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de niacina,  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de piridoxina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de myo-inositol,  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa,  $5 \text{ gL}^{-1}$  de agar gel,  $1 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado y suplementado con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de papilla de plátano Gerber®.

#### **Desinfestación de las semillas**

Se elaboran sobres de papel filtro donde se colocarán, con ayuda de una aguja de disección, un aproximado de 200 semillas, para posteriormente ser asegurados con un clip. Se colocan en un vaso de precipitados con agua destilada para permitir que estos se humedezcan y así poder eliminar las burbujas de aire que pudieran tener, y se inicia el proceso de desinfestación, para ello se transfieren a etanol al 70% durante 5 minutos, transcurrido el tiempo, se mueven a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% y una gota de jabón líquido durante 15 minutos. Para concluir, enjuagar tres veces con agua destilada estéril. Todo este procedimiento se maneja en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar previamente desinfectada con hipoclorito de sodio y etanol al 70%.

### **Siembra de semillas**

Concluida la desinfestación, se retira el clip de los sobres, para introducirlos en los frascos con medio de cultivo KM 50% con respecto a las sales inorgánicas, adicionado con  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de niacina,  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de piridoxina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de myo–inositol,  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa,  $5 \text{ gL}^{-1}$  de agar gel,  $1 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado y suplementados con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de papilla de plátano Gerber®. Se extienden los sobres para que las semillas queden expuestas y en contacto con el medio.

### **Para después de la siembra**

Una vez terminada la siembra, los frascos con semillas, se colocan en la sala de incubación a una temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y a una intensidad luminosa de 1076.39 lux. Después de 63 días de cultivo es necesario subcultivar e individualizar las plántulas en medio nutritivo Murashige & Skoog fresco adicionado con  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de niacina,  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de piridoxina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de myo–inositol,  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa,  $5 \text{ gL}^{-1}$  de agar gel,  $1 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado y suplementados con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de papilla de plátano Gerber®. Donde deben permanecer al menos un periodo de 60 días o más antes de ser llevadas a *ex vitro*.

### **Aclimatización**

Las plantas de *Jacquniella equitantifolia* se adaptan exitosamente a condiciones *ex vitro* en mezcla de corteza de pino-encino + fibra de coco (2:1).

México D. F., 12 de febrero de 2018



**Herbario  
AMO**

A quien corresponda:

Por medio de la presente el **Herbario AMO** otorga autorización para que la Pas. de Biól. **Lizbeth Janet Romero Aguilar**, alumna de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Autónoma de México, con número de Matricula 30719259-6 utilice la ilustración de *Jaquiniella equitantifolia*, realizada por Rolando Jiménez Machorro, en la tesis titulada “**Germinación, desarrollo *in vitro* y aclimatización de: *Dichaea glauca* (Sw.) Lindl. y *Jaquiniella equitantifolia* (Ames) Dressler (Orchidaceae)**” misma que servirá para obtener el título de biólogo en la Facultad antes mencionada.

Atentamente,

---

Eric Hágsater

Director

**Montañas Calizas # 490,  
Colonia Lomas de Chapultepec, Delegación Miguel Hidalgo, C. P. 11000. Ciudad de México,  
MEXICO.  
Tel. (52) 52 62 31 93  
Tel & Fax. (52) 55 20 78 60  
E-mail: [herbamo@prodigy.net.mx](mailto:herbamo@prodigy.net.mx)**