



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Efecto de extractos de origen fúngico en la germinación
asimbiótica *in vitro* de *Guarianthe aurantiaca* (Bateman ex Lindl.)
Dressler et W. E. Higgins y *Euchile mariae* (Ames) Withner x
Euchile citrina (La Llave et Lexarza) Withner (Orchidaceae).”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

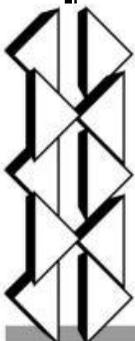
B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

NORMA ZARAGOZA DOMÍNGUEZ

DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. BARBARA SUSANA LUNA ROSALES

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE DE 2013.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Efecto de extractos de origen fúngico en la germinación
asimbiótica *in vitro* de *Guarianthe aurantiaca* (Bateman ex Lindl.)
Dressler et W. E. Higgins y *Euchile mariae* (Ames) Withner x
Euchile citrina (La Llave et Lexarza) Withner (Orchidaceae).”

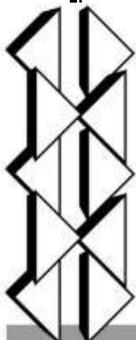
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

NORMA ZARAGOZA DOMÍGUEZ



**FES
ZARAGOZA**

DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. BARBARA SUSANA LUNA ROSALES

MÉXICO, D. F., NOVIEMBRE DE 2013.

DEDICATORIA

- ☾★ *A Dios, por la vida que me dio, porque nunca me ha abandonado y permitirme lograr un triunfo más.*
- ☾★ *A mis padres Froylán Zaragoza E. y Amalia Domínguez E. †, por darme la vida, por ser mi fuente de inspiración, el motor de mi vida por todo el amor y esfuerzo invertidos para alcanzar mis metas.*
¡GRACIAS POR SIEMPRE!
- ☾★ *A mis hermanos Antonio, Froylán y Jorge por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por el cariño, las discusiones, las alegrías y por mostrarme mis virtudes, errores y defectos.*



AGRADECIMIENTOS

- *A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por brindarme los conocimientos para una excelente formación profesional.*
- *Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez, que siempre estuvo presente para apoyarme, por confiar en mí, brindarme su atención para resolver dudas, enriquecer y mejorar mi tesis. ¡GRACIAS! †*
- *A mi directora de tesis, M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, por la confianza y la asesoría otorgada durante el desarrollo de este proyecto.*
- *A la M. en C. Balbina Vázquez Benitez, por enriquecer este proyecto con su aporte académico este trabajo.*
- *Al Biol. Juan Romero Arredondo, por las observaciones y apoyo brindado en la elaboración de esta tesis.*
- *Agradezco a la M. en C. Florencia Becerril Cruz por brindarme todo su apoyo incondicional.*
- *Agradezco a la Dra. Hortensia Rosas Acevedo por las observaciones para el mejoramiento de esta tesis.*
- *A mi familia, padres y hermanos por impulsarme a superar los obstáculos.*
- *A mis amigos Norma Matias, Adriana, Laura, Viridiana, Jacqueline Velasco, Ipanema, Jacqueline Alejandra, Ana Isabel, Lorena, Yazmin, Enrique, Rodrigo y a todos los que no alcance a mencionar pero vivimos tantas experiencias juntos. Gracias.*
- *Agradezco a los profesores; Armando Cervantes, Paty, Isaías Hazarmabeth, Ángeles, Gerardo, Ffrain, Montoya, Genaro, María de Jesús † y a todos los presentes a lo largo de la carrera, gracias por las atenciones recibidas y mi formación profesional.*
- *A los que siempre creyeron en mí y me estuvieron apoyando en todo momento Rubén, Alicia, Ángel, Mago, Moisés, Marcos, Graciela, Mateo y Abraham.*



ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
1. FORMAS DE VIDA	2
2. MORFOLOGÍA	2
3. PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	5
4. MICORRIZAS Y ORQUÍDEAS	6
4.1. GERMINACIÓN	7
4.1.1. GERMINACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMBIÓTICA	7
4.1.2. DURACIÓN DE LA GERMINACIÓN	9
5. DESARROLLO ONTOGÉNICO	9
6. EL PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA GERMINACIÓN	11
7. EXTRACTOS NATURALES ADICIONADOS AL MEDIO DEL CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN	11
8. HONGOS BASIDIOMICETOS	13
8.1. <i>Agaricus bisporus</i> Lge. Sing (Champiñón)	14
8.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> Jacq. ex Fr. Kummer (Seta)	15
8.3. <i>Ustilago maydis</i> Beckman unger (Huitlacoche)	16
9. ORQUÍDEAS DE ESTUDIO	17
9.1. <i>Guarianthe aurantiaca</i> (Bateman ex Lindl)	17
9.2. <i>Euchile mariae</i> (Ames) Winthner	21
9.3. <i>Euchile citrina</i> (La Llave et Lexarza) Winthner	25
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
MATERIAL Y MÉTODO	33
1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS FÚNGICOS	33
2. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS	34
3. SIEMBRA <i>IN VITRO</i>	38
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
1. DESARROLLO ONTOGÉNICO	40
2. GERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO	41
I.- <i>Guarianthe aurantiaca</i> .	41
1.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Guarianthe aurantiaca</i> en el medio nutritivo “Knudson C”.	41
2.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Guarianthe aurantiaca</i> de la adición de extractos de origen fúngico y sin la presencia del medio nutritivo “Knudson C”	42
3.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Guarianthe aurantiaca</i> de la adición de extractos de origen fúngico al medio nutritivo “Knudson C”.	46
4.- Comportamiento de la germinación de <i>Guarianthe aurantiaca</i> en los 19 tratamientos experimentales en cada día de evaluación.	51
5.- Análisis estadístico <i>Guarianthe aurantiaca</i> .	55
II.- <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> .	61
1.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> con medio nutritivo “Knudson C”.	61
2.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> con la adición de extractos de origen fúngico y sin medio nutritivo “Knudson C”.	61
3.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> con la adición de extractos de origen fúngico al medio nutritivo “Knudson C” durante el periodo de evaluación.	66
4.- Comportamiento de la germinación de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> en los 19 tratamientos experimentales en cada día de evaluación.	71
5.- Análisis estadístico <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	75
3. COMPORTAMIENTO DE LA GERMINACIÓN EN <i>Guarianthe aurantiaca</i> Y EL HÍBRIDO <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> .	81
4. COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO EN <i>Guarianthe aurantiaca</i> Y EL HÍBRIDO <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> .	82
CONCLUSIONES	86



BIBLIOGRAFÍA	87
APÉNDICES	98
APÉNDICE I.- COMPOSICIÓN DEL MEDIO NUTRITIVO “KNUDSON C”	98
APÉNDICE II.- TRATAMIENTOS Y SU NOMENCLATURA	100
APÉNDICE III.- DESARROLLO ONTOGÉNICO DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO	101
APÉNDICE IV.- REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO	102
ANEXOS	109
ANEXO I.- COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LOS HONGOS DE ESTUDIO	109
ANEXO II.- ESTADIOS ONTOGÉNICOS	111
i.- PERMANENCIA (DÍAS) DE LOS ESTADIOS ONTOGÉNICOS POR TRATAMIENTO EN <i>Guarianthe aurantiaca</i> .	111
ii.- PERMANENCIA (DÍAS) DE LOS ESTADIOS ONTOGÉNICOS POR TRATAMIENTO EN <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> .	112
ANEXO III PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO	113
ANEXO IV ANÁLISIS ESTADÍSTICO	114
i.- COMPARACIONES DE LA ESPECIE DE <i>Guarianthe aurantiaca</i> .	114
ii.- COMPARACIONES DE LA ESPECIE DE <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	117

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
CUADRO I.- SECUENCIA DEL PROCESO DE GERMINACIÓN EN ORQUÍDEAS EPÍFITAS	10
CUADRO II.- METODOLOGÍA GENERAL	35
CUADRO III.- MEDIOS DE CULTIVO EXPERIMENTALES	36

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1.- PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS HONGOS DE ESTUDIO.	33
TABLA 2: TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES	37
TABLA 3.- FASES MORFOLÓGICAS EVALUADAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Crecimiento monopodial	2
Figura 2.- Crecimiento simpodial	2
Figura 3.- Raíz de orquídea epífita con velamen	2
Figura 4.- Diferentes tipos de pseudobulbos en orquídeas	3
Figura 5.- Diferentes tipos de hojas en orquídeas	3
Figura 6.- Partes de una orquídea	3
Figura 7.- Diferentes tipos de inflorescencias en las orquídeas	4
Figura 8.- Fruto de orquídea	4
Figura 9.- Semillas de orquídea	4
Figura 10.- <i>Agaricus bisporus</i> (Champiñón)	14
Figura 11.- <i>Pleurotus ostreatus</i> (Seta)	15
Figura 12.- <i>Ustilago maydis</i> (Huitlacoche)	16
Figura 13.- <i>Guarianthe aurantiaca</i>	17



Figura 14.- <i>Guarjanthe aurantiaca</i>	18
Figura 15.- Distribución de <i>Guarjanthe aurantiaca</i>	19
Figura 16.- Morfología de <i>Guarjanthe aurantiaca</i>	20
Figura 17.- <i>Euchile mariae</i>	21
Figura 18.- <i>Euchile mariae</i>	22
Figura 19.- Distribución de <i>Euchile mariae</i>	23
Figura 20.- Morfología de <i>Euchile mariae</i>	24
Figura 21.- <i>Euchile citrina</i>	25
Figura 22.- <i>Euchile citrina</i>	26
Figura 23.- Distribución de <i>Euchile citrina</i>	27
Figura 24.- Morfología de <i>Euchile citrina</i>	28
Figura 25.- Capsula de orquídea	33
Figura 26.- Capsula de orquídea con semillas expuestas	33
Figura 27.- Deshidratación de los hongos	33
Figura 28.- Trituración de los hongos	34
Figura 29.- Preparación de los extractos	34
Figura 30.- Evaluación de la viabilidad	35
Figura 31.- Campana de flujo laminar de aire	38
Figura 32.- Extracción de plantas para trasplante	38
Figura 33.- Trasplante de plantas	38
Figura 34.- Cámara de incubación	39
Figura 35.- Comparación de los tratamientos B,C y D a los 128 días de cultivo	102
Figura 36.- Comparación de los tratamientos P,Q y R a los 128 días de cultivo	102
Figura 37.- Comparación de los tratamientos N,Ñ,O y A(testigo), a los 135días	102
Figura 38.- Comparación de los tratamientos B,C, D y A (testigo) a los 135 días de cultivo	102
Figura 39.- Comparación de los tratamientos N,Ñ,O y A(testigo), a los 135días	103
Figura 40.- Comparación de los tratamientos E,F,G y A(testigo), a los 135días	103
Figura 41.- Comparación de los tratamientos P,Q,R y A(testigo), a los 135días	103
Figura 42.- Comparación de los tratamientos H,I,J y A(testigo), a los 135días	103
Figura 43.- Comparación de los tratamientos A (testigo) K,L y M a los 271 días	104
Figura 44.- Comparación de los tratamientos A (testigo) B,C y D a los 271 días	104
Figura 45.- Comparación de los tratamientos A (testigo) N,Ñ y O a los 271 días	104
Figura 46.- Comparación de los tratamientos A (testigo) E,F y G a los 271 días	104
Figura 47.- Comparación de los tratamientos A (testigo) P,Q y R a los 271 días	105
Figura 48.- Comparación de los tratamientos A (testigo) H,I y J a los 271 días	105
Figura 49.- Comparación de los tratamientos H,P y A(testigo) a los 8 3 días de cultivo	105
Figura 50.- Comparación de los tratamientos K, L, M y A(testigo) a los 128 días de cultivo	105
Figura 51.- Comparación de los tratamientos E,F,G y A (testigo) a los 138 días	106
Figura 52.- Comparación de los tratamientos N,Ñ,O y A (testigo) a los 138 días	106
Figura 53.- Comparación de los tratamientos E,F,G y A (testigo) a los 138 días	106
Figura 54.- Comparación de los tratamientos P,Q, R y A (testigo) a los 138 días	106
Figura 55.- Comparación de los tratamientos H,I,J y A (testigo) a los 138 días	107
Figura 56.- Comparación de los tratamientos A (testigo) K,L y M a los 274 días	107
Figura 57.- Comparación de los tratamientos A (testigo) B,C y D a los 274 días	107
Figura 58.- Comparación de los tratamientos A (testigo) N,Ñ y O a los 274 días	107
Figura 59.- Comparación de los tratamientos A (testigo) E,F y G a los 274 días	108
Figura 60.- Comparación de los tratamientos A (testigo) P,Q y R a los 274 días	108



ÍNDICE DE GRÁFICAS	Pág.
I. <i>Guarlanthe aurantiaca</i>	41
1.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> con medio nutritivo “Knudson C”	41
Gráfica 1. Estados de desarrollo con “Knudson C” (Testigo).	
2.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> con la adición de extractos de origen fúngico y sin medio nutritivo “Knudson C”	42
Gráfica 2. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 5 ml.	42
Gráfica 3. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 10 ml.	42
Gráfica 4. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 15 ml.	43
Gráfica 5. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 5 ml.	44
Gráfica 6. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 10 ml.	44
Gráfica 7. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 15 ml.	44
Gráfica 8. <i>Ustilago maydis</i> concentración 5 ml.	45
Gráfica 9. <i>Ustilago maydis</i> concentración 10 ml.	45
Gráfica 10. <i>Ustilago maydis</i> concentración 15 ml.	45
3.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> con la adición de extractos de origen fúngico al medio nutritivo “Knudson C”, durante el periodo de evaluación.	46
Gráfica 11. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 5 ml.	46
Gráfica 12. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 10 ml.	46
Gráfica 13. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 15 ml.	47
Gráfica 14. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 5 ml.	48
Gráfica 15. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 10 ml.	48
Gráfica 16. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 15 ml.	49
Gráfica 17. <i>Ustilago maydis</i> concentración 5 ml.	49
Gráfica 18. <i>Ustilago maydis</i> concentración 10 ml.	50
Gráfica 19. <i>Ustilago maydis</i> concentración 15 ml.	50
4.- Comportamiento de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> en los 19 tratamientos experimentales	51
Gráfica 20.- Respuesta de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 15.	51
Gráfica 21.- Respuesta de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 27.	51
Gráfica 22.- Respuesta de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 41.	52
Gráfica 23.- Respuesta de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 83.	52
Gráfica 24.- Respuesta de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 137.	53
Gráfica 25.- Respuesta de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 168.	53
Gráfica 26.- Respuesta de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 227.	54
5.- Análisis estadístico de <i>Guarlanthe aurantiaca</i>	55
Gráfica 27.- Comparación de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> y sus 19 tratamientos	55
Gráfica 28.- Estadios de desarrollo en cada tratamiento experimental en la germinación de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> .	55
Gráfica 29.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Agaricus bisporus</i> con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> .	56
Gráfica 30.- Tratamientos con <i>Agaricus bisporus</i> y el testigo.	56
Gráfica 31.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> .	57
Gráfica 32.- Tratamientos con <i>Pleurotus ostreatus</i> y el testigo.	57
Gráfica 33.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Ustilago maydis</i> con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> .	58
Gráfica 34.- Tratamientos con <i>Ustilago maydis</i> y el testigo.	58
Gráfica 35.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Ustilago maydis</i> sin medio nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de <i>Guarlanthe aurantiaca</i> .	59
Gráfica 36.- Tratamientos sin “Knudson C” y el Testigo.	59
Gráfica 37.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Ustilago maydis</i> con medio nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de <i>Guarlanthe aurantiaca</i>	60
Gráfica 38.- Tratamientos con “Knudson C” y el Testigo	60



II.- <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>.	61
1.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> con medio nutritivo “Knudson C”	
Gráfica 39. Estados de desarrollo con “Knudson C” (Testigo).	61
2.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> con la adición de extractos de origen fúngico y sin medio nutritivo “Knudson C”	61
Gráfica 40. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 5 ml.	61
Gráfica 41. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 10 ml.	62
Gráfica 42. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 15 ml.	62
Gráfica 43. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 5 ml.	63
Gráfica 44. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 10 ml.	64
Gráfica 45. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 15 ml.	64
Gráfica 46. <i>Ustilago maydis</i> concentración 5 ml.	65
Gráfica 47. <i>Ustilago maydis</i> concentración 10 ml.	65
Gráfica 48. <i>Ustilago maydis</i> concentración 15 ml.	66
3.- Efecto en la germinación de semillas de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> con la adición de extractos de origen fúngico al medio nutritivo “Knudson C”, durante el periodo de evaluación.	66
Gráfica 49. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 5ml.	66
Gráfica 50. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 10ml.	67
Gráfica 51. <i>Agaricus bisporus</i> concentración 15ml.	67
Gráfica 52. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 5ml.	68
Gráfica 53. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 10ml.	69
Gráfica 54. <i>Pleurotus ostreatus</i> concentración 15ml.	69
Gráfica 55. <i>Ustilago maydis</i> concentración 5ml.	70
Gráfica 56. <i>Ustilago maydis</i> concentración 10ml.	70
Gráfica 57. <i>Ustilago maydis</i> concentración 15ml.	71
4.-Comportamineto de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> en los 19 tratamientos experimentales	71
Gráfica 58.- Respuesta de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 10.	71
Gráfica 59.- Respuesta de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 18.	72
Gráfica 60.- Respuesta de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 30.	72
Gráfica 61.- Respuesta de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 67.	73
Gráfica 62.- Respuesta de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 111.	73
Gráfica 63.- Respuesta de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 136.	74
Gráfica 64.- Respuesta de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y su germinación con 19 tratamientos en el día 230.	75
5.- Análisis estadístico de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	75
Gráfica 65.- Comparación de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> y sus 19 tratamientos	75
Gráfica 66.- Estadios de desarrollo en cada tratamiento experimental en la germinación de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i> .	76
Gráfica 67.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Agaricus bisporus</i> con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	76
Gráfica 68.- Tratamientos con <i>Agaricus bisporus</i> y el testigo.	77
Gráfica 69.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	77
Gráfica 70.- Tratamientos con <i>Pleurotus ostreatus</i> y el testigo.	77
Gráfica 71.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Ustilago maydis</i> con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	78
Gráfica 72.- Tratamientos con <i>Ustilago maydis</i> y el testigo.	78
Gráfica 73.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Ustilago maydis</i> sin medio nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	79
Gráfica 74.- Tratamientos sin Knudson C y el Testigo.	79
Gráfica 75.- Comparación del efecto de los extractos de <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Ustilago maydis</i> con medio nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de <i>Euchile mariae</i> x <i>Euchile citrina</i>	80
Gráfica 76.- Tratamientos con “Knudson C” y el Testigo	80



RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo conocer el desarrollo morfológico *in vitro* desde la germinación de la semilla hasta la formación de una planta completa de la especie de orquídea *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*. Se evaluaron 18 tratamientos de medios de cultivo experimentales para la inducción de la germinación asimbiótica con extractos de origen fúngico y un testigo con el medio nutritivo “Knudson C”.

El material biológico que se utilizó fueron semillas *G. aurantiaca* y *E. mariae* x *E. citrina* provenientes de la colección de orquídeas endémicas de México de la FES-Zaragoza, UNAM. Se evaluó la viabilidad con la técnica del cloruro de trifenil tetrazolio (TTC).

Los medios de cultivo experimentales estuvieron compuestos por extractos de los hongos *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis*, cada uno en tres concentraciones, así también se prepararon otros medios experimentales con los mismos extractos pero estos adicionados con las sales basales de “Knudson (C)”. Se sembraron las semillas en estos medios experimentales y se llevaron a cabo registros semanales de la germinación y desarrollo de las plantas durante 230 días. Se registraron los cambios morfológicos divididos en nueve fases o estadios ontogénicos. Se analizaron estadísticamente los datos obtenidos con Statgraphics plus 5.1. para la obtención del Análisis de Varianza y prueba de Fisher.

Aun cuando en el presente estudio hubo diferencias estadísticas significativas, las semillas de los dos tipos de ejemplares estudiados presentaron un mejor desarrollo en los medios de cultivo con extracto de origen fúngico adicionados con las sales minerales de “Knudson C”, ya que sin la adición de éstas, fue menor su desarrollo..

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son plantas herbáceas, monocotiledóneas y cosmopolitas. Los miembros de la familia Orchidaceae comprenden más de 900 géneros y es una de las familias más diversas de plantas con flores. Ocupan un amplio rango de hábitats, presentan estructuras y características fisiológicas altamente especializadas (Caneva, 1978; Dressler, 1981; Yu y Goh, 2001). Existen cerca de 30,000 especies de orquídeas (Hágsater, *et al.*, 2005). Una de sus características más sobresalientes es la alta proporción de especies endémicas, ya que se han registrado 444 especies endémicas en México, que corresponden aproximadamente al 40% del total de taxones registrados en el país (Soto, 1996).

Las orquídeas tienen un amplio rango de distribución. Se presentan en todas partes del mundo excepto, en la región Ártica, Antártica y en las regiones desérticas muy calientes (Barba, *et al.*, 2002). Los hábitats más ricos y diversos de las orquídeas son los bosques de neblina (Hágsater, *et al.*, 2005). En México, se encuentran en todas las regiones situadas al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3,500 m.s.n.m. Los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas, albergan la mayor riqueza de orquídeas, otros estados con una cifra respetable de especies son: Morelos, Estado de México y las regiones más bajas de Puebla y San Luís Potosí (Wright, 1958; Hágsater, *et al.*, 2005). Aunque el número de especies mexicanas de orquídeas es menor que el de otros países de América tropical (Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, entre otros). México cuenta con un conocimiento taxonómico más avanzado de sus especies (Abraham y Vatsala, 1981).

La familia Orchidaceae se encuentra amenazada por la pérdida de su hábitat, las más vulnerables son las orquídeas epifitas, por la desventaja de residir en selvas y bosques destruidos por la tala inmoderada (Ramírez, 1990). Además que la reproducción natural de las orquídeas a partir de semillas es lenta, vulnerable y depende de condiciones estrictas de luz, temperatura y humedad (Fanfani y Rossi, 1989).

Se deben tomar en cuenta medidas conservacionistas y establecer para las orquídeas técnicas que permitan su estudio y la recuperación de poblaciones amenazadas por factores humanos y ambientales, una alternativa viable es por medio de la propagación *in vitro*. La germinación *in vitro* en un medio de cultivo suplementado con sales basales y carbohidratos se ha utilizado para propagación de plántulas. Para la germinación de orquídeas se han utilizado como suplementos de los medios nutritivos los extractos naturales tales como el endospermo de coco, papa, jugo de piña, tomate, entre otros (Ramírez, 1990; Hicks, 2000; Brundrett, *et al.*, 2001; Hicks, 2005; Devek y Holmer, 2006).

En México existe una gran cantidad de especies e híbridos de orquídeas cuyo conocimiento en relación a su biología y en particular a su germinación asimbiótica *in vitro* es mínimo, desconociendo el papel que pueden tener los aditivos naturales agregados al medio de cultivo como extractos de hongos en la germinación. Se debe fomentar la micropropagación para la producción, exportación y venta de plantas y flores de orquídea, convirtiéndose en un recurso sustentable tanto de especies como de híbridos (Devek y Holmer, 2006; Bellone, 2006) tal es el caso de la especie *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, que están expuestas por sus flor llamativa a ubicarse en alguna categoría de riesgo (Hágsater, *et al.*, 2005; Bellone, 2006; Devek y Holmer, 2006).

MARCO TEÓRICO

1. FORMAS DE VIDA

Las orquídeas tienen diferentes hábitos de crecimiento como el epifito, terrestre, litofítico y palustre o subterráneo (Caneva, 1978). Las orquídeas epífitas son aquellas que crecen sobre otras plantas a las que utilizan como soporte. La posibilidad de crecer sobre otras plantas les ofrece una mayor disponibilidad de luz solar, disminuyendo su competencia por este recurso, sin embargo, esto acarrea desventajas al competir por otros requerimientos como agua y nutrientes (Rudolph, *et al.*, 1998). Las principales fuentes de agua son el rocío, la humedad del aire y la lluvia. Crecen en las selvas y bosques de montaña tropicales y subtropicales, donde se presentan elevados valores de humedad relativa. Las áreas más ricas en epífitas son los bosques de montaña (1500 - 2500 m.s.n.m.), donde los árboles proveen un hábitat con condiciones meso y micro climáticas adecuadas (Benzing, 1989; Soto, *et al.*, 1995).

Las orquídeas pueden tener dos formas de crecimiento la monopodial (Figura 1), donde el tallo es vertical y la simpodial (Figura 2), donde el tallo tiene crecimiento horizontal, formándose ápices que darán origen a nuevos tallos con crecimiento vertical (Caneva, 1978; Fanfani y Rossi, 1989; Bellone, 2006; Lecoufle, 2006).

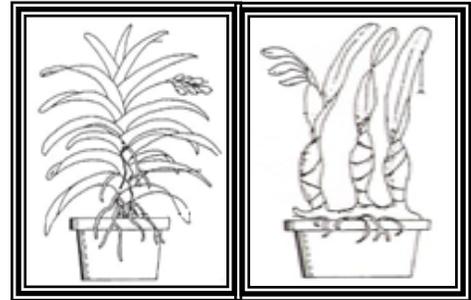


Fig. 1. Crecimiento Monopodial (Barba *et al.* 2002)

Fig. 2. Crecimiento simpodial (Barba *et al.* 2002)

2. MORFOLOGÍA

Raíces: pueden ser simples, ramificadas, carnosas y con un diámetro de 1 a 10 mm, dependiendo de la especie. En las orquídeas terrestres salen de forma radiada de la base del tallo, incluso si se trata de especies con tubérculos subterráneos. En las epífitas y las litofíticas, las raíces (Figura 3) aparecen en la base y a lo largo de los tallos, pero nunca sobre los pseudobulbos. Estas raíces fijan la planta sobre la corteza de los árboles o en las fracturas de las rocas (Hágsater, *et al.*, 2005; Bellone, 2006). Su organización anatómica consiste en un cilindro vascular central rodeado por una endodermis envuelta por la corteza; 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 permiten el paso del agua del exterior hacia la corteza (Hágsater, *et al.*, 2005).



Fig.3. Raíz de orquídea epífita con velamen (Hágsater, *et al.*, 2005).

La porción más externa de la raíz es la epidermis, suele formar un tejido esponjoso constituido por células que al madurar mueren y pierden el citoplasma, quedando solo sus paredes parcialmente engrosadas. Puede tener una capa de células muertas que la cubre llamada velamen el que puede tener de una a ocho células de grosor (es un tejido esponjoso con aspecto blanquecino), al contacto con agua de lluvia, neblina y el rocío, el velamen se embebe con rapidez y la humedad está disponible para la absorción hacia el interior la raíz. En algunas epífitas, el velamen se vuelve translúcido al humedecerse y permite ver el color verde de la corteza, cuyas células por tener

cloroplastos; realizan fotosíntesis (es vital para algunas orquídeas cuando la planta tiene pocos vástagos, carece de hojas o tallos) absorben agua, nutrientes, captar energía lumínica y fijan la planta al sustrato (Bezing, *et al.*, 1983; Hágsater, *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

Tallo: está formado por nudos o anillos y entrenudos o segmentos, donde se insertan las hojas, vainas o escamas foliares (Bellone, 2006). En algunos casos el pseudobulbo solo tiene un entrenudo, en otros consta de dos o más, en *Myrmecophila* y *Caularthron* son huecos y albergan hormigas o termitas (Dressler, 1981; Hágsater, *et al.*, 2005).

Los pseudobulbos son tallos aéreos notablemente engrosados, presentes en epífitas y en algunas terrestres o rupícolas, sus contrapartes subterráneas presentan cormos. Tienen forma variable (Figura 4) según la especie (esféricos, ovoides, ahusados, entre otros). Su función es almacenar agua y sustancias de reserva nutritiva (como el almidón) que permite a la planta subsistir durante los períodos de reposo o sequía o utilizados para la producción de flores, frutos y el desarrollo de nuevos vástagos (Dressler, 1981; Hágsater, *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

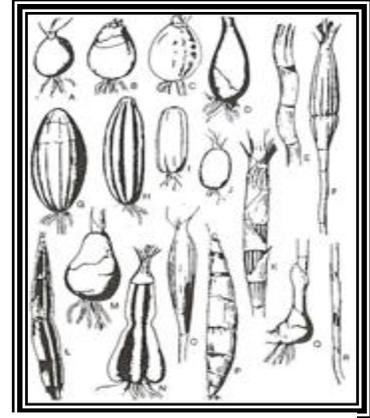


Fig. 4. Diferentes tipos de pseudobulbos en orquídeas (Barba *et al* 2002).

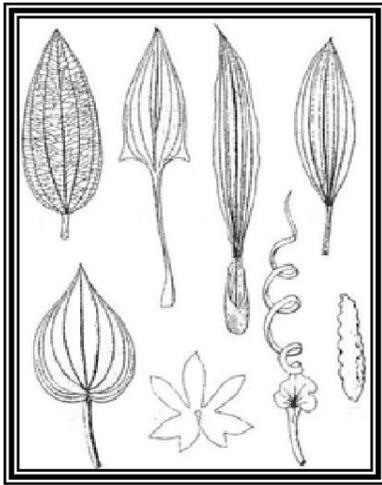


Fig. 5 Diferentes tipos de hojas en orquídeas (Barba *et al* 2002).

Hojas: Tienen la función de transpirar, de llevar a cabo el intercambio gaseoso y la producción de nutrientes a través de la fotosíntesis. Tienen formas variables (Figura 5) planas, elípticas, lanceoladas, ovoides, triangulares, lineales, carnosas, manchadas, brillantes, mate a veces rojizas entre otras (Fanfani y Rossi, 1989; Bellone, 2006).

En *Pleurothallidinae* existe una hipodermis (tejido translucido) bajo la epidermis del haz de la hoja, el cual almacena agua. *Trichocentrum*, tiene hojas grandes y carnosas con mesófilo (tejido comprendido entre la epidermis del haz y envés y haces vasculares) que contiene células de engrosamiento reticulado o espiralado en la pared celular, cuya función es almacenar agua. En algunos casos el engrosamiento de la hoja es casi cilíndrico minimizando la superficie en relación con el volumen foliar. Algunos grupos de orquídeas epífitas producen hojas de corta duración (Hágsater, *et al*, 2005; Bellone, 2006).

Flores: son por lo general hermafroditas, bilaterales, trímeras (tiene tres sépalos y tres pétalos) con uno pétalo modificado conocido como labelo o labio (Figura 6), el cual puede diferir en tamaño, color, forma, engrosamiento (callo), producen néctar, compuestos aromáticos, aceites o pseudopolen, se encuentra opuesto a la estructura reproductiva llamada columna ó ginostema (Hew y Yong, 1999; Johnson y Brown, 2004; Chung y Chung, 2005; Hágsater, *et al.*, 2005; Bellone, 2006, Jiu Zhou, 2005).

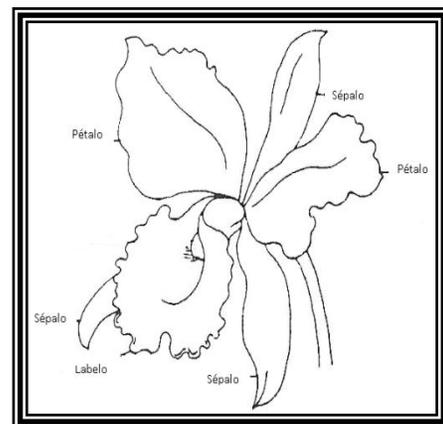


Fig. 6. Partes de una orquídea (Barba *et al* 2002).

Los órganos reproductivos, masculino (polinia) y femenino (superficie estigmática), contenidos en la columna están compuestos de una estructura conformada por la fusión del androceo y parte del gineceo (estilo, pistilo y filamentos de los estambres están soldados) (Williams, 1982; Aragón y Ackerman, 2004). En el extremo de la columna se encuentra la antera, que lleva las polinias (de dos a ocho, según la especie), pequeñas masas cerosas que agrupan los granos de polen. En su parte terminal, la antera lleva un opérculo o capuchón que protege las polinias que se desprenden fácilmente cuando pasa un insecto. Las polinias están unidas al retináculo (visidium) por una o dos caudículas (pedicelos). El ovario es ínfero (Lapiner, 1973; Hágsater, *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

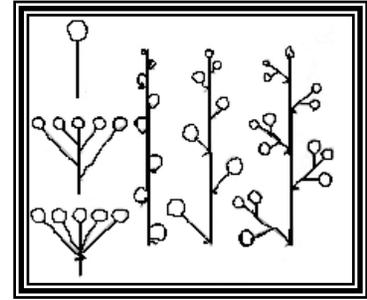


Fig. 7. Diferentes tipos de inflorescencias en las orquídeas (Barba *et al* 2002).

Las flores son la parte más atractiva de las orquídeas, suelen estar agregadas en racimos, panículas o inflorescencias, pueden encontrarse en forma de racimo, espiral, simple, entre otras (Figura 7), aunque en ocasiones son producidas de manera individual. A menudo experimenta una torsión que orienta la flor hacia arriba torciéndose 180° (resupinación), el pedicelo u ovario se flexionan, en *Euchile citrina*, toda la planta parece invertida ya que las hojas y las flores crecen hacia abajo (Fanfani y Rossi, 1989; Hágsater, *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

Frutos: son cápsulas tripartidas (Figura 8) que se desarrollan a partir del ovario inmediatamente después de que se llevó a cabo la polinización, estos pueden tener diversas formas dependiendo de la especie de orquídea (Dressler, 1981). Después de la fecundación, el ovario se transforma en una cápsula en la cual se desarrollan las semillas (Hágsater, *et al.*, 2005).



Fig. 8. Fruto de orquídea

Semillas: Por su tamaño y peso las semillas (Figura 9) pueden dispersarse por el viento o agua. Son particularmente numerosas (van de miles hasta cuatro millones por fruto). Pueden presentar desde un solo embrión (sin cotiledón ni albumen), poliembrión (dos o más embriones en una semilla) o apomixis en algunas especies de forma natural (Arditti, 1967; Penningsfeld, 1985; Arditti y Ghani, 2000; Hicks, 2000; Hágsater, *et al.*, 2005). El embrión se encuentra dentro de una testa que tiene un amplio espacio aéreo permitiéndole desplazarse por el aire a grandes distancias (Arditti, 1992; Arditti y Ghani, 2000; Hágsater, *et al.*, 2005). Solo un número reducido encuentra las condiciones adecuadas para germinar ya que necesitan de la presencia de un hongo simbionte específico en alguna etapa de la germinación. Los hongos le proporcionan nutrientes minerales, carbohidratos y aminoácidos (ya que carecen de cotiledones y endospermo) a los embriones (Arditti, 1992; Arditti y Ghani, 2000; Zettler, *et al.*, 2003). Se requieren muchos años para que se desarrolle una planta madura y llegue a florecer (Arditti y Ghani, 2000).



Fig. 9. Semillas de orquídea

3. PROPAGACIÓN *IN VITRO*

Muchas especies de orquídeas son demasiado raras en su hábitat natural y se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, otras son endémicas y apreciadas (Niemann, 2001). La aplicación de técnicas de propagación *in vitro* en especies de orquídeas expuestas a sobrecolecta son especialmente útiles. Especies de gran demanda pueden ser producidas masivamente *in vitro* y puestas en el mercado disminuyendo así la colecta de poblaciones silvestres (Stemberg y Kane, 1998) o bien se pueden producir individuos para ecorestauración y reintroducción de nuevas poblaciones a su hábitat natural (Soto, 1996; Stemberg y Kane, 1998; Barba, et al, 2002).

La germinación *in vitro* requiere que las semillas estén libres de patógenos (Yanagawa, *et al*, 1995). La desinfección es difícil por las semillas tan pequeñas, llegan a medir de 0.07 a 0.4 mm de ancho y 0.11- 1.97 mm de largo incluyendo la testa (Rasmussen, 1995). Poseen un embrión pequeño y alargado suspendido dentro de una membrana transparente, a veces pigmentada. Tienen un suspensor de células alargadas y elongadas en la parte posterior del embrión (Arditti, 1967; Arditti, *et al*, 1990). La desinfección de la superficie de la cápsula antes de la extracción de semillas suele ser suficiente para la obtención de muestras asépticas, ya que las semillas dentro de la cápsula están libres de microorganismos (Devek, y Holmer, 2006) obteniendo miles de plántulas a partir de una sola cápsula (Velázquez, 1997; Pritchard, *et al.*, 1999).

Davis 1946 señaló que era necesario mantener la semilla de orquídea sin microorganismos, deshidratada y en refrigeración si estas iban a ser almacenada durante algún tiempo. Recomendó colocar la cápsula en un sobre de papel justo antes de madurar. Esta medida aseguró que ninguna semilla se perdería y también imposibilitaría a los microorganismos a entrar a la cápsula. Posteriormente las semillas deberían ser extraídas del fruto. En la desinfección, Liddell en 1947, reportó resultados favorables al usar hipoclorito de sodio como un agente desinfectante de semillas. Ha sido usado satisfactoriamente en *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium* y *Vanda*. El empleo de hipoclorito de sodio es más ventajoso que el hipoclorito de calcio (Anderson, 1967).

El almacenamiento a largo plazo de las semillas de orquídeas es una técnica de conservación de viabilidad, en congelación es con el 5% de humedad y a temperaturas inferiores a -40°C. En ultra-frío, se desecan sobre CaCl₂ o gel de silicona antes de la inmersión en nitrógeno líquido (-196°C) (Pritchard, *et al*, 1999; Devok y Holmer, 2006).

Las semillas de orquídea pueden sobrevivir por periodos muy largos de tiempo si se almacenan correctamente, como lo demostraron Shoushtari y colaboradores, que después de veinte años aún tenían semillas viables de *Cattleya* conservadas en cloruro de calcio como desecante a una temperatura de 4°C (Hicks, 2000).

Koopowitz y Thornhill demostraron que las semillas de *Prosthechea vitellina* almacenadas con una temperatura del 20 a 40°C, presentaron una viabilidad del 95%, a pesar de haber estado almacenadas por 10 años (Hicks, 2000).

4. MICORRIZAS Y ORQUÍDEAS

El término micorriza, fue utilizado por primera vez por Frank en 1885 (Plenchette, 1982), para designar la asociación de hifas fúngicas con los órganos subterráneos de las plantas superiores. Se forma del griego “*myces*” (hongo) y del vocablo latino “*rhiza*” (raíz). Es la asociación de un hongo y una raíz con morfología y fisiología particular, donde las dos partes obtienen un beneficio mutuo y su asociación constituye una simbiosis (Peterson y Currah, 1990; Espinosa, 1997).

La simbiosis micorrízica es necesaria, particularmente durante la germinación de las semillas y desarrollo del embrión. La necesidad de la nutrición micotrófica durante el proceso de germinación de las orquídeas las hace un grupo vulnerable, ya que su cultivo por semillas es complicado y en algunas especies su desarrollo es lento (Tomita y Konns, 1998; Peterson *et al.*, 1998; Lawrence, 1997). Las semillas de orquídea se asocian a los hongos micorrízicos, estos son específicos, penetran intracelular e intercelularmente y forman enrollamientos o pelotones de hifas dentro de las células de la raíz o en los tallos (Hernández, 2003; Hágsater, *et al.*, 2005). La infección del hongo micorrízico en las semillas ocurre por medio de micro poros de la testa y son atraídas a la región del suspensor penetrando en las paredes de la semilla, luego a las corticales, infecta el córtex, se ramifica y forma haustorios, se dividen las células meristemáticas y empiezan el desarrollo las células de las hifas, se extienden de célula a célula, formando espirales y ocupando todo el volumen de la célula sin romper su membrana plasmática hasta formar un pelotón. Las orquídeas son micotróficas y todas parecen depender de las micorrizas durante alguna fase de su ciclo de vida (Arditti, 1967; Currah, *et al.*, 1997). El tipo de micorriza que presentan las orquídeas son endomicorrizas. La metodología general para la germinación simbiótica de semillas *in vitro* permite la micorrización en condiciones artificiales. Esto se logra seleccionando el hongo apropiado para cada especie e inoculándolo a la semilla *in vitro* (Espinosa, 1997; Tomita y Konns, 1998; Markovina y McGee, 2000).

Las micorrizas establecen asociaciones mutualistas (Basidiomicetes, Ascomicetes y Zigomicetes) con las plantas vasculares (Harley y Smith, 1983; Brundrett, 1991; Kendrick, 1992). Se asocian a *Rhizoctonia*, *Tulasnella*, *Thanathephorus*, *Ceratobasidium*, *Marasmius*, *Armillaria*, *Hymenochaete*, *Fomes*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, estos hongos cuando no están micorrizando son patógenos destructivos. Esta asociación es una simbiosis en la cual la planta hospedera recibe nutrimentos minerales por parte del hongo y este obtiene compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Paul y Clark, 1989). El hongo incrementa la superficie de captación de nutrimentos para la planta, principalmente de iones de fosfato y amonio disponible en el suelo, las raíces proporcionan un 80% de fósforo y 25% de nitrógeno, a cambio el hongo cuenta con un hábitat, absorbe azúcares simples derivados de la fotosíntesis; obtiene del 4 al 20% de hidratos de carbono almacenado, resolviendo dos problemas, la desecación del suelo y los sustratos escasos de nutrimentos (Harley y Smith, 1983; Withner y Krieger, 1985; Richardson, *et al.*, 1992; Espinosa, 1997; Lawrence, 1997; Velázquez, 1997; Tomita y Konns, 1998; Peterson, *et al.*, 1998; Herrera, y Ulloa, 1990; Read *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 2003; Sánchez, *et al.*, 2005).

4.1. GERMINACIÓN

El proceso de germinación es similar entre las orquídeas (Arditti, 1992; Sheehan, 1996; Damon, *et al.*, 2004). Definiéndose como los estadios secuenciales del proceso de desarrollo del embrión hasta la formación de una planta completa. Inicia con la absorción de agua a través de la testa, aumentando el volumen y división celular en la región anterior, provocando la ruptura de la testa, formando un estructura cónica llamada protocormo, en el cual se forma en la región apical una protuberancia con el primordio foliar, evento seguido de la formación de rizoides en la parte inferior del protocormo. A partir del primordio foliar se desarrollan las hojas y en la parte basal del protocormo se forman las raíces, obteniendo una planta completa (Smith, 1973; Barba, *et al.*, 2002)

4.1.1. GERMINACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMBIÓTICA

Germinación Simbiótica

La luz es un factor importante en la germinación para algunas orquídeas. Puede actuar como inhibidor o estimulante dependiendo de la especie y la intensidad lumínica. (Wither y Krieger, 1985).

La relación simbiótica de las orquídeas es fundamental en las primeras etapas del ciclo de vida de la planta, en las epifitas, el protocormo (estado intermedio entre el embrión y la plántula) realiza la fotosíntesis aunque esta no es eficiente (McKendrick, 2000) por lo cual, es necesaria la inoculación de una micorriza para su germinación. Las orquídeas dependen del hongo hasta que la planta desarrolla la primera hoja, ya que en ese momento es capaz de fotosintetizar y producir sus recursos energéticos, por lo que deja de ser necesaria la asociación, sin embargo, se ha comprobado que esta relación puede estar presente toda la vida de la planta (Lesica y Antibus, 1990).

D.G. Downie en 1940 logró germinar semillas de *Goodyera repens* en medio de cultivo "Pfeffer" con la adición del hongo micorrízico obteniendo buenos resultados que mejoraron al adicionar azúcar, sin embargo no se obtuvo respuesta en ausencia de la micorriza (Arditti, y Ernst, 1984).

Zettler y colaboradores (2003) reconfirmaron la participación del hongo micorrízico y la simbiosis hongo-orquídea con la observación de pelotones en las células corticales en la base de las plántulas. Se aisló el hongo micorrízico de *Epidendrum conopseum*, se pusieron a prueba dos grupos de semillas de *Encyclia tampensis*, unas fueron inoculadas y las otras no. El 99.6% de las semillas inoculadas con el hongo germinaron en 21 días, mientras que las semillas sembradas en ausencia del hongo no lograron germinar. Aproximadamente el 2% de las plántulas que germinaron presentaron sus primeras hojas después de 13 semanas de incubación.

Germinación Asimbiótica

La germinación asimbiótica *in vitro* es valiosa ya que puede ayudar a la propagación de plantas de interés comercial o ecológico (Penningsfeld, 1985; Fay, 1992; Velázquez, 1997), posibilitada ésta por la presencia de nutrientes orgánicos, inorgánicos y los azúcares que están disponibles en el medio de cultivo (Yoneo, 1991; Obaidul, *et al.*, 2000). Las orquídeas como las especies de *Cattleya* y relacionadas, son pieza fundamental por su belleza, para crear híbridos artificiales. El desarrollo de la técnica de germinación asimbiótica de semillas de orquídeas hace posible la producción masiva de individuos nuevos o selectos en un periodo muy corto de tiempo (Murashige, 1973; Ammirato *et al.*, 1990 y Niemann, 2001; Fehér, *et al.*, 2003).

En 1916, Lewis Knudson fue el primer investigador en dar a conocer la técnica de germinación *in vitro* con el método asimbiótico, dando a conocer que varios azúcares intervienen en la germinación de las semillas de las orquídeas (Arditti, 1972; Lecoufle, 2006).

En 1920 Knudson mostró que el hongo convertía el almidón en azúcar y que las semillas utilizaban este azúcar para germinar, él sustituyó el hongo por el azúcar donde obtuvo un crecimiento excelente sin necesidad de la micorriza.

La germinación asimbiótica *in vitro* acorta el tiempo de germinación natural de las semillas de algunas especies, *Cypripedium montanum* en la naturaleza requiere de tres a seis meses para germinar y más de seis meses para su desarrollo, sin embargo, en condiciones *in vitro* los embriones se hinchan a los 18 días y empiezan a germinar después de los 36 días en cultivo. Después de cuatro meses de la germinación algunos protocormos pueden presentar hasta 10 brotes y 30 raíces. A los seis meses desarrollan plántulas completas (Velázquez, 1997).

Knudson logró el 100% de la germinación asimbiótica del híbrido *Laeliocattleya* utilizando glucosa y fructosa en el medio nutritivo además de sales minerales y extractos orgánicos (Arditti, y Ernst, 1984). Él realizó un estudio acerca de la germinación de los géneros *Cattleya*, *Epidendrum* y *Laelia* en el medio de cultivo “Pfeffer” modificado, que posteriormente se conocería como medio “Knudson” B, posteriormente hace modificaciones de éste y añade sacarosa como carbohidrato, así obtiene el medio de cultivo “Knudson C” actualmente muy utilizado en la germinación *in vitro* de orquídeas (Arditti, 1972).

Markovina y McGee (2000), compararon los resultados de la germinación simbiótica y asimbiótica *in vitro* y el desarrollo de plántulas de *Sarcochilus* e híbridos. Aislaron pelotones de cuatro hongos encontrados en las raíces de *Sarcochilus olivaceus* y *Sarcochilus falcatus* e inocularon las semillas en un medio comercial, resultando que en tres cultivos germinaron en una proporción similar. En el cuarto cultivo las hifas del hongo simbiote identificado como *Ceratorhiza sp*, estimuló a las plántulas durante tres semanas después de la germinación. Éstas después de un año presentaron la formación de micorriza, lo mismo pasó con un híbrido de *Sarcochilus*, donde se obtuvo un mayor crecimiento en comparación con las plantas sembradas asimbióticamente comprobando que el hongo estimuló el crecimiento de hojas y raíces significativamente. Los autores indican que las técnicas simbióticas son de gran importancia en la producción masiva de estas orquídeas.

Stemberg y Kane 1998, obtuvieron germinación *in vitro* de *Encyclia botaina* var. *Erythronioides* en cuatro medios de cultivo (“Knudson C”, “Murashige y Skoog”, “Lindenman”, “Vacin y Went”), donde se mostró que los medios de “Knudson”C y “Murashige y Skoog” generaron protocormos verdes y en los medios nutritivos de “Lindenman” y “Vacin y Went” los protocormos eran cloróticos y solo sobrevivieron el 3% y 1% respectivamente, distinto de los primeros medios de cultivo donde sobrevivieron más del 90% y finalmente se desarrollaron las plántulas. El medio “Knudson C” para las especies de *Encyclia botaina*, *Ponthieva sp* y *Cattleya sp* ha sido el más efectivo ya que se han podido cultivar asimbióticamente, obteniendo buenos resultados.

4.1.2. DURACIÓN DE LA GERMINACIÓN

El tiempo empleado para la germinación en las semillas de las orquídeas en la naturaleza es muy variable dependiendo de la especie y del lapso que tarda la penetración de la micorriza. Se ha encontrado que el rango de la germinación en las orquídeas es de 7 a 235 días después de haberlas colocado en un medio nutritivo y la obtención de plántulas es de 50 a 724 días, tiempo que dificulta la investigación de los procesos de la germinación (Arditti, 1992).

Velázquez (1997) menciona que cuando una semilla de orquídea germina, y antes que todas las funciones metabólicas inicien el crecimiento o la diferenciación de la planta, la germinación puede estar limitada por la falta o carencia de un componente en particular.

Los primeros estadios de germinación, corresponden a la degradación de los materiales lipídicos del embrión y a la aparición de almidón dentro de las células basales del embrión, las semillas pasan a la etapa de protocormo, que es un estadio intermedio entre el embrión y plántula. Después de la infección micorrízica surge un primordio foliar a partir de la depresión de la superficie superior, continúa con el desarrollo de las primeras raíces, se forma clorofila en hojas desarrolladas y otros órganos fotosintéticos, crece la planta y obtiene posteriormente su maduración. El tiempo para cada uno de los eventos varía según la especie.

Rasmunssen (1998) determinó el tiempo de germinación de *Goodyera pubescens* y *Corallorhiza odontorhiza* las cuales tardaron entre 24 a 30 semanas en germinar. *Epipactis helleborine* 32 semanas; *Dactylorhiza maculata* 14 semanas; *Microtis pasiflora* 12 semanas; *Spiranthes sinensis* var. *Amoena* ocho semanas y *Bletilla estriata* seis semanas, debiéndose estas diferencias a la especificidad de la micorriza en cada especie, así como de los requerimientos nutricionales que tiene cada orquídea.

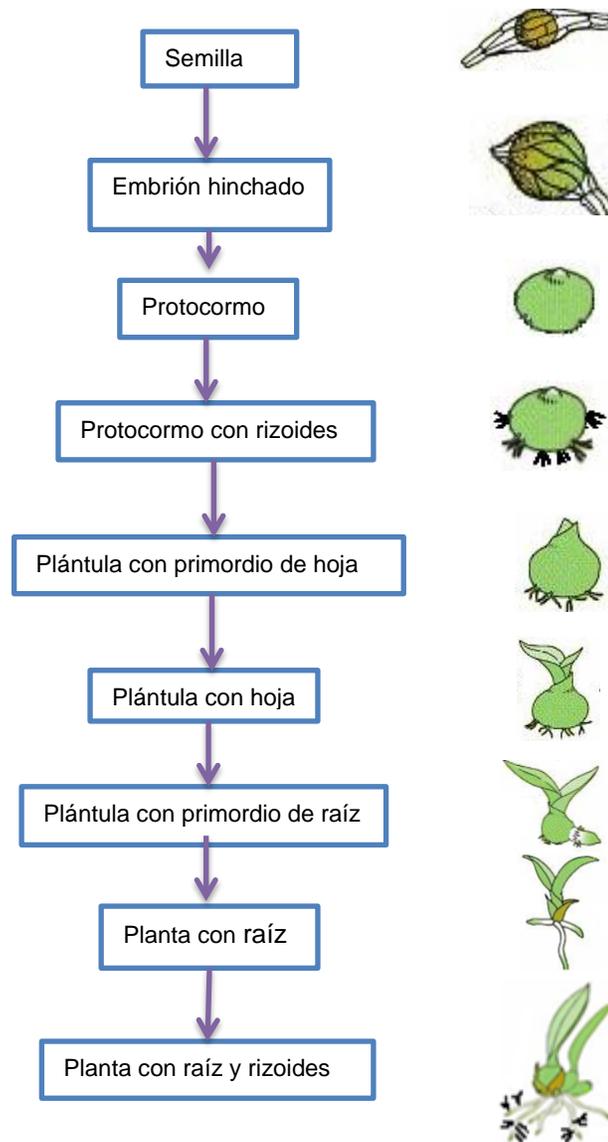
5. DESARROLLO ONTOGÉNICO

El desarrollo durante la germinación de las orquídeas difiere entre especies terrestres y epífitas. En las terrestres comienza con el incremento en volumen del embrión y la ruptura de la testa, seguido de la formación del protocormo, posteriormente ocurre la aparición de rizoides que absorberán los nutrimentos y agua del medio en que se encuentran, posteriormente se forma una elevación en la región apical del embrión (primordio foliar), la cual continuará su desarrollo para formar la primera hoja fotosintética, posteriormente se desarrollan las raíces para conformar una planta completa.

En las orquídeas epífitas (Ver Cuadro I), la germinación inicia con la absorción de agua por el embrión, éste se hincha y se ensancha. Sus células se alargan y forman vacuolas por lo que el embrión asume una forma esférica. Posteriormente estas células hacen presión constante en la testa la cual se estira y finalmente se rompe. Las células del embrión empiezan a sintetizar clorofila, principalmente en la región micropilar y una vez iniciado el crecimiento comienza la diferenciación de los órganos. Los pelos absorbentes se desarrollan a partir de la epidermis, a su vez se desarrolla una pequeña papila en la base. Conforme esta organización derivada del embrión aumenta en tamaño se forma una masa globular de células (protocormo) con una depresión en la superficie superior. Algunas de las células epidérmicas del protocormo comienzan a alargarse y sobresalen protuberancias que originan rizoides. Durante el desarrollo del protocormo, al continuar la germinación nuevos tipos de células aparecen. Células internas más pequeñas que las del córtex se desarrollan y forman una capa entre la epidermis, que estará cuando se desarrolle completamente.

Externamente, los rizoides se desarrollan a partir de la epidermis y pueden reconocerse como células alargadas individuales y después como estructuras multicelulares más complejas. Los protocormos de muchas especies de epifitas contienen clorofila. El primordio foliar emerge conforme el protocormo continúa su desarrollo para formar la primera hoja fotosintética, se forma el primordio radical; la formación de una segunda y tercera hoja es precedida por el desarrollo de la raíz y así se forma una planta completa (Shushan, 1959; Arditti, *et al*, 1982; Baker, *et al*; 1987; Velázquez, 1997; Hahn y Paek, 2001; Mayo, *et al.*, 2008)).

CUADRO I. SECUENCIA DEL PROCESO DE GERMINACIÓN EN ORQUÍDEAS EPÍFITAS.



6. EL PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA GERMINACIÓN

Knudson (1946) observó que las semillas de *Cattleya mossiae* germinaron y diferenciaron en medio de cultivo con sacarosa, mientras que en ausencia del azúcar los embriones no se desarrollaron quedándose como protocormos pequeños. Situación similar fue observada en *Cypripedium acaule*, donde se obtuvieron protocormos, hojas y raíces en presencia de azúcares, sin embargo cuando no recibieron estos azúcares siguieron en estado de protocormo (Leroux *et al.*, 1995).

En 1970 Arditti, Ernst y Healy establecieron que para el proceso de germinación solo los azúcares dextrógiros como la fructosa, glucosa, maltosa, manosa, sacarosa, xilosa, rafinosa, estaquiosa y otras, son favorables para la germinación *in vitro* de las orquídeas. Además demostraron que la galactosa tiene un efecto inhibitorio ya que resulta toxica aún en bajas concentraciones sobre la germinación de semillas y en plántulas, ya que interfiere en la síntesis de celulosa y hexoquinasa (Arditti y Ernst, 1984; Withner y Krieger, 1985).

Bletia urbana fue exitosamente germinada en el medio Knudson C adicionado con azúcar (sacarosa) y endospermo líquido de coco (Rubluo, *et al.*, 1989).

Las plántulas de *Cattleya aurantiaca* no crecen bien con fructosa pero si con sacarosa o glucosa (Hárrison y Arditti, 1978; Arditti, *et al.*, 1990; Leroux, *et al.*, 1995). La sacarosa es la más utilizada dentro del cultivo de semillas y plántulas *in vitro*, variando la concentración utilizada según la especie (Leroux, *et al.*, 1995).

7. EXTRACTOS NATURALES ADICIONADOS AL MEDIO DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN

Algunos medios nutritivos utilizados en el cultivo *in vitro* de orquídeas son; el “Knudson B” y “Knudson C” (1946); “Vacin y Went” (1949) y “Murashige y Skoog” (1962). Éstos originalmente no fueron ideados para el cultivo de orquídeas, pero se fueron modificando ligeramente en su composición original y adicionando complejos naturales que al utilizarlos mejoraron la respuesta (Arditti, 1977). Se han desarrollado diferentes fórmulas para la germinación de orquídeas, la gran variabilidad de taxones tienen diferentes requerimientos nutritivos para la germinación y crecimiento, por lo que se han ido modificando los medios suplementándolos con extractos naturales (Ammirato, *et al.*, 1990; Devek, y Holmer, 2006; Stancato, *et al.*, 2008).

Las semillas de orquídea requieren suplementos como fuente de carbono para su crecimiento. Vacin y Went, (1949); Kano, (1965) y Arditti, (1967) señalan que el efecto de los extractos naturales es favorable en la germinación de semillas de orquídea. Aparentemente la variedad de sustancias de estos complejos hace posible la estimulación rápida de la germinación, crecimiento y desarrollo, siendo un factor promotor. El inconveniente es la dificultad de conocer con exactitud el contenido, el tipo y la cantidad de minerales, azúcares y otras sustancias de estos extractos adicionados.

Knudson (1922), describió la utilización favorable de aditivos complejos en la germinación de *Cattleya*, utilizando suplementos de zanahoria y de remolacha.

Northen en 1950 publicó fórmulas nutritivas para el cultivo *in vitro* que contenían endospermo de coco y jugo de tomate, los cuales tuvieron beneficios en el crecimiento de varios géneros de orquídeas (Anderson, 1967; Withner y Krieger, 1985).

Alberts (1953), notó que en especies de *Cattleya* y *Dendrobium* con emulsión de pescado, se obtiene una buena germinación y desarrollo de plántulas de ambas especies.

Anderson (1967), halló que en la germinación de *Cattleya* la adición de jugo de piña, plátano y emulsión de pescado, induce una buena germinación y un mejor desarrollo.

El uso de los extractos naturales adicionados a los medios de cultivo para la germinación ha sido de mucho éxito, debido a su rica composición química. Arditti y Ernst (1993) reportaron que el extracto de plátano contiene auxinas, giberelinas, citocininas, biotina, minerales y algunos aminoácidos por lo que éste promueve la germinación *in vitro*. Así como el extracto de tomate promueve el crecimiento de las raíces. Los extractos más utilizados en la germinación *in vitro* de las orquídeas son agua de coco (endospermo líquido), plátano maduro, tomate, papa, jugo de piña, entre otros (Withner y Krieger 1985; Devak y Holmer, 2006).

El jugo de tomate aumenta la germinación, aunque es excelente medio de cultivo para las orquídeas, para otras especies puede tener un efecto inhibitorio en diferentes concentraciones (Vacín y Went, 1949; Kano, 1965; Arditti, 1967).

Kotomori y Murashige en 1965 estudiaron los efectos de la adición al medio de germinación del endospermo líquido de coco en semillas de *Dendrobium*, estableciendo que este tenía un efecto inhibitorio en la germinación, pero estimulador en plantas de un año. El endospermo líquido de coco contenía giberelinas, las cuales inhibieron el desarrollo de la raíz y la formación de brotes. No hubo ningún efecto promotor sobre la tasa de germinación, sólo en el crecimiento subsiguiente. La giberelina fue la responsable del efecto de estimulación reportado en las plantas de un año (Anderson, 1967; Withner y Krieger, 1985).

Obaidul y colaboradores (2000) encontraron que la utilización de aditivos orgánicos complejos es favorable en la germinación de *Cattleya walkeriana* donde adicionaron al medio de cultivo extracto de papa, jitomate, habas verdes, plátano, alubia y soya, variando las cantidades de dichos aditivos. En todos los casos a los 10 días presentaron los embriones verdes, a las 10 semanas desarrollaron brotes, después observaron que el extracto de papa indujo que los protocormos tuvieran un tamaño más grande por lo tanto un mejor crecimiento de las plántulas. En el extracto de alubias y de soya, obtuvieron como resultado unas plántulas más grandes y con un mayor número de estructuras. Generalmente en concentraciones altas el proceso de germinación fue inhibitorio, pero en una menor concentración aumentó la germinación y crecimiento. Éste puede ser un factor común entre los aditivos naturales. El contenido de carotenos y clorofila fueron afectados de diferentes formas dependiendo del tipo de aditivo y la concentración de este.

Adicionar extractos naturales al medio de cultivo para la germinación *in vitro* de orquídeas es sencillo, económico y conveniente para mejorar los medios de cultivo y el uso comercial.

Muchas técnicas han sido desarrolladas para la germinación de semillas de orquídea con medios nutritivos con aditivos naturales, sin embargo, esto no ha asentado reglas generales para la adición de complejos orgánicos para los diferentes géneros de orquídea (Arditti, 1977). Un problema con la adición de aditivos es la variabilidad de los componentes orgánicos que los constituyen. Estos aditivos pueden producir diferentes efectos dependiendo del origen y la concentración de éste (Obaidul, *et al.*, 2000).

8. HONGOS BASIDIOMICETOS

Los hongos son organismos eucariontes, es decir que las células poseen un núcleo diferenciado en el que se localiza el material genético, con núcleos bien organizados, con membrana nuclear bien definida; son aerobios, heterótrofos y no móviles (Agrios, 1985). Se reproducen por esporas sexuales y asexuales. No poseen capacidad fotosintética (no poseen cloroplastos, por lo tanto no producen clorofila lo cual, los convierte en heterótrofos), necesitan captar compuestos orgánicos del exterior, pueden crecer en ausencia de luz (López, 1990), su estructura se compone de quitina y no de celulosa (Coenders, 1996). Están formados por filamentos de células tabicadas o no (“hifas”) que se reúnen en fascículos, micelio, el cual se extiende por el sustrato en busca de nutrientes (Rayman, 2000; Rayman, 2002).

Los hongos absorben hidratos de carbono, proteínas y lípidos de la materia orgánica viva o muerta. Debido a esta característica se pueden dividir en: saprófitos que se alimentan de materia orgánica muerta como madera o estiércol; parásitos que atacan organismos vivos y finalmente simbioses que se asocian con otro organismo para su mutuo beneficio (López, 1990).

Su nutrición es por absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas, la cual se realiza de dos maneras; como saprófitos cuando toman sus nutrientes de materias orgánicas muertas o en descomposición, y la segunda como parásitos, cuando se nutren de materia viva, incluso hay algunos que llegan a ser parásitos facultativos u obligados; por esta propiedad los hongos son heterótrofos, debido a que no pueden manufacturar sus propios nutrientes, su fuente primordial es a base de bióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O), sales de nitrógeno y de carbohidratos, sobre todo glucosa, sacarosa y maltosa; necesitan de los iones inorgánicos más comunes. Pueden sintetizar vitaminas, que les son necesarias para el crecimiento y reproducción, pero hay especies que llegan a ser deficientes en éstas, y requieren tomarlas del medio externo, esto se presenta sobre todo con tiamina y biotina. Pueden almacenar ácidos grasos, acil-gliceroles y glucógeno en vacuolas (Bonifaz, 1990).

Los hongos comestibles han sido apreciados desde la antigüedad por su sabor y cualidades alimenticias, teniendo un valor nutritivo similar al de diversas hortalizas y con propiedades medicinales (anticancerígenas, antibióticas, reductoras del nivel del colesterol e hipertensión, antitrombóticas, antidiabéticas), como suplementos dietéticos, se han utilizado como fuente de enzimas y productos lignocelulósicos (Galindo, 1991; Gea y Tello, 1997; Sánchez, *et al*, 2007).

Los hongos basidiomicetos tienen una composición bromatológica muy cuantiosa; nutrientes, vitaminas, minerales, proteínas, entre otros (ver Anexo I), por lo cual es de esperarse que si se adicionan extractos de éstos a los medios de cultivo, tengan algún efecto en el desarrollo *in vitro* de semillas y plántulas. En México existe una amplia variedad de especies de basidiomicetos como son *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ustilago maydis*, etc.

8.1. *Agaricus bisporus* (Champiñón) Lange Imbach Singer

El champiñón (Figura 10) es corto, robusto, con un sombrero de 5-12 cm de diámetro, su pie cilíndrico (8-10 x 2-3 cm), tiene un anillo doble y estrecho en la parte superior. Su carne es blanca y firme, con sabor agradable, se vuelve de un marrón rosáceo tenue al cortarlo o frotarlo y con un tenue olor a hierba. El aroma de los champiñones se debe al (R)-1-octen-3-ol, que procede de la degradación enzimático-oxidativa del ácido linólico. En el champiñón fresco, una pequeña parte del alcohol se oxida a 1-octen-3-ona, que muy diluida tiene un olor a hongos y más concentrada a metálico. El calentamiento del hongo conduce a la oxidación completa del alcohol cetona (García, 1993; Gea y Tello, 1997). Crece en suelos ricos en materia orgánica en descomposición. *Agaricus bisporus* es comercializado en más de 70 países (De Diego, 1990; López, 1990; Shelley y Geoffrey, 2005).

El champiñón, contiene aproximadamente de 82 a 85% de humedad, valor muy similar al de la mayoría de los vegetales. Los esporóforos de esta especie contienen 7.75% de proteínas en peso fresco. Las proteínas de este hongo contienen aminoácidos esenciales particularmente son ricos en lisina y leucina, los cuales son deficientes en la mayoría de los granos básicos. Sin embargo, la metionina y la cistina, presentes en las proteínas de la carne se encuentran en bajas cantidades, esto sitúa al champiñón en una posición intermedia entre los vegetales y los productos de origen animal (Carlile y Watkinson, 1998).



Fig. 10. *Agaricus bisporus* (Champiñón)

El contenido de carbohidratos en el champiñón oscila entre 3.5 y 5%. Es pobre en materias grasas, sin embargo, es rico en cobre, zinc, molibdeno, azufre, potasio, calcio, sodio, fósforo, hierro, magnesio y manganeso. Tiene como antioxidante selenio y ergotioneina. Se encuentran altos contenidos de vitaminas del complejo B, principalmente ácido fólico (B9) muy raro de encontrar en las hortalizas, tiamina (B1, 0.12 mg/100 g), riboflavina (B2, 0.52 mg/100 g). Así mismo, están presentes las vitaminas; ácido ascórbico (vitamina C, 8.6 mg/100 g), biotina (vitamina H) y Ergosterol (provitamina D2), indicios de ácido nicotínico (vitamina K, 5.85 mg/100 g), ácido pantoténico (2.38 mg/100 g), lignina, celulosa, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, treonina, valina, arginina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, prolina, serina, aminoácidos (1.8- 3.2 mg/100 g), fibras (8.0-10.4 mg/100 g). El champiñón tiene valor energético (328-368 kcal /100g de materia seca), (Beelman, *et al*, 2003; Spaulding y Belman, 2003; Beelman 2005; De Diego, 1990; Galindo, 1991; Gea y Tello, 1997; Carlile y Watkinson, 1998).

8.2. *Pleurotus ostreatus* (Seta), Jacq. P. ex Fr. Kummer

En general las setas están formadas por el micelio a partir del cual, se desarrollan los cuerpos fructíferos (sarcóforos) que algunos pueden ser comestibles y otros ligera o fuertemente venenosos (Carlile y Watkinson, 1998).

Pleurotus ostreatus crece sobre madera en descomposición, en conjuntos de cinco a quince individuos, sus hifas excretan unas sustancias que anestesian a los nematodos, después de lo cual la hifa envuelve a estos gusanos pequeños y penetra en su interior., aparentemente el hongo los utiliza como fuente de nitrógeno, de esta manera suple los bajos niveles de nitrógeno que contiene la madera (Ramos, 2007).



Fig. 11. *Pleurotus ostreatus* (Seta)

Pleurotus ostreatus tiene sombreros redondeados y en forma de ostra, crecen en grandes grupos fasciculados, a menudo con varios cárpoforos superpuestos. Los sombreros varían del marrón pálido al azul acero y a menudo tienen una capa lanuda y blancuzca en el centro si el tiempo es frío y húmedo. Las láminas blancas, apretadas y cortas bajan por el pie muy corto o casi inexistente y alberga a menudo pequeños insectos. Su textura es carnosa y firme con olor y sabor agradable (Shelley y Geoffrey, 2005; Sánchez, *et al*, 2007).

Pleurotus ostreatus contiene hierro, cobre, zinc y potasio, tiene el 88% de agua, 4% de hidratos de carbono, 3% de proteínas, 1% de grasas, 1% de minerales y vitaminas y 1% de fibra, es bajo en sodio (de 6.4 a 26.6 cal/100g de peso fresco), contiene aminoácidos esenciales como: triptófano, treonina, isoleucina, metionina, lisina, fenilamina, valina. Contiene ácido ascórbico (vitamina C, 8.6 mg/100 g), vitamina D, niacina, ácido nicotínico (complejo B 5.82 mg/100 g), tiamina (B1, 0.12 mg/100 g), riboflavina (B2, 0.52mg/100g), ácido pantoténico (B3, 2.38 mg/100 g), vitamina B6, ácido fólico (B9) y Biotina (H 0.018 mg/100 g). Metales como Pd, Cd y Hg. El champiñón contiene 6.4 - 26.6 calorías por 100 gramos de peso fresco, lignina y fenoles (Müller y Loeffler, 1976; Galindo, 1991; Gea y Tello, 1997; Salmones y Mata, 2005; Soto, y Arias, 2004; Jayakumar, *et al*, 2006; Ramos, 2007).

8.3. *Ustilago maydis* (Huitlacoche) Beckman unger.

En México el huitlacoche o cuitlacoche (*Ustilago maydis*), es un hongo (Figura 12) fitopatógeno que infecta exclusivamente al maíz (Alexopoulos y Mims, 1985). Produce una enfermedad conocida como “carbón del maíz”, esta forma agallas o soros sobre cualquiera de los órganos aéreos, como hojas y espigas, pero ocurre con más frecuencia en las mazorcas. Las plantas atacadas desarrollan malformaciones en forma de tumores abultados, en un principio de color gris pálido, que se oscurecen al aproximarse a la maduración, y que contienen en su interior esporas reproductivas en un tejido esponjoso de color negro (Herrera y Ulloa, 1990; Banuett, 1995; Bölker, 2001; Kronstad, 2003). El hongo absorbe del maíz agua, dextrosas y dextrinas (Valverde y Paredes, 1993; Martínez, 2000).



Fig. 12. *Ustilago maydis* (Huitlacoche)

El huitlacoche es un hongo que contiene del 80% al 85% de agua, 29 calorías, 1.2 % de grasa, 3.2% de proteínas en peso fresco, el contenido de proteínas varía de 11.5-16.4 g/100g de material seco, con muy alto contenido de lisina, aminoácido esencial para la formación de tejidos, (Valverde, *et al*, 1995), y con gran cantidad de ácido linoleico. Contiene vitaminas como; retinol (A), también tiene vitaminas del complejo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), biotina(B7), niacina (B3) y ácido fólico (B9); ácido ascórbico (Vitamina C), fenoles de 0.331 mg/100g, con actividad antioxidante (previene el envejecimiento de las células), 1% de hidratos de carbono, antioxidantes (Krizkova, *et al*, 2001), proteasas, como la A, B, aminopeptidasa y dipeptidil amino peptidasa (Paredes y Valverde 2006), contiene el 1% de fibra, beta-glúcidos, y algunos oligoelementos como; cloro, potasio, sodio, fósforo, magnesio y hierro (Müller y Loeffler, 1976; Galindo, 1991; Gea y Tello, 1997; Chang y Miles, 2004; Serafin, 2005, Molina y Kahmann, 2007; Mendoza, *et al*,2008).

Las vitaminas presentes en los hongos no pueden destruirse por ebullición, enlatado, secado o congelación y los azúcares se encuentran en forma de manosa (Galindo, 1991).

9. ORQUÍDEAS DE ESTUDIO

En México existe una gran cantidad de especies e híbridos de orquídeas cuyo conocimiento en relación a su biología y en particular a su germinación asimbiótica *in vitro* es mínimo, y más aún se desconoce el papel que pueden tener los aditivos naturales agregados al medio de cultivo, no habiéndose estudiando nunca el efecto de los extractos de hongos en la germinación. Dentro de estos grupos de orquídeas se encuentran las especies mexicanas *Guarianthe aurantiaca*, *Euchile mariae*, *Euchile citrina* y sus híbridos.

9.1. *Guarianthe aurantiaca* (Bateman ex Lindl.)

Reino: Vegetal
División: Embryophyta Siphonogama
Subdivisión: Angiospermae
Clase: Monocotyledonae
Orden: Microspermae
Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae
Subtribu: Laellinae
Género: *Guarianthe*
Especie: *Guarianthe aurantiaca*



Fig.13. *Guarianthe aurantiaca*
 (Hágsater *et al.*, 2005.)

Sinónimos

Broughtonia aurea Lindl 1840
Epidendrum aurantiacum Batem. ex Lindl. P. N. Don 1840
Broughtonia sanguinea var. *aurea* (Lindl.1848)
Epidendrum aureaum Lindl (Lindl) 1853

Basiónimo

Epidendrum aurantiacum Batem. ex Lindl. 1838

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Planta: epífita, de 30 hasta 55 cm de alto (Figura 16). **Raíces:** redondas blanquecinas de 2-3.5 mm de grosor. **Pseudobulbos:** alargados, fusiformes-claviformes, ligeramente comprimidos, sulcados con la edad de 15-30 x 0.7-2 cm, cubiertos cuando jóvenes por vainas papiráceas, tubulares, apesadas. **Hojas:** Dos hojas subopuestas en el ápice del seudobulbo, recurvadas, coriáceas, carnosas, elípticas a oblongo-lanceoladas, el ápice redondeado, ligeramente retuso y algo asimétricas en el ápice, de 5-20 x 2-5.5 cm. **Inflorescencia:** terminal, recamosa umbeliforme de hasta 16 cm de largo, de 3 -11 flores simultáneas, hasta 16 cm de largo; pedúnculo terete, con una bráctea basal espatácea, con duplicado, escarioso, lanceolado- elíptico al extender, obtusa de 2.5-8 cm de largo; pedúnculo terete, y 1-3 brácteas escariosas, triangulares, superiores más pequeñas,

cortamente triangulares, agudas, escariosas de 4-7 mm de largo. **Brácteas florales:** triangulares, cuculadas, agudas, herbáceas en la antesis y en ocasiones produciendo una gota de néctar espeso en la base externa, escariosas en seco, de 2.5-6.5 mm de largo. **Flores:** de 3 cm de diámetro pequeñas para el género (Figura 13,14 y 16), vistosas, resupinadas o mirando hacia arriba, inodoras; sépalos, pétalos y labelo de color amarillo naranja a rojo naranja con la base del labelo amarilla y la mitad apical del mismo con manchas radicales rojo oscuro; columna blanca. Racimo terminal cubierto por una espata papirácea en la base y llevando 4 a 5 flores. **Ovario:** pedicelado, delgado, dilatado y engrosado ligeramente hacia el ápice, 6 sulcado de 22- 50 mm de largo. **Sépalos:** dorsal lanceolado a elíptico-lanceolado, agudo de 20-27 x 5-7 mm, los laterales ligeramente oblicuos y quillados en el dorso. Sépalos laterales oblicuamente lanceolados, agudos, ligeramente quillados dorsalmente de 20- 27 x 5-7 mm. **Pétalos:** lanceolados a lanceolados-elípticos, agudos, ligeramente oblicuos de 23-27 x 6-8 mm. **Labelo:** unido a la columna cerca de 1 mm de la base, entero con los lados vueltos hacia arriba abrazando la columna en posición natural, al extender de ovado a elíptico, agudo a obtuso de 18-23 x 10-13 mm. **Columna:** casi recta, ligeramente arqueada comprimida dorso-ventralmente comprimida, oblonga, ligeramente arriba de la mitad, tridentada en el ápice de 10-11 mm de largo y de cerca de 4 mm de ancho en el ápice. **Nectario:** penetrado en el ovario cerca de 8 mm, produciendo algo de néctar. **Antera:** subovoide 4-locular unida al clinandrio por medio de un filamento originado en el diente medio de 2 x 2 mm. **Polinario:** formado por 4 polinios obovoides, comprimidos lateralmente, formando 2 pares ovoides, lateralmente comprimidos de cerca de 1mm de largo; caudículas delgadas, granulosas, angostas, algo más largas que los polinios. **Róstelo:** laminar, semiorbicular, casi transversal (ausente en plantas autopolinizadas de algunas poblaciones del occidente de México), con un área productora de material adhesivo en la superficie ventral. Viscidio semilíquido. **Cavidad estigmática:** obtriangular, cóncava, con los lóbulos laterales del estigma evidentes. **Cápsula:** elipsoide, con 6 costillas dobles de 3.5- 4.5 mm de largo y de 1.5 cm de grosor con pedicelo de 2- 2.5 cm de largo.

Época de floración:

Florece de agosto a mayo. Crece a una altitud de 300-1800 m.s.n.m. y con temperaturas altas y bastante contrastadas, su multiplicación es por división de rizomas. El exceso de luz puede provocar un ligero amarillamiento en las hojas. La luz favorece la floración, igual que el descenso de temperaturas. Originarias de América tropical y subtropical. (Harrison, 1977; Fanfani y Rossi, 1989, Hágsater y Salazar, 1990; Espejo, *et al.*, 2002; Glen, 2002; Dressler y Higgins, 2003; Becker, 2005; Bellone, 2006; Lückel, *et al.*, 2006).



Fig.14. *Guarianthe aurantiaca* (Hágsater *et al.*, 2005.)

Guaríanthe aurantiaca es una especie muy frecuente en las selvas bajas caducifolias de la vertiente pacífica, en bosques tropicales caducifolios, principalmente en cañones protegidos y aunque se distribuye también en la zona atlántica, por alguna razón es muy rara ahí. Es más común cerca de los cauces de los ríos. Ha sido ampliamente utilizada en la creación de híbridos porque su color anaranjado y la gruesa textura de sus flores se heredada con frecuencia a su descendencia, siendo progenitora de muchos híbridos.

Distribución: La distribución de *Guaríanthe aurantiaca* en México se da desde Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz (Figura 15). También se encuentra en Guatemala, Honduras, Nicaragua y Salvador (Fanfani y Rossi, 1989, Hágsater y Salazar, 1990; Soto, *et al*, 1995; Espejo, *et al*, 2000; Glen, 2002; Dressler y Higgins, 2003; Becker, 2005; Bellone, 2006).

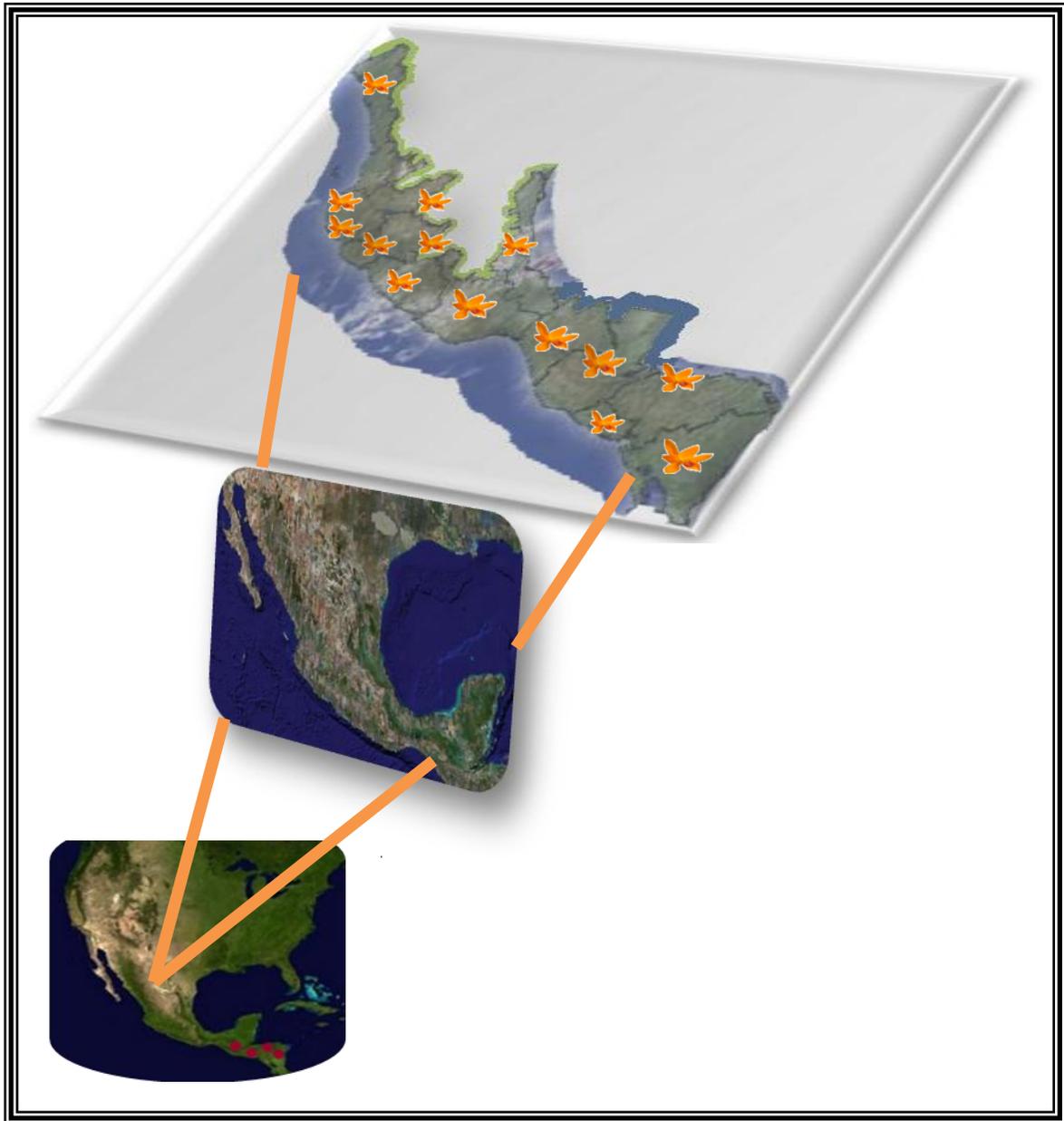


Fig. 15. Distribución de *Guaríanthe aurantiaca*

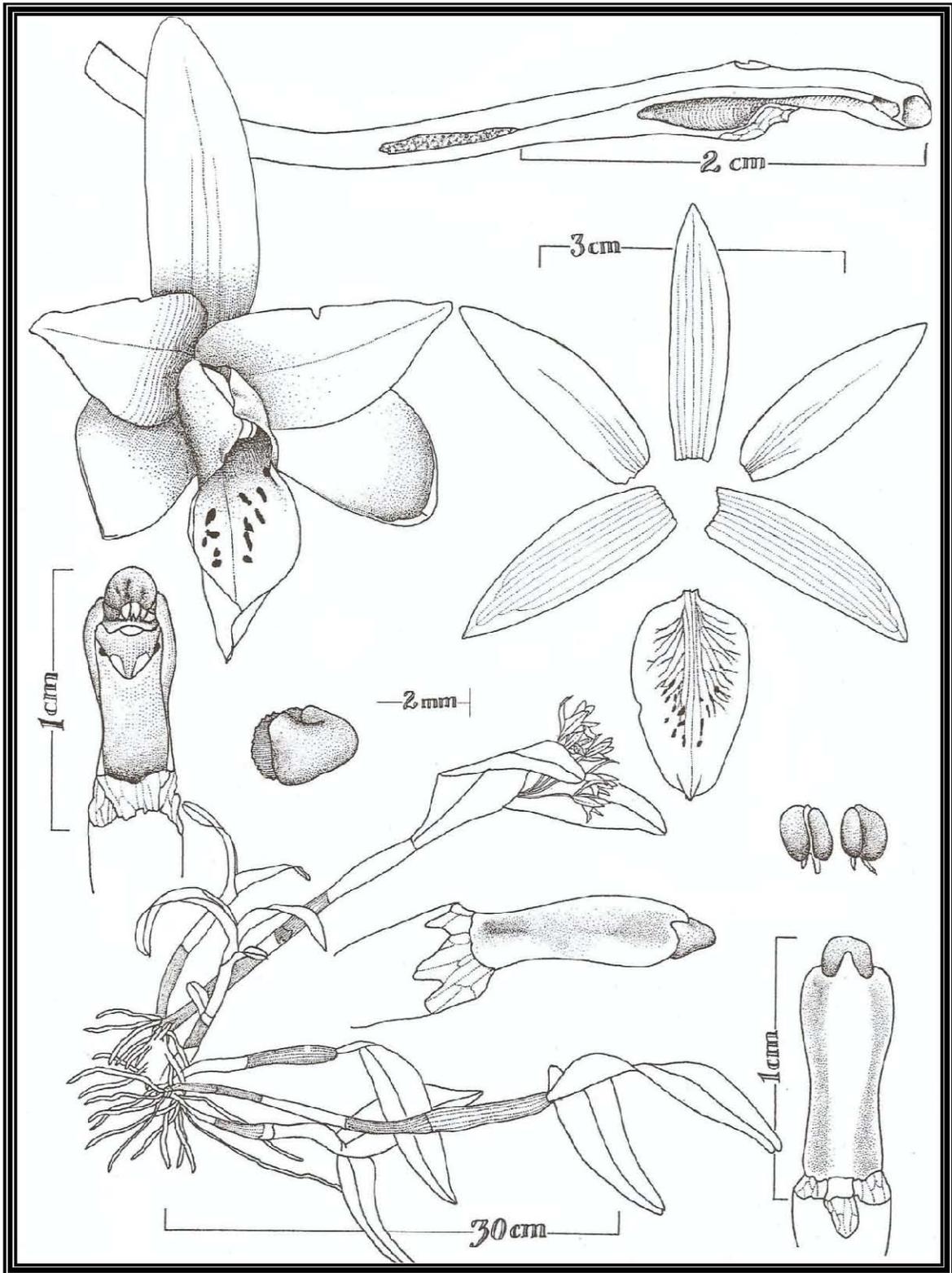


Fig. 16. Morfología de *Guarianthe aurantiaca* (Hágsater y Salazar, 1990).

9.2. *Euchile mariae* (Ames) Withner

Reino: Vegetal
División: Embryophyta Siphonogama
Subdivisión: Angiospermae
Clase: Monocotyledonae
 Orden: Microspermae
Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae
Subtribu: Laellinae
Género: *Euchile*
Especie: *Euchile mariae*



Fig. 17. *Euchile mariae*
 (Hágsater *et al.*, 2005.)

Sinónimos

Hormidium mariae (Ames) Brieger 1977
Phosthechea mariae (Ames) W. E. Higgins 1997
Encyclia mariae (Ames) Hoehne 1952

Basiónimo

Epidendrum mariae Ames 1937

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Planta: es una planta epífita, cespitosa, ascendente de 17-25 cm de alto incluyendo la inflorescencia. **Raíces:** subterrestres, flexuosas, blanquecinas de 0.8-2.5 mm de grosor. **Rizoma:** abreviado, oculto, hasta 8 mm de largo entre pseudobulbos contiguos de 6 mm de grosor. **Pseudobulbos:** agrupados, cónico-ovoides a subglobosos, verde glauco de 20-61 mm de alto, 13-28 mm de grosor; cuando jóvenes cubiertos por vainas fibrosas, fugaces, blanquecinas hasta de 42 mm de largo. **Hojas:** De 2-3 hojas apicales, oblongas o elíptico-oblongas, agudas conduplicadas en la base, coriáceas, glaucas, carinadas en el envés de 7-18.5 x 1.5 x 3.1 cm. **Inflorescencia:** en un racimo corto, erecto-arqueado de 5-27 cm de largo, 1.5-3 mm de grosor, con 1-5 flores; pedúnculo de 4-18 cm de largo, rollizo con 2-4 brácteas triangulares, agudas, amplexicaules, escariosas blanquecinas de 4-6 x 3.6 mm. **Brácteas florales:** abrazadoras, triangulares, agudas, escariosas blanquecinas de 2.7 x 2-3 mm de grosor; cunículo aparentemente seco, penetrando 4 mm en el apéndice del ovario. **Flores:** algo péndulas, grandes, 5-7.5 cm de diámetro (Figura 17, 18 y 20), tépalos subiguales, carnosos, cerosos, verde claro, verde olivo o verde amarillento, la superficie dorsal glauca, labelo blanco, de textura débil, con venas de color verde en la garganta y el disco; fragancia débil. **Sépalos:** extendidos, frecuentemente recurvados en los ápices de 7-9 nervados; el dorsal elíptico o oblanceolado (Figura 20), obtuso o agudo de 33-45 x 7.12 mm. Sépalos laterales elípticos a oblanceolados, obtusos o agudos de 31-44 x 7-12 mm. **Pétalos:** extendidos, oblanceolados o elíptico-oblanceolados, agudos, 7-nervados, de 33-43 x 5-9.5 mm. **Labelo:** de 47-75 x 30-51 mm (Figura 20), libre de la columna, panduriforme, formando dos lóbulos; más de la mitad del lóbulo basal infundibuliforme, envolviendo a la columna, con los márgenes sobrepuestos

sobre ella, sus ápices y el lóbulo distal extendido- deflexos, ápice del lóbulo distal profundamente emarginado, los márgenes ondulado-plegados; callos formado por 2 quillas longitudinales de 18-30 mm de largo, que limitan un canal angosto. **Columna:** de 17-21 mm de largo, 6-8 mm de ancho (Figura 20), recta, gruesa y masiva, trígona, el ápice con los márgenes ventrales proyectados, verticales, ampliamente flabelados pero sin formar alas definidas; con 2 quillas longitudinales prominentes en la superficie ventral y otras 2 quillas muy engrosadas, rugosas, en los márgenes basales de 7 mm de largo; el clinandrio con 3 dientes carnosos, truncados, subiguales el medio ligeramente más largo, más masivo y dentado-verrugoso. **Cavidad estigmática:** transversalmente elíptica-obcordiforme, excavada, los lóbulos laterales prominentes de 4.5-5 x 4.5-6 mm (Figura 20). Rostelo una lámina transversalmente semielíptica, convexa, con una proyección retrorsa donde se encuentra el viscario. **Antera:** transversalmente elipsoide-subcuadrada, algo bilobada, 4-locular de 2.8 x 2.8 mm. **Polinario:** con cuatro polinios ovoide- flabelados, lateralmente comprimidos de 1.7 x 1.3 mm, unidos a caudículas muy angostas, granuladas de 3 mm de largo. **Cápsula:** elipsoide, trígona, quillada sin alas 30-40 x 12-17 mm. Número cromosómico $2n=40$.



Fig. 18. *Euchile mariae*.

Época de Floración: Florece de primavera a otoño en los meses de abril a julio. Planta endémica del norte de México crece a una altitud de 800-1350 m.s.n.m., donde busca una orientación a la sombra. El clima de estas regiones es extremo, con una estación lluviosa en primavera y una estación seca en otoño e invierno. La temperatura media va de 17 a 19°C, pero durante el día puede subir a 30°C (Withner, 1998; Hágsater, 1999; Glen, 2002; Hágsater y Soto, 2003; Bellone, 2006; Lückel, *et al.*, 2006).

Estatus: Planta sujeta a protección especial (Norma Oficial Mexicana NOM- 59-SEMARNAT- 2010).

Distribución: En México se distribuye en Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sierra Madre Oriental (en la región de la Huasteca), Tamaulipas, y Veracruz (Ver Figura 19), (Withner, 1998; Hágsater, 1999; Glen, 2002; Hágsater y Soto, 2003; Bellone, 2006; Lückel, *et al.*, 2006).

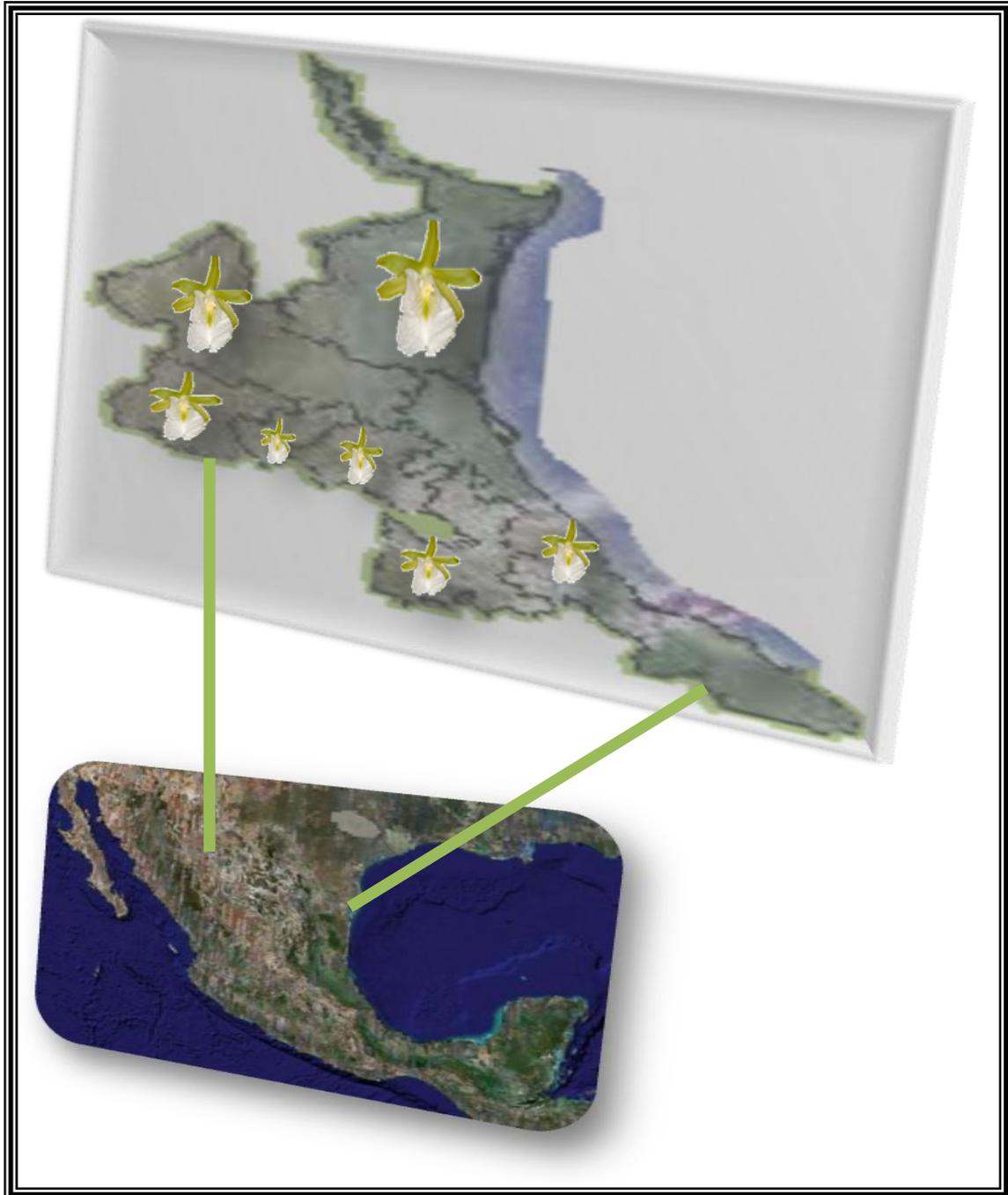


Fig. 19. Distribución de *Euchile mariae*

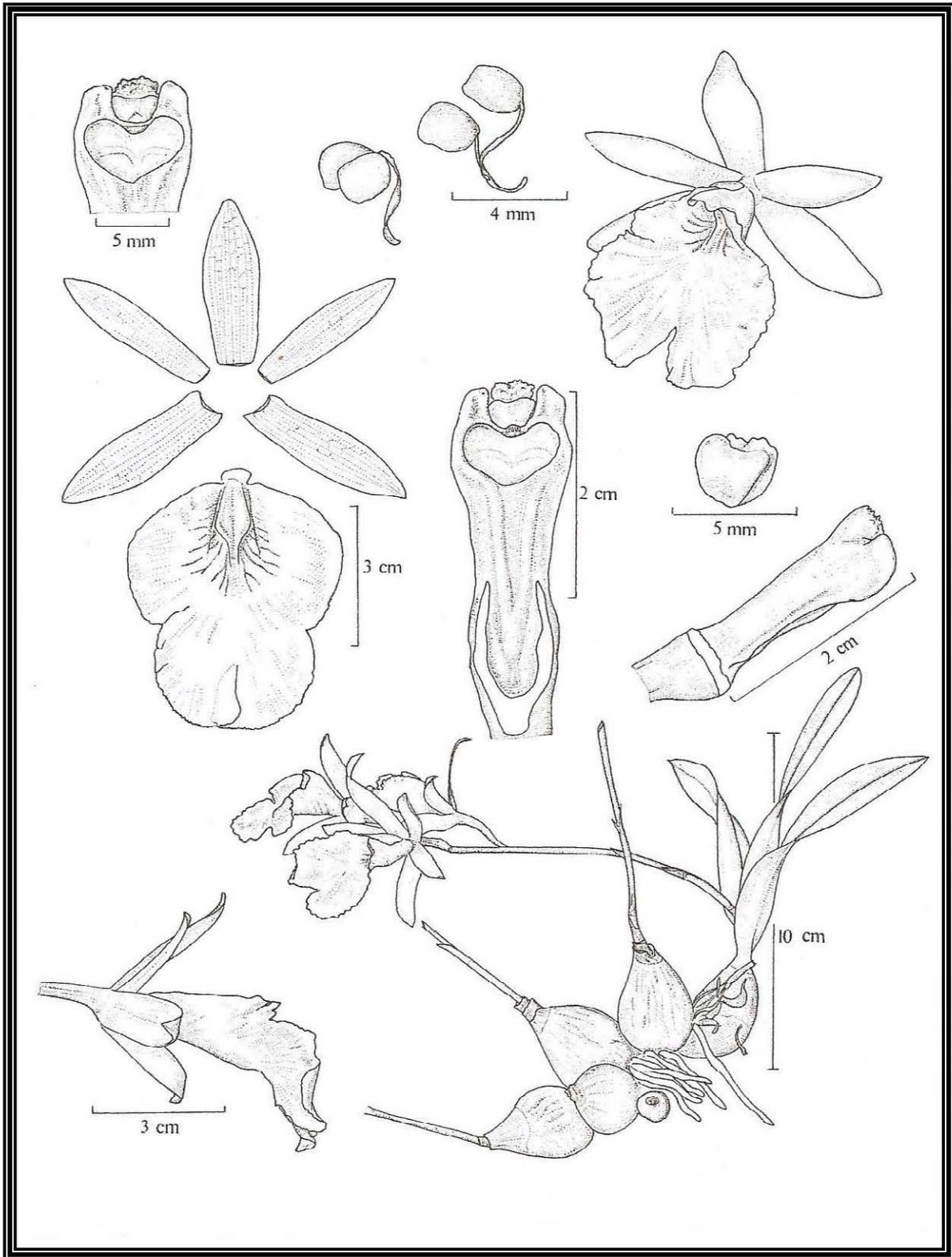


Fig. 20. Morfología de *Euchile mariae* (Hágsater y Soto, 2003).

9.3 *Euchile citrina* (La Llave et Lexarga) Withner

Reino: Vegetal
División: Embryophyta Siphonogama
Subdivisión: Angiospermae
Clase: Monocotyledonae
Orden: Microspermae
Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae
Subtribu: Laellinae
Género: *Euchile*
Especie: *Euchile citrina*



Fig. .21. *Euchile citrina*

Sinónimos

Cattleya citrina (Lex.) Lindl., 1826).
Epidendrum citrinum (La Llave et Lex) Rchb. F. 1862
Encyclia citrina (Llave et Lex. Dressler 1961)
Prosthechea citrina (Lex. 1998).
Cattleya karwinskii (Mart., 1830).
Cattleya sulfurina (Lem., 1854).
Hormidium citrinum (La Llave et Lex 1961).

Basionimo

Sobralia citrina (Lex., 1825).

2.7.3.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Planta: Hierba epífita, cespitosa, péndula, de 15 a 30 cm de largo. **Raíces:** subterrestres, flexuosas, blanquecinas de 0.8-2.5 mm de grosor. **Pseudobulbos:** agrupados, cónico-ovoides a fusiforme-ovoides, ligeramente lateralmente aplanados, cubiertos por vainas escariosas, blanco-traslúcidas de 4 a 6 cm de longitud con dos péndulos de 20 cm de largo, de 1 a 2 cm de ancho, glaucos, cubiertos completamente por brácteas papiráceas. **Hojas:** glaucas, colgantes de 20 x 25 cm, terminales, elípticas, de color verde-gris, de 1 a 2.7 cm de ancho, agudas. Estas están en grupos de dos a veces de tres o de cuatro en el extremo de los pseudobulbos. **Flores:** colgantes (Figura 21,

22 y 24), una o dos sobre el tallo, dispuestas en racimos péndulos, grandes miden de 5 a 7.5 cm de diámetro, de 2 a 4 brácteas amplexicaules, papiráceas, triangular-acuminadas de 0.7 a 2 cm de largo, progresivamente más cortas hacia el ápice; brácteas florales mucho más pequeñas que el ovario, abrazadoras, papiráceas, triangulares, de 2 a 3 mm de grosor, ensanchado hacia el ápice; tallo 10 cm de largo, de un amarillo limón a un amarillo canario, carnosas, cerosas, aromáticas, muy vistosas, nunca se abren totalmente, con un perfume dulce y agradable. **Sépalos:** entreabiertos, elípticos a elípticolanceolados de 4 a 5 cm de largo de 11 a 14 mm de ancho, obtusos a agudos, los laterales más angostos. **Pétalos:** entreabiertos, elíptico a elíptico-obovados, de 4 a 4.5 cm de largo, de 14 a 17 mm de ancho (Figura 24), agudos. **Labelo:** trilobado, de 40 a 45 mm de largo, de 30 a 38 mm de ancho (Figura 24), ovado en forma general; lóbulos laterales abrazando a la columna, transversalmente elípticos, margen entero, ligeramente ondulado; lóbulo medio cuadrado u ovado, obtusa a redondeado, margen ondulado a eroso; disco tricarinado, las carinas prolongándose a todo lo largo del labelo; color amarillo, bordeado de blanco, con finas venas verdes en el centro, y con el extremo fruncido. **Columna:** recta, subclaviforme, de 20 a 27 mm de largo, con 3 dientes carnosos, oblongos, truncados, el diente ligeramente más largo que los laterales. **Antera:** transversalmente elipsoide-subcuadrada, algo bilobada, 4-ocular de 2.8 x 2.8 mm. **Cápsula:** elipsoide a subglobosa, de 6 a 6.5 cm de lago, de 30 a 35 mm de grosor, de sección triangular, no ornamentada.

Época de Floración: Su época de floración se presenta en los meses de abril a julio. Crece en los bosques de encino, pino- encino. El clima es templado de 15 a 22°C, pero con grandes diferencias entre el día y la noche, una estación seca de noviembre a abril y la presencia frecuente de niebla. La planta crece en luz intensa pero indirecta.

Distribución: Esta especie se distribuye del oeste de México, conocida en el municipio Puente de Ixtla, crece a una altitud aproximada de 1300-2500 m.s.n.m., en climas sometidos a un periodo de sequía de seis meses. Necesita humedad elevada durante el crecimiento.

Estatus: Especie amenazada (Norma Oficial Mexicana NOM- 59-SEMARNAT- 2010).



Fig. 22. *Euchile citrina*

Distribución: En México se distribuye en Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sierra Madre Oriental (en la región de la huasteca), Sinaloa, Tamaulipas, y Veracruz (Ver Figura 23), (Withner, 1998; Hágsater, 1999; Espejo, *et al*, 1999; Espejo, *et al*, 2002; Glen, 2002; Bellone, 2006; Lückel, *et al.*, 2006; Lecoufle, 2006).



Fig. 23. Distribución de *Euclyptus citrina*

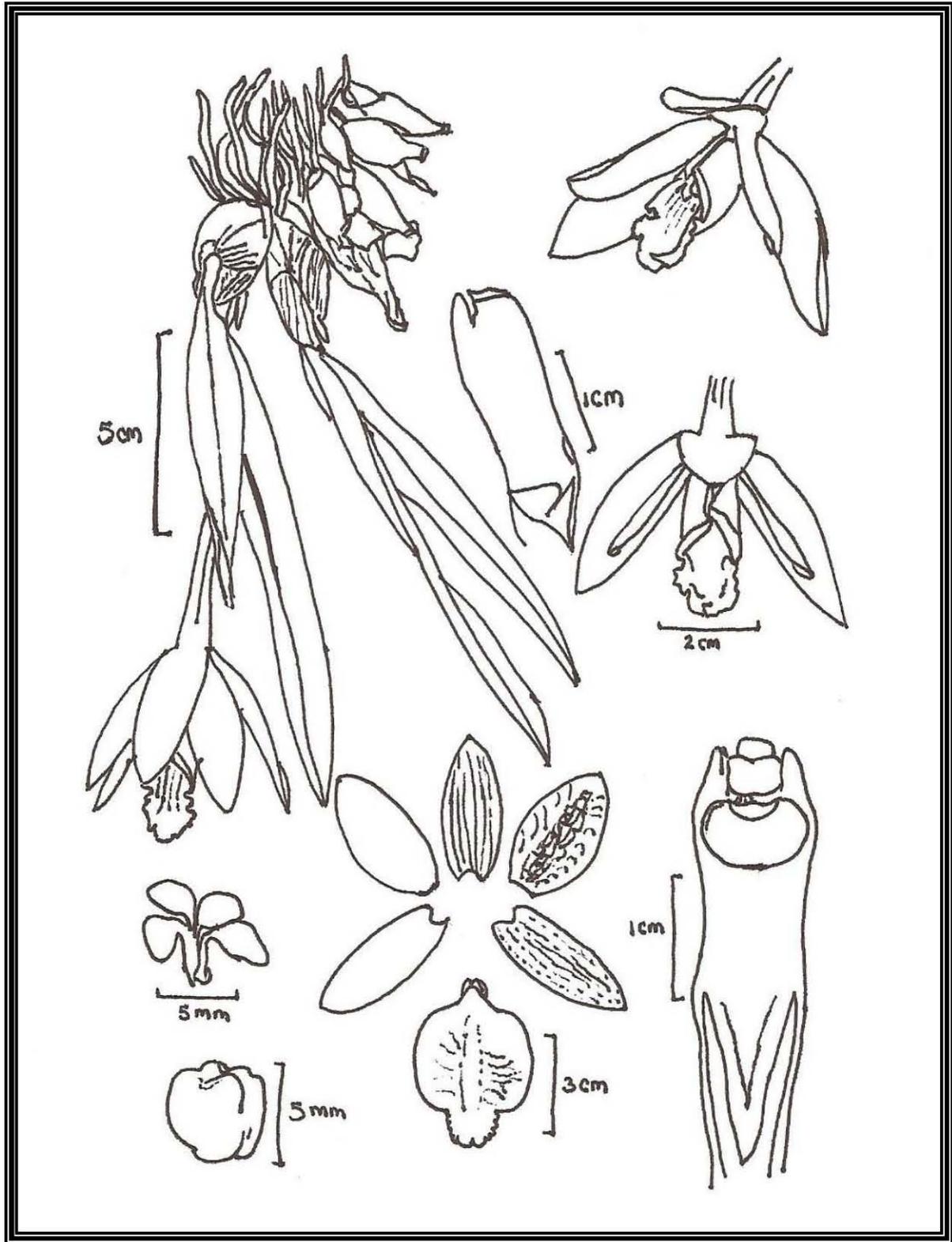


Fig. 24. Morfología de *Eucalyptus citrina* (Espejo *et al.*, 2002).

En las revisiones bibliográficas realizadas en diferentes bases de datos tanto digitales como impresas, no se encontraron reportes para la especie de *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, sobre su germinación asimbiótica *in vitro* con medios suplementados con extractos fúngicos. Solo existen algunos estudios con medios nutritivos adicionados con endospermo de coco, pulpa de plátano, jitomate etc., con la especie *Guarianthe aurantiaca* (Withner y Krieger 1985; Rubluo, *et al*, 1989).

No existe ningún estudio de la germinación asimbiótica *in vitro* con extractos naturales del híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Este trabajo se planteó como fin aportar información acerca del efecto inductor o inhibidor de la germinación asimbiótica *in vitro* de extractos de origen fúngico suplementados a los medios nutritivos durante el cultivo de semillas de las orquídeas *Euchlie mariae* x *Euchile citrina* y *Guarianthe aurantiaca*.

JUSTIFICACIÓN

La aplicación de técnicas de propagación masiva *in vitro* en especies de orquídeas silvestres expuestas a sobrecolecta es especialmente importante. Las especies de gran demanda comercial pueden ser producidas y puestas en el mercado, disminuyendo así la presión de colecta sobre las poblaciones naturales. La germinación asimbiótica *in vitro* de especies de orquídeas amenazadas es una forma viable de producir masivamente plantas para su comercialización y restablecimiento de poblaciones en su hábitat natural. Las investigaciones han demostrado que esto es factible (Stenberg y Kane, 1998).

Debido a que el éxito de la propagación *in vitro* de orquídeas depende de la elección del medio de cultivo adecuado y de su composición química, es obligado ensayar o experimentar con nuevos componentes que mejoren la germinación e incrementen el crecimiento de las plántulas *in vitro*. Diversos extractos naturales de composición indefinida han sido empleados para enriquecer los medios de cultivo para algunas especies de orquídeas y éstos han mejorado la respuesta *in vitro*.

Frecuentemente se han empleado pulpa de plátano, endospermo líquido de coco, jugo de tomate, extracto de papa, jugo de piña, entre otros (Withner y Krieger 1985; Rubluo *et al*, 1989); sin embargo, no hay reportes de estudios del efecto en la germinación asimbiótica de semillas, de medios de cultivo preparados con extractos de hongos basidiomicetos, los cuales se caracterizan por tener múltiples y diversas sustancias como aminoácidos, minerales, vitaminas, azúcares entre otras, las cuales pueden afectar favorablemente la germinación y el desarrollo *in vitro*.

A pesar de que la especie de orquídea *Guarianthe aurantiaca* esta sujeta a protección especial y se carece de información de *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, su estudio ha sido inapreciable en relación a su biología básica y a su proceso de germinación asimbiótica *in vitro*. Por lo anterior resulta relevante explorar el efecto de los extractos de hongos Basidiomicetos como suplementos del medio de cultivo utilizado para la germinación y desarrollo de las plantas *in vitro* de estas especies.

HIPÓTESIS

❖ Si los hongos Basidiomicetos comestibles contienen una gran variedad de sustancias nutritivas como vitaminas, minerales, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, entre otras; entonces al adicionar extractos de éstos a un medio de cultivo básico, se podrá ver afectado el proceso de germinación y el desarrollo de plántulas cultivadas *in vitro* de las orquídeas *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

OBJETIVOS

GENERAL

❖ Conocer el efecto de extractos de hongos Basidiomicetos comestibles agregados al medio de cultivo, en la germinación asimbiótica y desarrollo *in vitro* de las orquídeas *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

PARTICULARES

❖ Conocer si los extractos de hongos adicionados al medio nutritivo promueven o inhiben la germinación.

❖ Conocer el efecto de los extractos fúngicos en diferentes concentraciones en la germinación de ambos taxones.

❖ Evaluar el efecto de los extractos de hongos sobre el desarrollo plantular.

MATERIAL Y MÉTODO

Como material biológico se emplearon semillas de las orquídeas *Guarianthe aurantiaca* y del híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, obtenidas de capsulas cerradas (Ver cuadro II) y sanas (Figura 25) provenientes de plantas de orquídea de la colección viva de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM). Las cápsulas colectadas se almacenaron (Ver cuadro II) para su conservación en un desecador con cloruro de calcio anhidro a una temperatura de 7 °C. Las cápsulas se lavaron con agua corriente y se abrieron con un bisturí haciendo un corte longitudinal liberando las semillas con una espátula (Figura 26). Se colocaron en un vial y se almacenaron dentro de un desecador y en refrigeración, para conservarlas. Se realizaron las evaluaciones de la viabilidad con cloruro de trifenil tetrazolio (TTC).



Fig. 25. Capsula de orquídea



Fig. 26. Cápsula de orquídea con las semillas expuestas

1.-PREPARACIÓN DE EXTRACTOS FÚNGICOS

Los hongos de estudio; *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis*, se adquirieron en estado fresco y maduro (Ver Anexo I). Se lavó cada hongo con agua corriente para eliminar restos orgánicos, polvo, tierra, insectos, etc. Se secaron y pesaron para establecer el peso fresco. Después se colocaron en canastillas de aluminio (Figura 27) e introdujeron a una estufa con una temperatura entre 60 y 70 °C, para deshidratarlos. Se mantuvieron en la estufa hasta obtener un peso constante (peso seco). También se obtuvo el porcentaje de rendimiento de cada especie. $\text{Peso fresco} - \text{Peso deshidratado} = \text{Peso seco}$ (Biomasa).



Fig. 27. Deshidratación de los hongos

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

TABLA 1.- PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS HOGOS DE ESTUDIO.

Especies	Peso fresco	Peso seco	% de rendimiento
<i>Agaricus bisporus</i>	1000 g	956.2 g	95.62 %
<i>Pleurotus ostreatus</i>	669.4 g	640 g	95.60 %
<i>Ustilago maydis</i>	705.7 g	558 g	79.07%

Los hongos deshidratados, se trituraron (cada especie por separado) en un mortero de porcelana (Figura 28). Una vez que se pulverizaron, se almacenaron en frascos de vidrio tapados y etiquetados. Se almacenaron a temperatura ambiente.



Fig. 28. Trituración de los hongos

En la preparación (Ver cuadro II, III, Tabla 2 y Apéndice II) del medio de cultivo se prepararon tres grupos de medios experimentales; *uno con las sales basales del medio nutritivo “Knudson C” únicamente (Ver cuadro III, Tabla 2 y Apéndice I y II); otro **con las sales basales del medio nutritivo “Knudson C” adicionadas con los concentrados fúngicos experimentales de las tres especies de hongos, en las concentraciones de 5, 10 y 15 ml/L (Ver cuadro III, Tabla 2 y Apéndice I y II); y ***finalmente se preparó otro grupo experimental sin las sales basales del medio nutritivo “Knudson C”, solo con los concentrados fúngicos de las tres especies de los hongos(Figura 30), en las concentraciones de 5, 10 y 15 ml/L (Ver cuadro III, Tabla 2 y Apéndice I y II).



Fig. 29. Preparación de los extractos

Se vertieron los medios experimentales en tubos de ensaye con tapa y se esterizaron en autoclave a 121°C y 1.5 atmósferas de presión durante 15 minutos.

En total se prepararon 19 tratamientos experimentales (Ver cuadro II, Tabla 2 y Apéndice I y II) para evaluar la germinación asimbiótica *in vitro* de *Guarlanthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

2.- EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS

Se realizó la evaluación de la viabilidad de las semillas de la especie *Guarlanthe aurantiaca* y del híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* (Ver Cuadro II), con el método bioquímico del TTC (2, 3,5 cloruro de trifeníl-tetrazolio) desarrollado por Läkön en 1949 (Moreno, 1984).

Se hicieron lotes de 100 a 200 semillas y se colocaron en sobres de papel filtro de 2 x 2 cm, humedeciéndolos con agua destilada estéril. Se sumergieron en 20 mL de etanol al 70% por 10 minutos con agitación continua. Posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 0.5 % v/v, con una gota de jabón líquido, agitando constantemente por un periodo de 10 a 15 minutos (Velázquez 1997).

Posteriormente, los sobres con semillas se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril hasta eliminar la solución de hipoclorito de sodio. Cada uno de los sobres se colocó en una caja Petri con una solución de TTC al 1%, (24 a 72 horas) en oscuridad absoluta a una temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pasado el tiempo de incubación, se prosiguió a abrir los sobres y observar en el microscopio estereoscópico las semillas teñidas, no teñidas y vanas (Figura 29) para así obtener el porcentaje de viabilidad (Moreno, 1984).

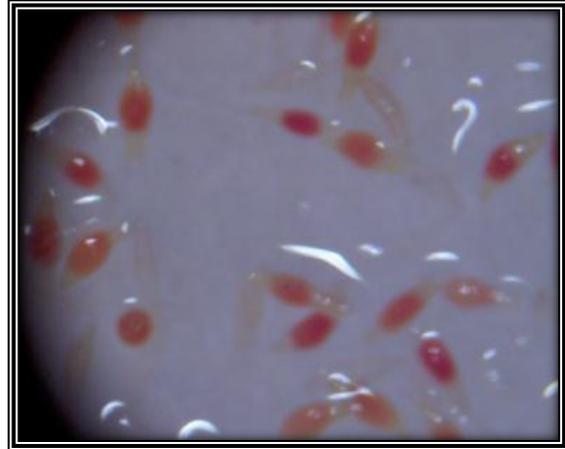
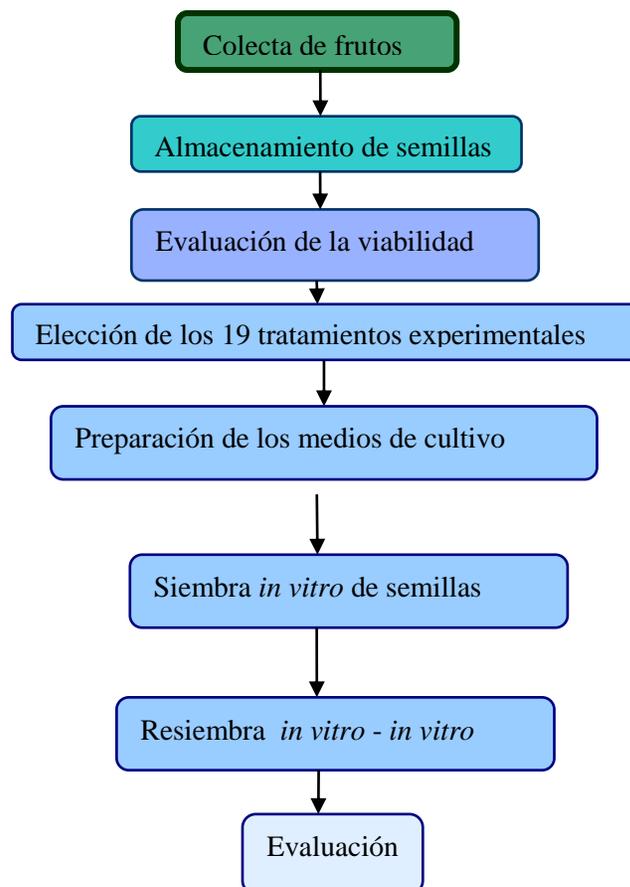


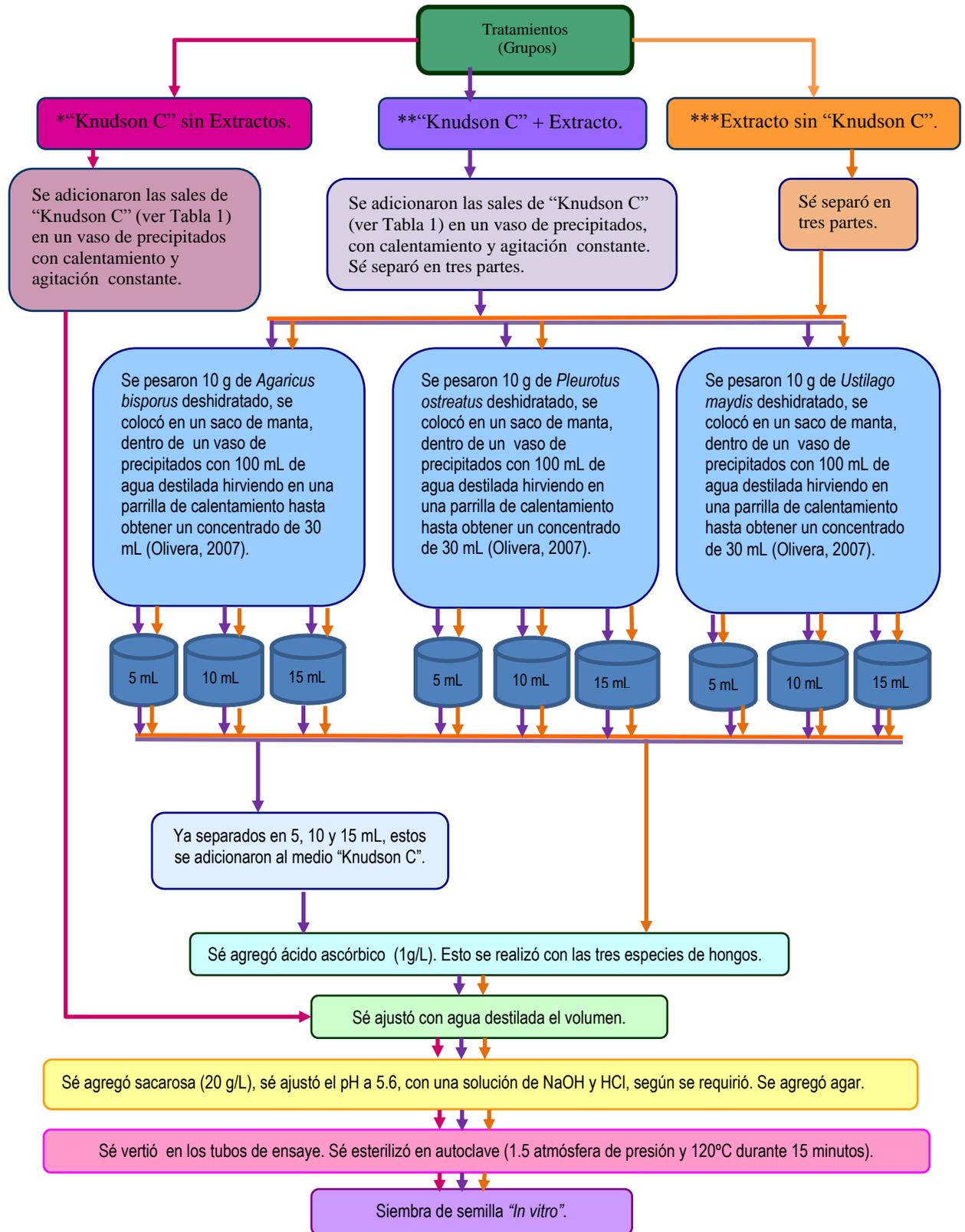
Fig. 30. Evaluación de la viabilidad.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Semillas teñidas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

CUADRO II.- METODOLOGÍA GENERAL



UADRO III.- MEDIOS DE CULTIVO EXPERIMENTALES



3.-SIEMBRA *IN VITRO*



Fig. 31. Campana de flujo laminar de aire

La siembra de las semillas (Ver cuadro II) se efectuó en una campana de flujo laminar de aire (Figura 31). Previo al procedimiento de siembra se desinfectó la campana con etanol al 70% y se colocó una lámpara de luz ultravioleta durante 15 minutos, para asegurar una mejor asepsia. Todos los materiales que se utilizaron (cubre boca, papel aluminio, material quirúrgico, etc.) se esterilizó en autoclave. El instrumental quirúrgico (pinzas y bisturíes) se lavó y flameó con etanol al 70%.

Se colocaron de 100 a 200 semillas de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* en sobres de papel filtro de 2 x 2 cm, sujetadas con un clip. En un vaso de precipitados con H₂O destilada se colocaron los sobres. Se agitó constantemente durante 5 minutos, se eliminaron las burbujas de aire y decantó. Los sobres se sumergieron en 20mL de etanol al 70% por 10 minutos, agitando constantemente, se decantó totalmente el etanol. Se agregó la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.6 % v/v con una gota de jabón líquido y los sobres se sumergieron durante 15 minutos. Se enjuagaron los sobres cinco veces con agua destilada estéril hasta eliminar totalmente la solución desinfectante.

Se colocó un paquete de semillas en cada tubo de ensaye con medio de cultivo experimental con la ayuda de una pinza de disección, se extendió sobre el medio, se flameó la tapa y se tapó el tubo, se volvió a flamear y se selló con plástico adherente "Egapack". Se hicieron 10 repeticiones por tratamiento. Se colocaron los tubos en una cámara de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad (con lámparas fluorescentes Philips, de 59 watts) a una temperatura de 23 °C.

Para la siembra de semillas de *Guarlanthe aurantiaca*, se siguió este mismo procedimiento que para el híbrido. Excepto que las semillas se dejaron en 20mL de etanol al 70% por 5 minutos, ya que la testa de las semillas es más delgada.

Se realizaron trasplantes *in vitro-in vitro* (Ver Cuadro II), cada dos meses para evitar efectos deletéreos en el desarrollo provocados por la deshidratación o agotamiento del medio, siempre utilizando la misma composición del medio del cual provenían (Figura 32 y 33). El trasplante se llevó a cabo en un ambiente aséptico, en la campana de flujo laminar de aire estéril.



Fig.32. Extracción de plantas para trasplante



Fig. 33. Trasplante de plantas

Se colocaron los tubos trasplantados en la cámara de incubación (Figura 34) con las condiciones previamente establecidas de iluminación y temperatura.



Fig.34. Cámara de incubación.

4.-ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se evaluaron 10 individuos por tratamiento, se eligieron dos tubos de ensaye para cada evaluación (evaluando 5 individuos por tubo) los cuales se eligieron aleatoriamente, y se utilizaron los mismos tubos para todas las evaluaciones. Se registró el máximo desarrollo que se presentó en cada tubo en cada revisión. El proceso de germinación en las orquídeas comprendió varios estadios, los cuales presentaron diferencias morfológicas en el embrión, que iban indicando el inicio y desarrollo de cada una de las estructuras que dieron lugar a una planta completa. En algunos casos este proceso se interrumpió en algún estadio por alguna(s) circunstancia(s) que no permitieron que la morfogénesis de la planta llegara a término, considerando así que el desarrollo no se completó. La ruta morfogénica seguida durante la germinación fue de fases consecutivas de desarrollo, evaluándose el momento de cambio de fase y la velocidad de desarrollo.

El registro de datos se llevó a cabo mediante una revisión semanal. *Guarianthe aurantiaca* se evaluó durante 230 días, y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* la evaluación se llevó a cabo aproximadamente durante siete meses, registrando los cambios de fase y el desarrollo de las plántulas (Ver Anexo II). Se llevó a cabo el registro fotográfico de cada una de las fases morfológicas observadas (Ver Tabla 3 y Apéndice III y IV).

Se aplicó un ANOVA a los diferentes valores numéricos de las fases (estadios de desarrollo) para cada una de las orquídeas y así establecer diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos experimentales (Ver Anexo II y III). Se aplicó el programa Statgraphics V plus. 5.1 y se comparó con una prueba de Fisher (Ver anexo IV).

Estadio	Fase
1	Semilla
2	Embrión hinchado
3	Protocormo
4	Protocormo con rizoides
5	Plántula con primordio de hoja
6	Plántula con hoja
7	Plántula con primordio de raíz
8	Planta con raíz
9	Planta con raíz y rizoides

Tabla 3.- Fases morfológicas evaluadas.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1.- DESARROLLO ONTOGÉNICO

La viabilidad de las semillas de orquídeas de *Guarlanthe aurantiaca* fue del 68% y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* obtuvo el 71.4%, considerando la cantidad de semillas producidas en una cápsula, es un porcentaje alto. Rasmussen (1995) reporta que la viabilidad de las semillas en las diferentes especies de orquídeas varía considerablemente entre cada una. Al respecto Koopowitz y Thomhill (citados por Hicks, 2000), reportaron en un estudio que el 95% de la viabilidad en semillas de *Encyclia vitelina* se mantuvo después de estar almacenadas 10 años, por otra parte las semillas de *Govenia capitata* con una viabilidad del 100% redujeron en menos de treinta días su viabilidad a 0 % almacenadas bajo condiciones ambientales.

El desarrollo ontogénico desde la siembra de la semilla hasta la formación de plantas completas duró 227-230 días, registrando 9 estadios (fases) morfológicos, los que se describen a continuación (Ver Apéndice III).

Estadio 1. Semilla.

Estadio inicial en el cual la semilla proviene del fruto y tiene una forma alargada con los extremos redondeados, con una testa de color pardo claro a amarillento y translúcida en la que se observa el embrión de forma ovoide, color pardo claro, localizado en la parte central, ocupando un 30% del espacio dentro de la semilla (Ver Apéndice III).

Estadio 2. Embrión hinchado.

El embrión presentó un aumento de tamaño y volumen, su tonalidad se tornó más clara. Hay ruptura de la testa debido al aumento de las dimensiones del embrión por imbibición. El embrión se desprendió de la testa (Ver Apéndice III).

Estadio 3. Protocormo.

Estructura con forma ovoide, más grande que el embrión, con epidermis color verde (Ver Apéndice III).

Estadio 4. Protocormo con rizoides.

Con una superficie lisa de color verde. Presenta apicalmente una protuberancia. Con rizoides rectos y simples cubriendo una franja (Ver Apéndice III).

Estadio 5. Plántula con primordio de hoja.

El protocormo de forma ovoide con rizoides origina un primordio foliar en la región apical de coloración verde (Ver Apéndice III).

Estadio 6. Plántula con hoja.

Se inicia el desarrollo de las hojas (Ver Apéndice III).

Estadio 7. Plántula con primordio de raíz.

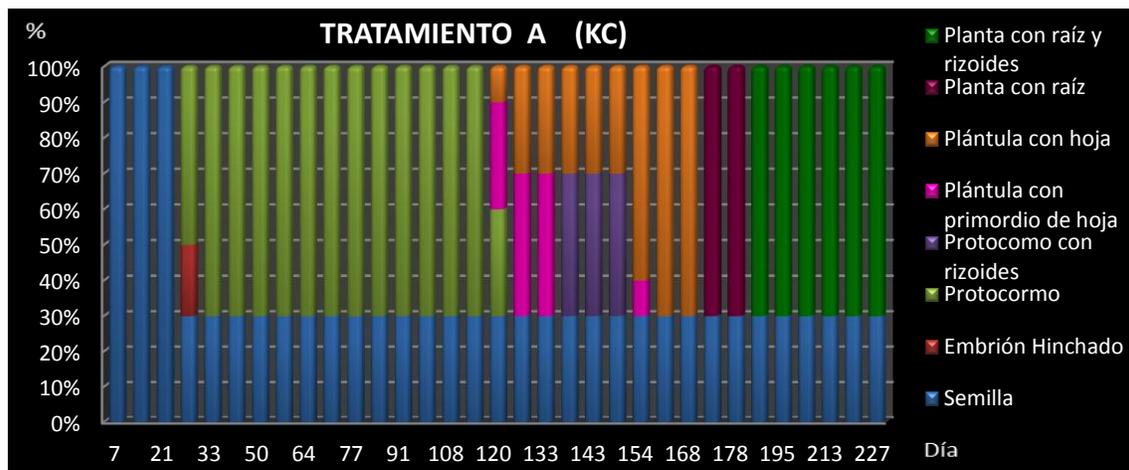
Se desarrolla la plántula y se origina un primordio de raíz en la región basal (Ver Apéndice III).

Estadio 8. Planta con raíz.

Origen de la planta completa debido a que se desarrolla una raíz verdadera fotosintéticamente activa (Ver Apéndice III).

Estadio 9. Planta con raíz y rizoides.

Planta completa en la cual se desarrollaron rizoides en las raíces (Ver Apéndice III).

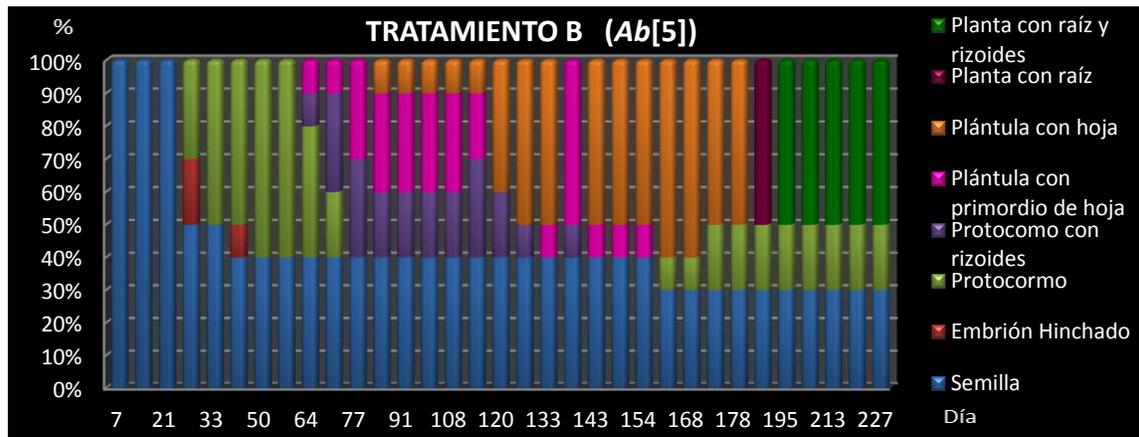
2.- GERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO.**I.- *Guarlanthe aurantiaca*.****1.- Efecto en la germinación de semillas de *Guarlanthe aurantiaca* en el medio nutritivo “Knudson C”.**

Gráfica 1.- Estados de desarrollo con “Knudson C” (Testigo).

El tratamiento A se utilizó como testigo (sales de “Knudson C”), donde el estadio de semilla perduró durante los 227 días de la evaluación. Es claro que el 70% de las semillas que iniciaron el estudio llegó a su máximo desarrollo, obteniéndose plantas completas (Ver Figuras 43-48).

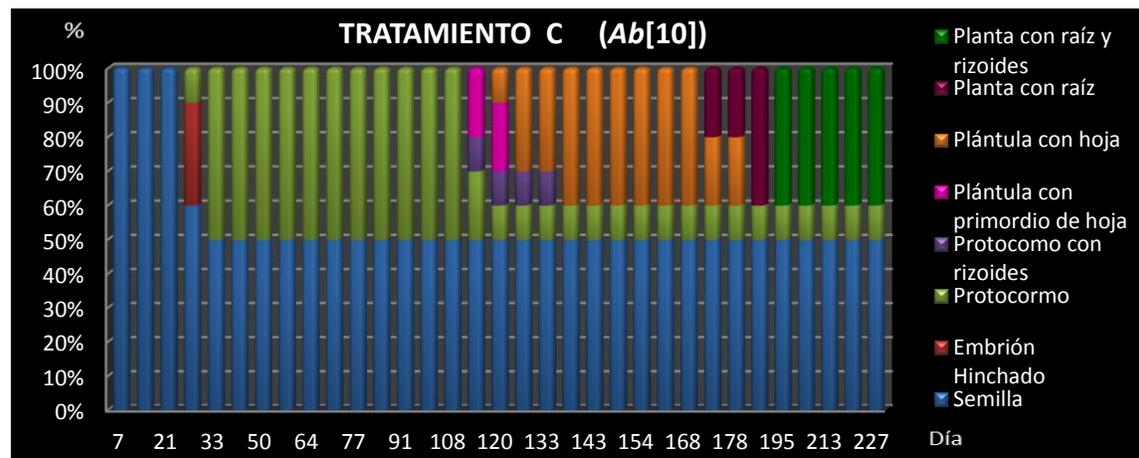
2.- Efecto en la germinación de semillas de *Guarjanthe aurantiaca* de la adición de extractos de origen fúngico y sin la presencia del medio nutritivo “Knudson C”.

A.- *Agaricus bisporus*



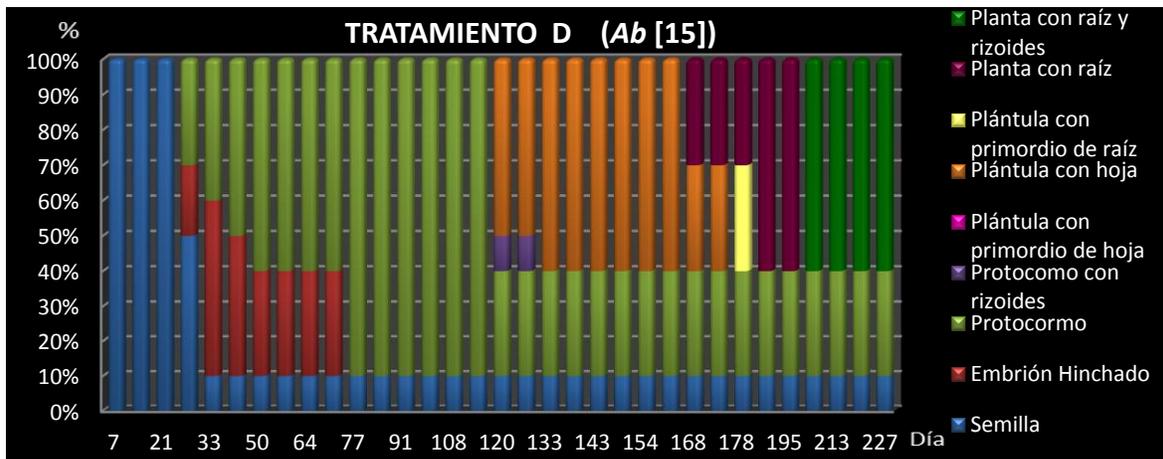
a.- Gráfica 2.- Estados de desarrollo con concentración 5 mL.

El estadio de semilla no evoluciona en un porcentaje importante durante toda la prueba en ninguno de los tres tratamientos B, C y D, sobre todo en el B y C (30 y 50%). Desde el día 64 hasta el 110, se presentaron cuatro estadios a la vez, en el final del estudio coinciden tres estadios. El tercer estadio que es el de protocormo, se inició a los 27 días y permaneció hasta el final del estudio. El estadio más avanzado se alcanzó a los 195 días y duró 32 días (Ver Figuras 35, 38 y 44).



b.- Gráfica 3.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

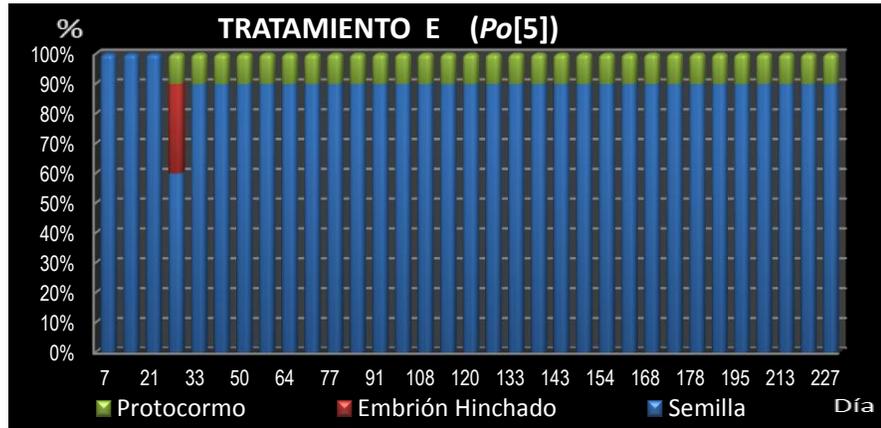
En el tratamiento C el estadio de semilla estuvo presente toda la evaluación. El tercer estadio (protocormo) inició a los 27 días y duró 200 días desde su inicio hasta el final del estudio. El noveno estadio (planta con raíz y rizoides) inició a los 195 días, alcanzándolo el 40 % de los individuos de estudio, siendo menor que el tratamiento B (50 %) (Ver Figuras 35,38 y 44).



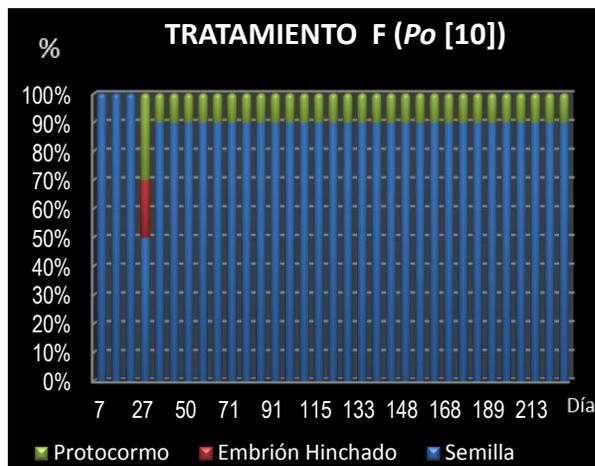
c.- Gráfica 4.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

En la gráfica 4 al comparar este tratamiento (D) con los dos anteriores (B y C) es evidente que indujo un mejor resultado ya que el 90 % de las semillas cambiaron de fase. El 30% de los individuos se mantuvo en el estadio de protocormo. Por otra parte, el cambio de fase rápido lo obtuvo el estadio de plántula con primordio de hoja, ya que no se logró observar en toda la evaluación.

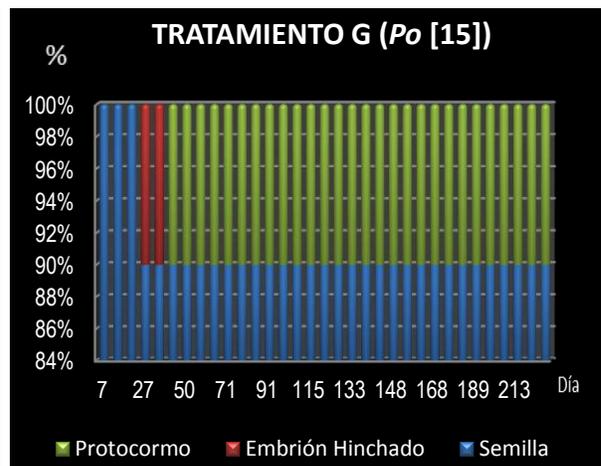
Con respecto al estadio más avanzado, en este tratamiento obtuvo un mejor porcentaje (60 %) de individuos. Por otra parte, en las tres concentraciones se alcanzó el máximo estadio de desarrollo. La concentración más alta fue más eficiente (Ver Figuras 35, 38 y 44).

B.- *Pleurotus ostreatus*

a.- Gráfica 5.- Estados de desarrollo con Concentración 5 mL.

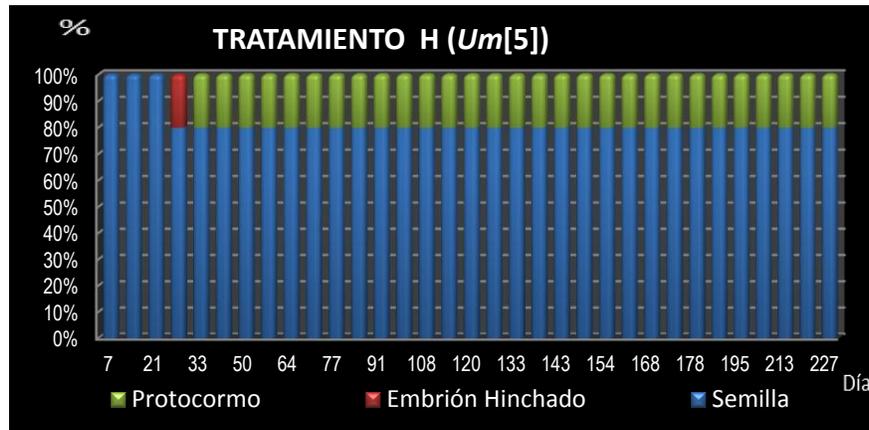


b.- Gráfica 6.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL (Tratamiento F).

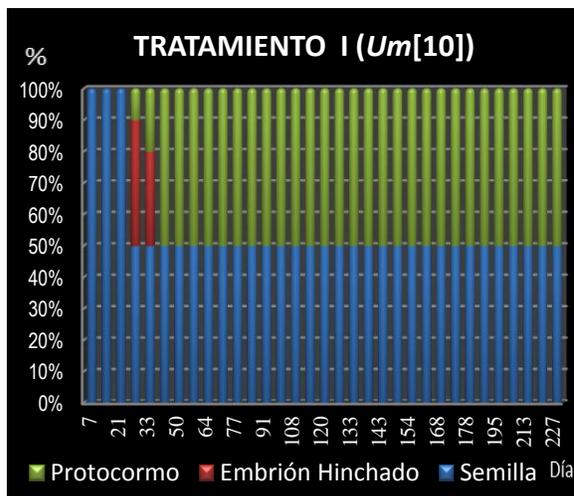


c.- Gráfica 7.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL (Tratamiento G).

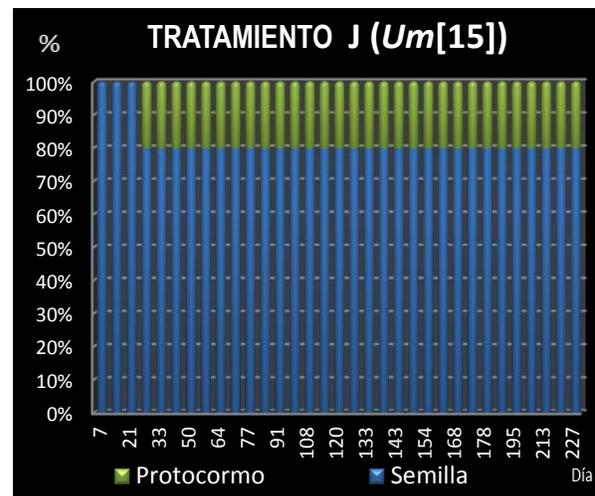
En los tratamientos con extractos de *Pleurotus ostreatus* en sus concentraciones 5,10 y 15mL/L (Gráficas 5, 6 y 7) el estadio de semilla permaneció hasta el final de la evaluación en un muy alto porcentaje, y el estadio de protocormo lo alcanzó sólo el 10% de individuos en las tres concentraciones, permaneciendo éste toda la evaluación. Las semillas de orquídea en un ambiente natural, llegan al estadio de protocormo, por lo anterior se puede decir que *P. ostreatus* tiene efecto deletéreo (Ver Figuras 40 y 46).

C.- *Ustilago maydis*

a.- Gráfica 8.- Estados de desarrollo con concentración 5 mL.



b.- Gráfica 9.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL (Tratamiento I).

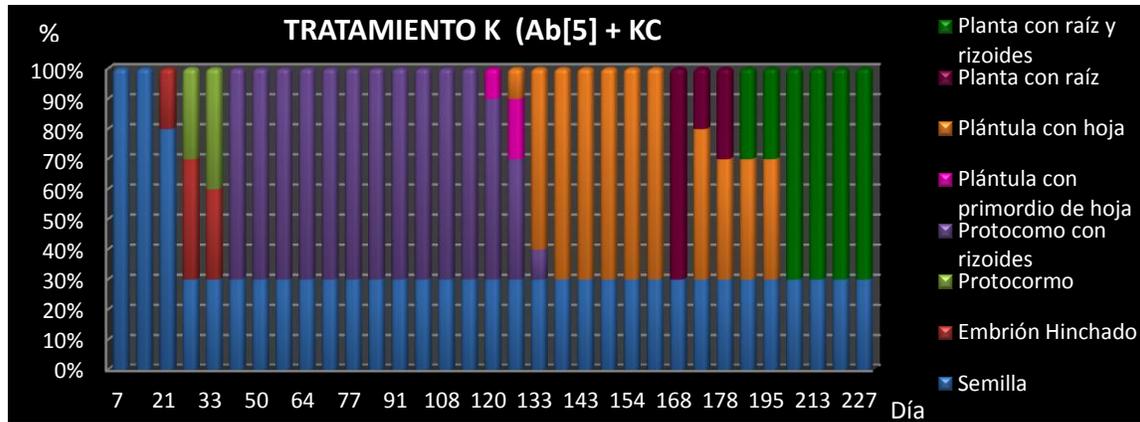


c.- Gráfica 10.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL (Tratamiento J).

En las gráficas 8, 9 y 10 se observa que el estadio de semilla en las tres concentraciones adicionales de extracto de *Ustilago maydis*, permaneció en toda la evaluación, la diferencia fue el porcentaje. El estadio de protocormo se desarrolló el 20%, en las concentraciones 5mL y 15mL, permaneciendo hasta la última evaluación, comportándose de manera similar. Este medio en sus tres concentraciones no le proporcionó los nutrientes necesarios para completar la germinación. (Ver Figuras 42 y 48).

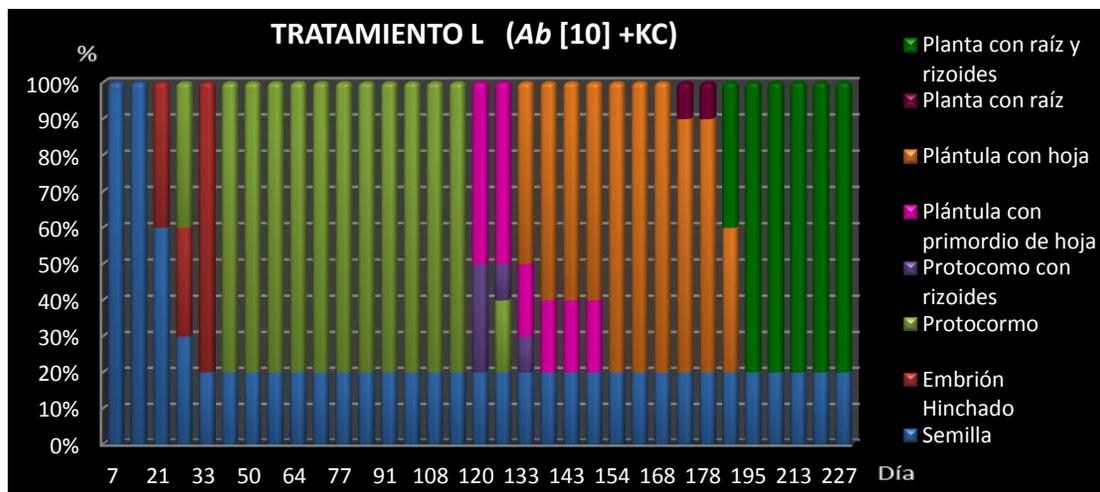
3.- Efecto en la germinación de semillas de *Guarianthe aurantiaca* de la adición de extractos de origen fúngico al medio nutritivo “Knudson C”.

A.- *Agaricus bisporus*



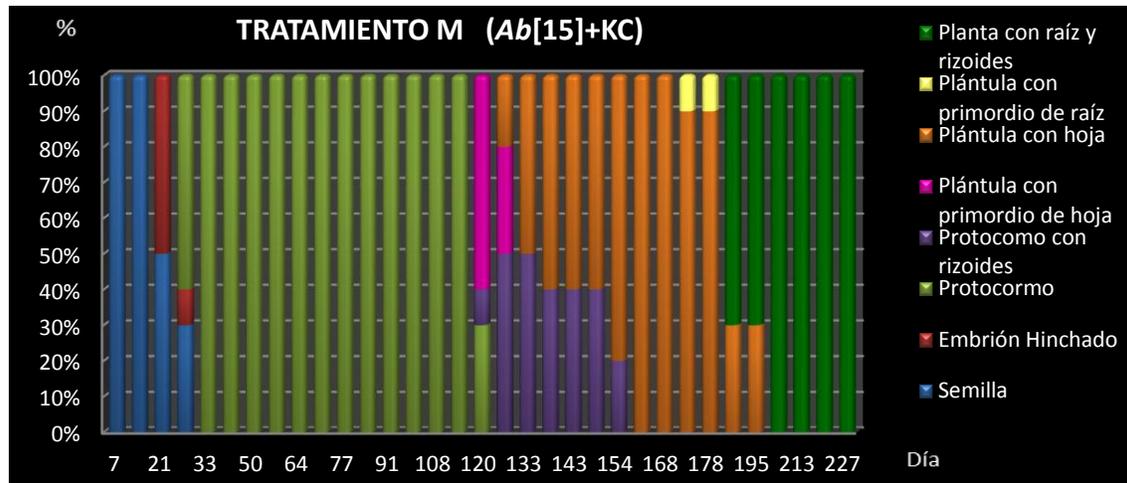
a.- Gráfica 11.- Estados de desarrollo con concentración 5 mL.

En el tratamiento K, el estadio de semilla perduro hasta el final del estudio y alrededor del 70% de los individuos formaron plantas completas. El estadio cinco (plántula con primordio de hoja), se presentó a los 120 días y permaneció seis días. El estadio de plántula con primordio de raíz no se observó debido a que a su presencia fue efímera (Ver Figura 43).



b.- Gráfica 12.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

En el tratamiento L (gráfica 12), el estadio de semilla permaneció toda la evaluación, su respuesta fue favorable en este extracto, ya que el 80% de individuos llegaron al máximo estadio de desarrollo. El estadio tres (protocormo) se presentó a los 27 días y duró 99 días desde su inicio hasta el cambio de estadio. El estadio cuatro (protocormo con rizoides) se presentó a los 120 días, permanece 13 días a diferencia con el tratamiento K, en el cual permaneció 92 días. El estadio nueve (planta con raíz y rizoides) se alcanzó a los 189 días y duró 38 días (Ver Figura 43).

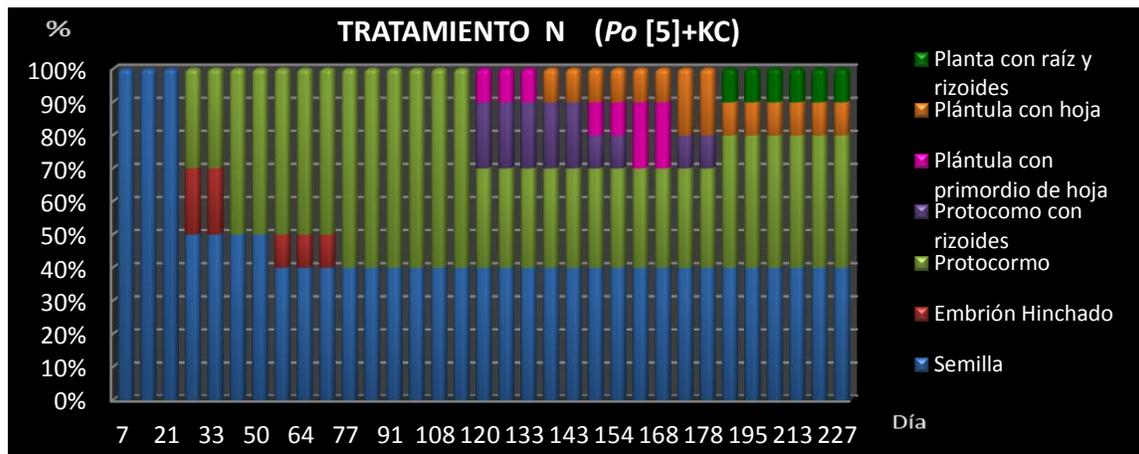


c.- Gráfica 13.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

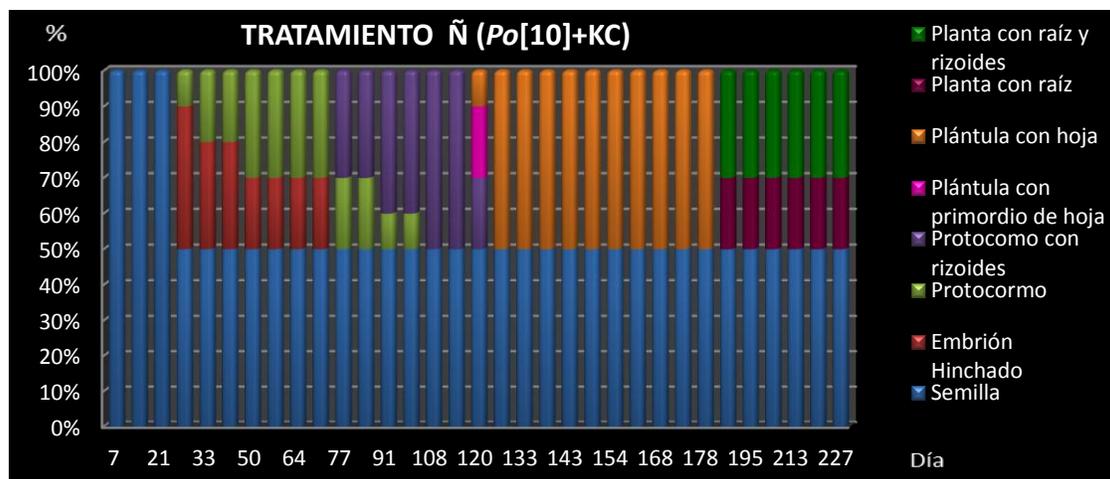
En el tratamiento M (gráfica 13) a diferencia de los tratamientos K y L (menos concentrados), el estadio de semilla permaneció cuatro semanas. El 100% de los individuos llegaron al nivel máximo de desarrollo, el cual fue alcanzado en las tres concentraciones, alrededor del día 185. Se presentaron estadios de presencia corta como el de embrión hinchado que solo perdura seis días, así como el de plántula con primordio de raíz que solo duró cuatro días. Por otra parte el estadio ocho (planta con raíz) obtuvo una respuesta rápida ya que no se alcanzó a registrar.

Haciendo una comparación respecto a la concentración de *Agaricus bisporus*, el paso del estadio de semilla al de embrión hinchado, se advierte la influencia por la concentración, ya que se ve una tendencia promotora del inicio de la germinación conforme se incrementa la concentración del extracto. En la concentración más alta (15mL) todas las semillas pasaron del estadio uno al dos, hecho que no sucedió con las concentraciones más bajas (Ver Figura 43).

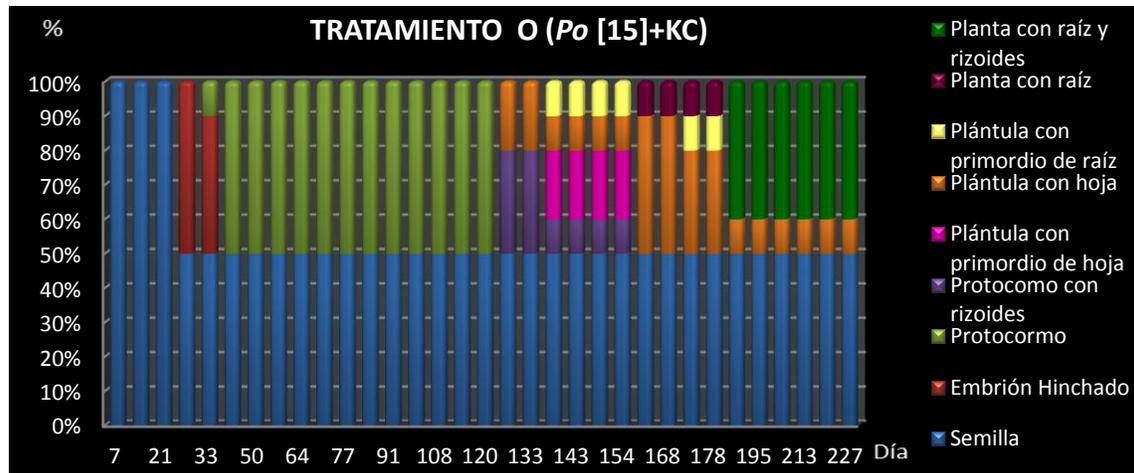
Por otra parte, la concentración más baja del extracto promovió un rápido desarrollo del protocormo ya que este estuvo presente seis días, a diferencia de la concentración más alta en la que duró 90 días, promoviendo un cambio de estadio más rápido. En conclusión, la concentración más alta resultó ser la más eficiente ya que todas las semillas germinaron y llegaron al máximo estadio evaluado.

B.- *Pleurotus ostreatus***a.-** Gráfica 14.- Estados de desarrollo con concentración 5 mL.

En el tratamiento N el estadio de semilla permaneció hasta el final del estudio (227 días) en el 40% de los individuos. Otro estadio que tuvo una permanencia larga fue el de protocormo el cual estuvo presente durante 200 días. Por otra parte, los estadios siete (plántula con primordio de raíz) y ocho (planta con raíz) no se percibieron ya que fue muy efímera su presencia, por lo cual no se alcanzó a registrar. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides), apareció a los 189 días, duró 90 días y lo alcanzaron el 10% de los individuos (Ver Figuras 37, 39 y 43).

**b.-** Gráfica 15.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

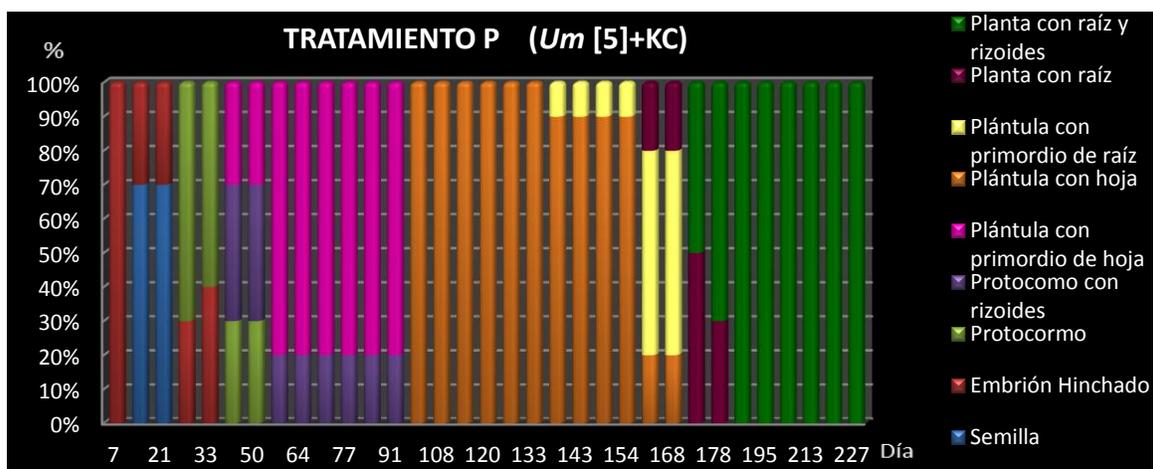
En el tratamiento Ñ (gráfica 15), el 50% de los individuos permanecieron en estadio de semilla durante todo el período de estudio. El estadio cinco (plántula con primordio de hoja), se presentó a los 120 días. Se considera que fue rápido su cambio de estadio ya que en las concentraciones de 5mL y 15mL se presentó durante siete y cinco semanas respectivamente. Otro estadio con un cambio de fase rápida fue el siete (plántula con primordio de raíz) el cual no se alcanzó a registrar. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides) inició a los 189 días y lo alcanzaron el 30% de los individuos de estudio (Ver Figuras 37, 39 y 43).



c.- Gráfica 16.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

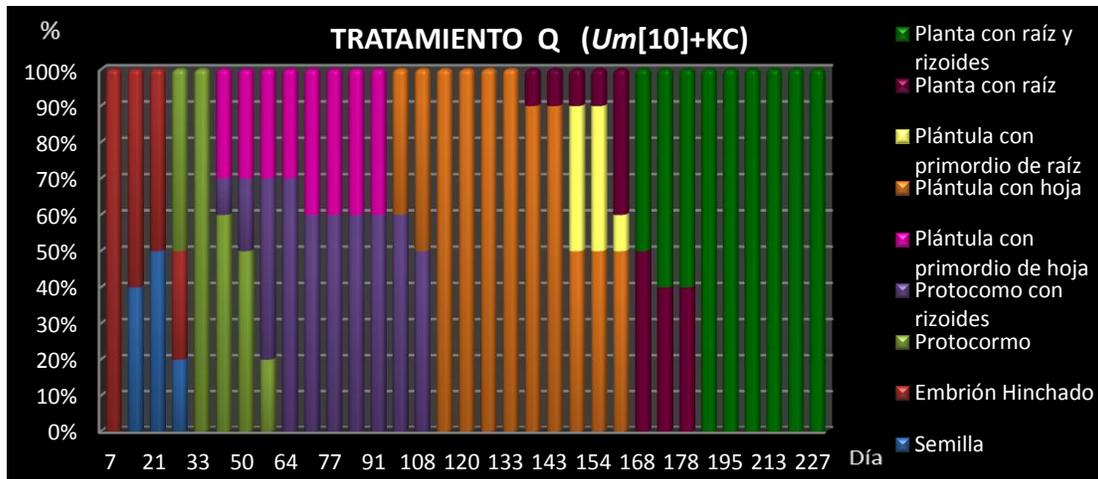
En el tratamiento O (gráfica 16), germinó el 50% de las semillas, comportándose igual con respecto al tratamiento Ñ. El cuarto estadio (protocormo con rizoides) empezó a los 126 días y duró seis semanas. Se presentó una asincronía del desarrollo marcada, ya que se presentaron al mismo tiempo cuatro estadios diferentes. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides) lo obtuvo el 40% de las semillas (Ver Figuras 37, 39 y 43).

C.- *Ustilago maydis*.



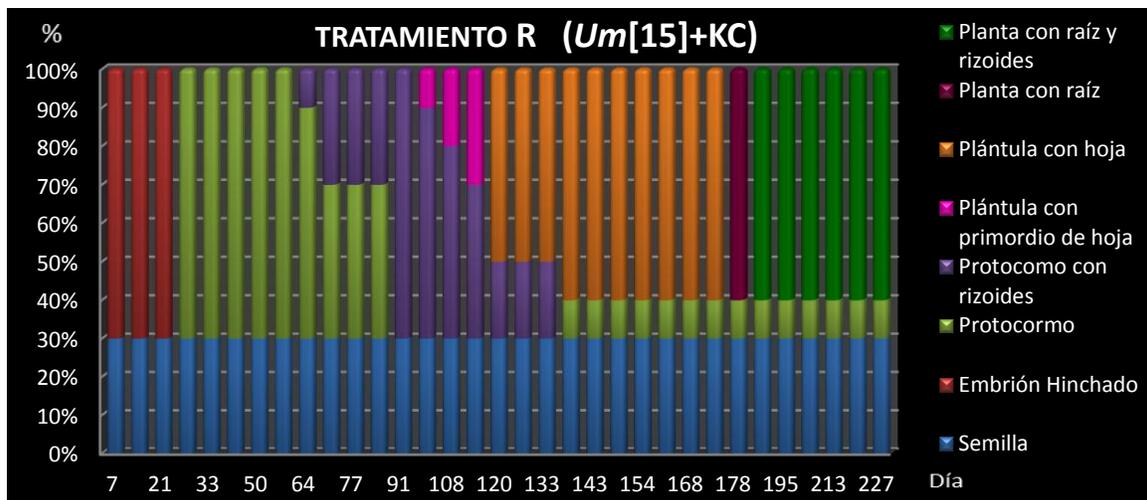
a.- Gráfica 17.- Estados de desarrollo con concentración 5mL.

En el tratamiento P (gráfica 17) el comportamiento es similar al tratamiento Q, en el cual todas las semillas germinaron hasta formar plantas completas antes del término del período experimental. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides), inició a los 174 días y duró 53 días (Ver Figuras 36,41 y 47).



b.- Gráfica 18.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

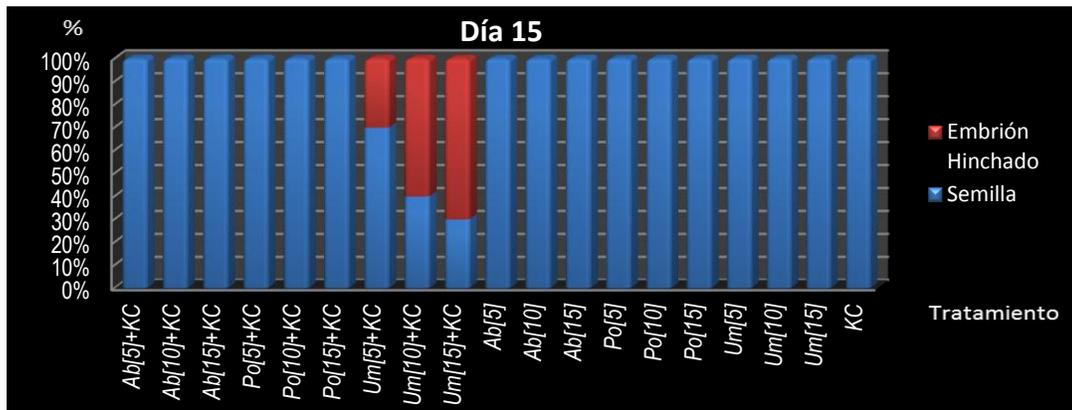
En el tratamiento Q, el estadio más avanzado se alcanzó antes en comparación con los tratamientos P y R. El octavo estadio (planta con raíz) inició a los 137 días, este duró 41 días desde su inicio hasta que cambió de fase, a diferencia con la concentración de 5mL en la cual duró 28 días (Ver Figuras 36, 41 y 47).



c.- Gráfica 19.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

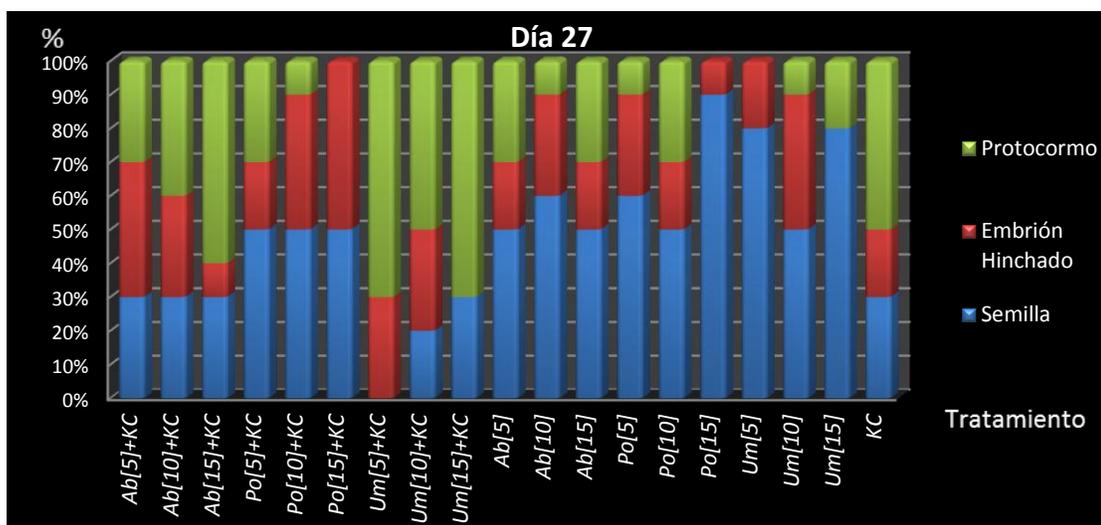
El tratamiento R con una concentración alta de extracto tuvo un efecto inhibitorio de la germinación, ya que germinó sólo el 60 % de las semillas iniciales a diferencia con los otros dos tratamientos P y Q, los cuales obtuvieron el 100% (Ver Figuras 36, 41 y 47).

4.- Comportamiento de la germinación de *Guarjanthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en cada día de evaluación.



Gráfica 20.- Respuesta de *Guarjanthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en el día 15.

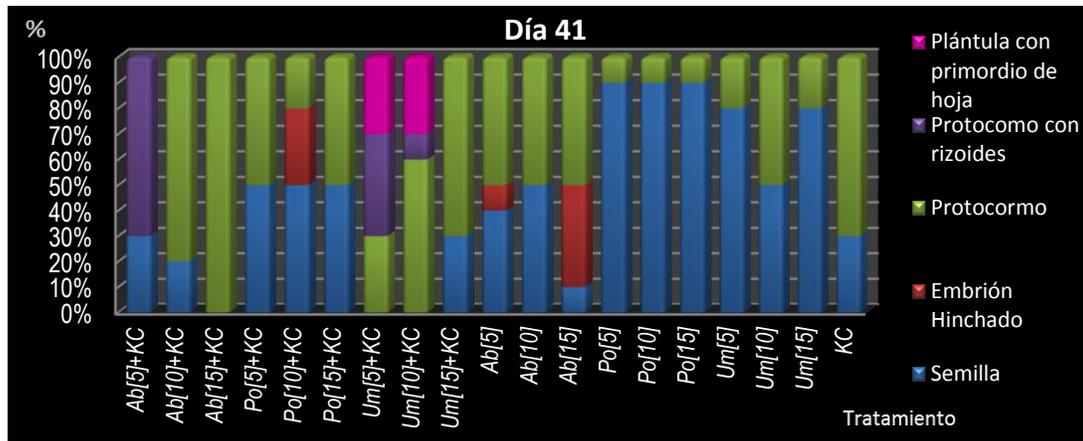
En la gráfica 20 en el día 15, todos los tratamientos están en el estadio uno (semilla), excepto los de *Ustilago maydis* en concentración 5mL, 10mL y 15mL adicionados con “Knudson C”, que pasaron al siguiente estadio (embrión hinchado). Estos tratamientos obtienen una captación rápida de agua por lo que se dio un rápido cambio de fase. Comparado con el testigo (KC) estos tratamientos son más eficientes.



Gráfica 21.- Respuesta de *Guarjanthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en el día 27.

En esta gráfica (día 27), el mejor tratamiento fue con *Ustilago maydis* en concentración 5mL adicionando con “Knudson C”, ya que es el único tratamiento en el cual la totalidad de las semillas pasaron al estadio dos (embrión hinchado) y el estadio tres (protocormo), siendo el de mejor eficiencia.

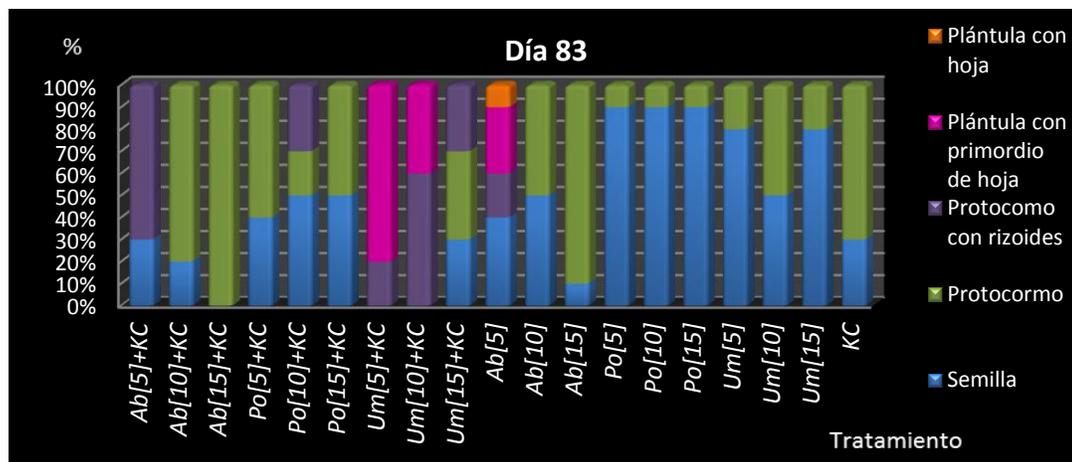
La mayoría de los tratamientos alcanzaron el estadio de protocormo excepto los de *Pleurotus ostreatus* en concentración 15mL más “Knudson C”, *P. ostreatus* en concentración 15mL y *Ustilago maydis* en concentración 5mL, ya que no adquirieron el estadio de protocormo. El testigo (KC) se comporta de manera similar a los tratamientos restantes.



Gráfica 22 .- Respuesta de *Guarianthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en el día 41.

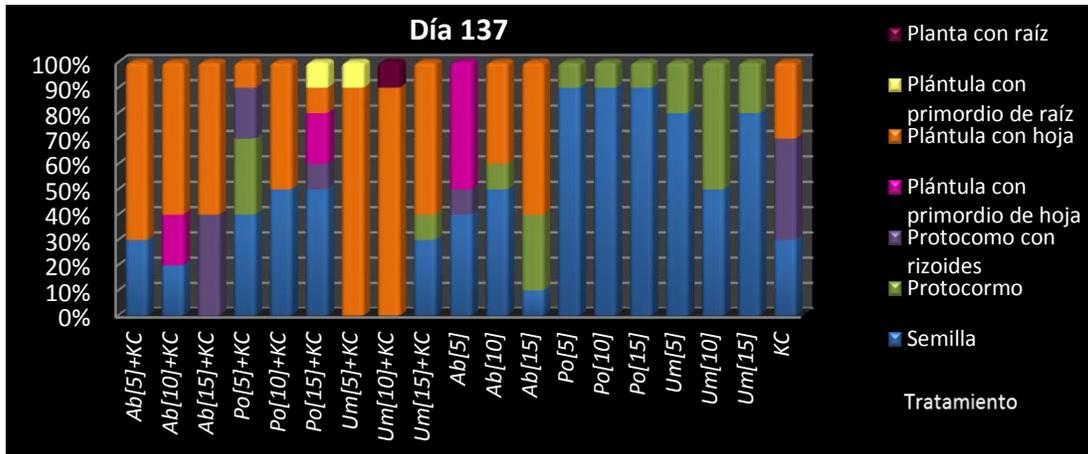
Para el día 41 de prueba, el mejor tratamiento fue con *Ustilago maydis* en concentración 5mL adicionando “Knudson C”, el cual llegó al estadio tres (protocormo), el cuatro (protocormo con rizoides) y el cinco (plántula con primordio de hoja), siendo el más eficiente de todos los tratamientos. *U. maydis* en concentración 10mL con “Knudson C”, se comportó de manera similar.

Ustilago maydis en concentración 15mL, pasó directamente del estadio uno (semilla) al estadio tres (protocormo), donde el cambio de fase fue rápido.



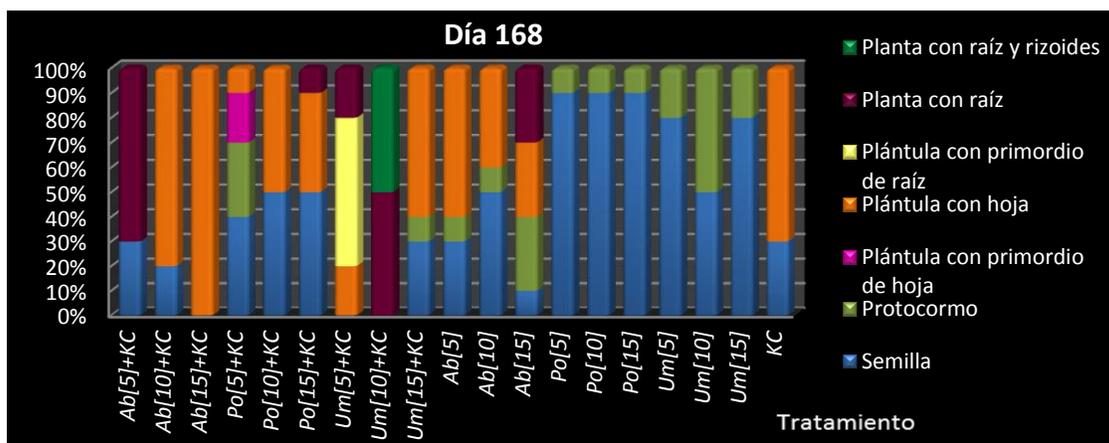
Gráfica 23.- Respuesta de *Guarianthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en el día 83.

En el día 83, el tratamiento de *Agaricus bisporus* en concentración 5mL, presentó el estadio uno (semilla), el estadio cuatro (protocormo con rizoides), el estadio 5 (plántula con primordio de hoja) y el estadio seis (plántula con hoja) siendo el estadio más avanzado hasta esta fecha. Es importante señalar que no se le adicionó “Knudson C” y se comportó mejor que el testigo (KC).



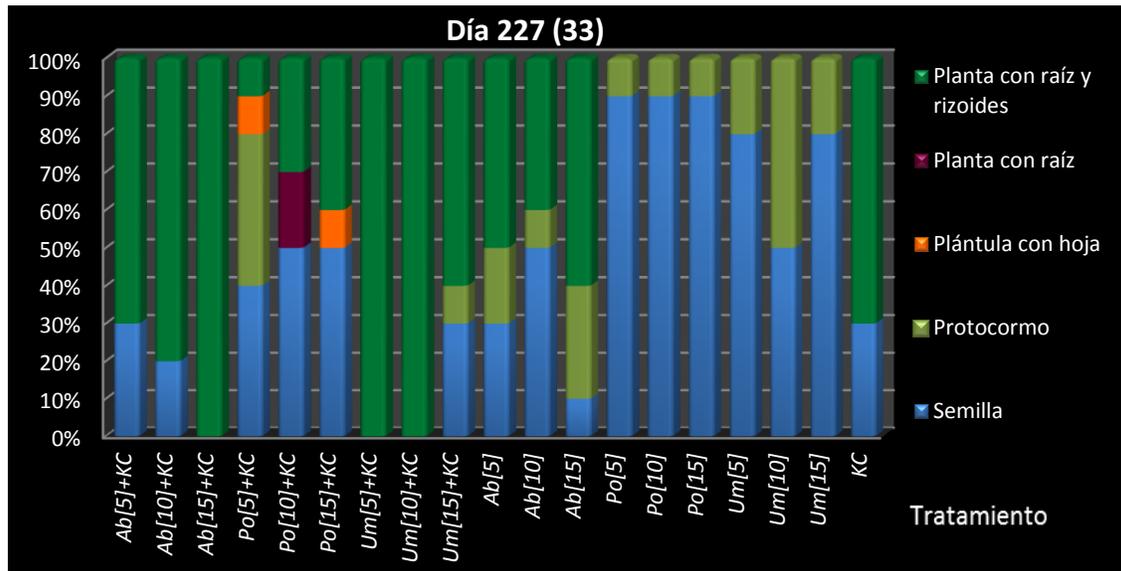
Gráfica 24.- Respuesta de *Guarianthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en el día 137.

En el día 137 el mejor tratamiento fue *Ustilago maydis* en concentración 10mL adicionando con “Knudson C”, ya que llega hasta el estadio seis (plántula con hoja) en un 90% y el 10% restante llega hasta el estadio ocho (planta con raíz) que es el más avanzado a la fecha, por lo tanto fue el más eficiente y mejor que el testigo. El siguiente mejor tratamiento fue el de *U. maydis* en concentración 5mL más “Knudson C”, ya que también llega el 90% al estadio 6 (plántula con hoja) y el restante 10% alcanza el estadio siete (plántula con primordio de raíz). Por otra parte *Pleurotus ostreatus* en concentración 5mL, 10mL y 15mL, sigue sin cambio alguno (Ver Figuras. 37, 38, 39, 40 y 42).



Gráfica 25.- Respuesta de *Guarianthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en el día 168.

En el día 168, el mejor tratamiento fue *Ustilago maydis* con “Knudson C” en concentración 10mL, presentando el 50% el estadio ocho (planta con raíz), y el otro 50% el estadio nueve (planta con raíz y rizoides) siendo el más avanzado. Por lo tanto, es un tratamiento que induce la promoción del desarrollo y la obtención de plantas completas en un menor tiempo, comparado con el testigo (KC) que llegó sólo al estadio seis (plántula con hoja). Por otra parte *Pleurotus ostreatus* en concentración 5mL, 10mL y 15mL, sigue sin tener modificación alguna.

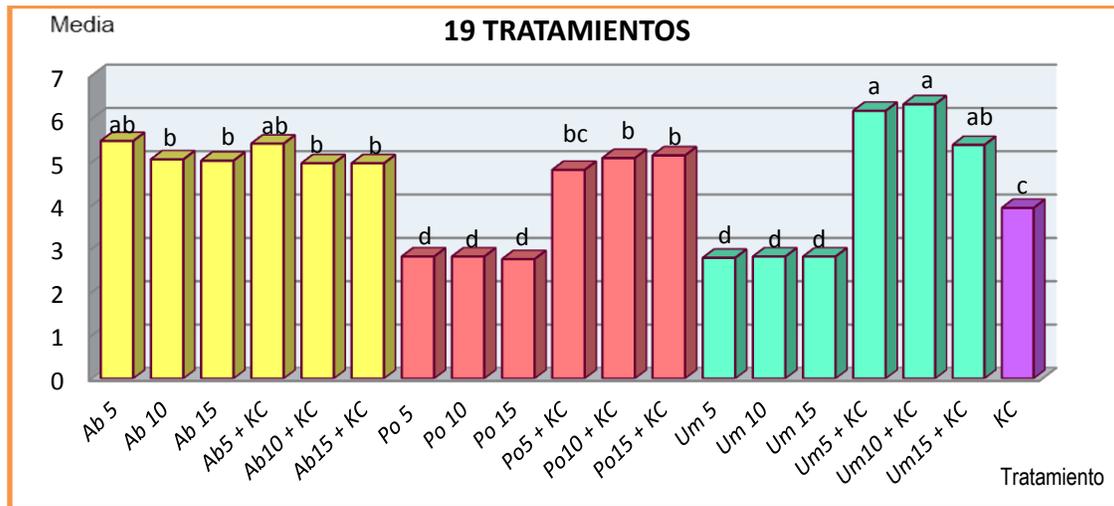


Gráfica 26.- Respuesta de *Guarianthe aurantiaca* en los 19 tratamientos experimentales en el día 227.

En la gráfica 26 para el día 227, los mejores tratamientos fueron *Agaricus bisporus* con “Knudson C” en concentración 15mL, *Ustilago maydis* con “Knudson C” en concentraciones 5mL y 10mL, ya que alcanzan el estadio nueve (planta con raíz y rizoides) en el 100%, siendo el máximo estadio evaluado, ya que se obtuvieron plantas completas en su totalidad, por lo tanto, promovieron en su conjunto la germinación y desarrollo, comportándose mejor que el testigo (KC), ya que llegó al máximo estadio evaluado pero el 30% permaneció aún en el estadio de semilla (Ver Figura 47).

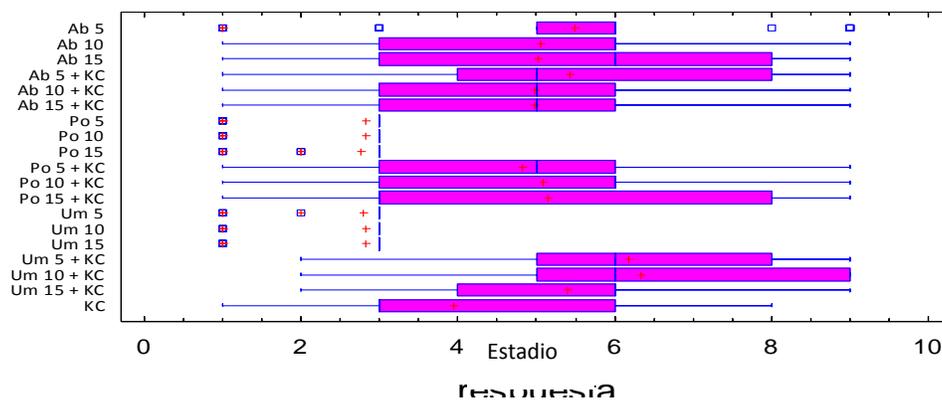
Agaricus bisporus con “Knudson C” en concentraciones 5mL y 10mL, también llegaron al estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides), siendo su única diferencia el porcentaje, pero se comporta igual o mejor que el testigo (Ver Figura 43). Por otra parte *Pleurotus ostreatus* en concentración 5mL, 10mL y 15mL, sigue sin cambio alguno, por lo que su efecto es inhibitorio para la germinación de semillas de *Guarianthe aurantiaca* (Ver Figura 46). Le sigue *Ustilago maydis* en concentraciones 5mL, 10mL y 15mL donde también tiene efecto inhibitorio para la germinación de semillas, siendo la diferencia su porcentaje en el estadio uno (semilla) y el estadio tres (protocormo), por lo tanto no presentan cambios significativos (Ver Figura 48).

5.- Análisis estadístico de *Guarlanthe aurantiaca*



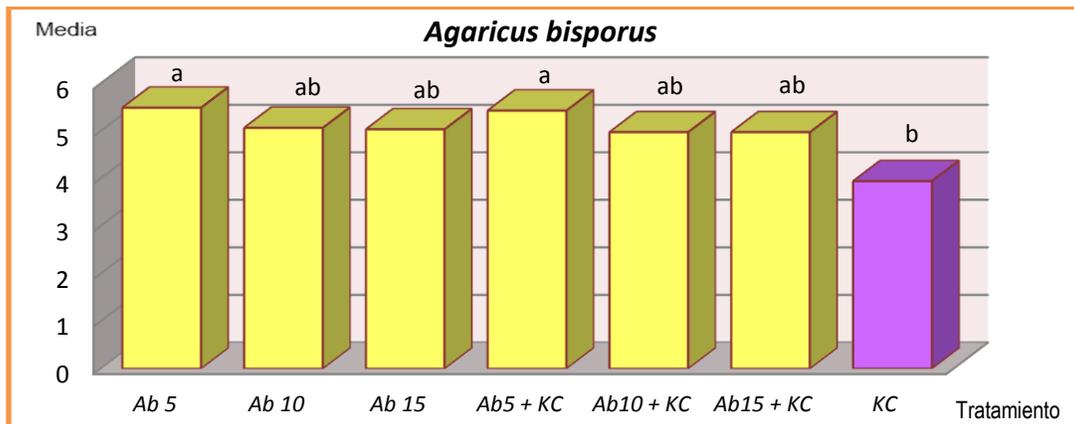
Gráfica 27.- Comparción de los 19 tratamientos.

Se realizó una comparación múltiple de las medias de estadios (fases morfológicas evaluadas), en la cual se observó que hay diferencias significativas con relación a los tratamientos, ya que *Pleurotus ostreatus* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) al igual que *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL), no permitieron el desarrollo de plantas completas. Los tratamientos restantes promovieron la germinación y desarrollo de *Guarlanthe aurantiaca*.



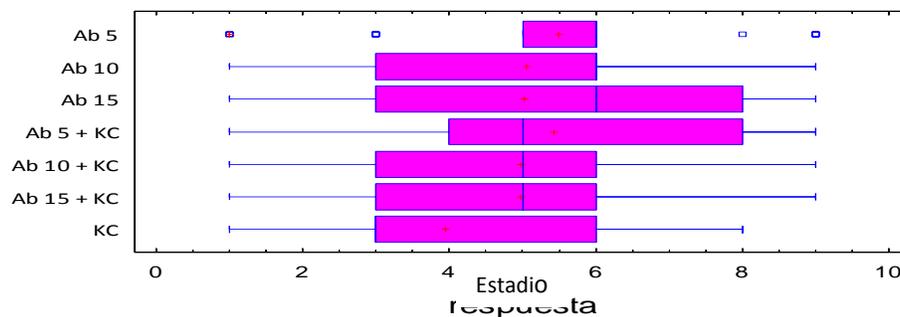
Gráfica 28.- Estadios de desarrollo en cada tratamiento experimental en la germinación de *Guarlanthe aurantiaca*.

En la gráfica 28, *Ustilago maydis* adicionado con “Knudson C” en concentración de 10mL, llegó a su máximo estadio el nueve (planta con raíz y rizoides) y el menor estadio alcanzado fue el cinco (plántula con primordio de hoja), por lo tanto su velocidad de crecimiento es mejor. Por debajo del testigo “Knudson C” (KC), se presentaron *Pleurotus ostreatus* en sus tres concentraciones 5mL, 10mL y 15mL, al igual que *U. maydis* en sus tres concentraciones 5mL, 10mL y 15mL. Mientras *Agaricus bisporus* en concentración 5mL tiene mejor sincronía ya que solo se encuentra el estadio cinco y seis al mismo tiempo.



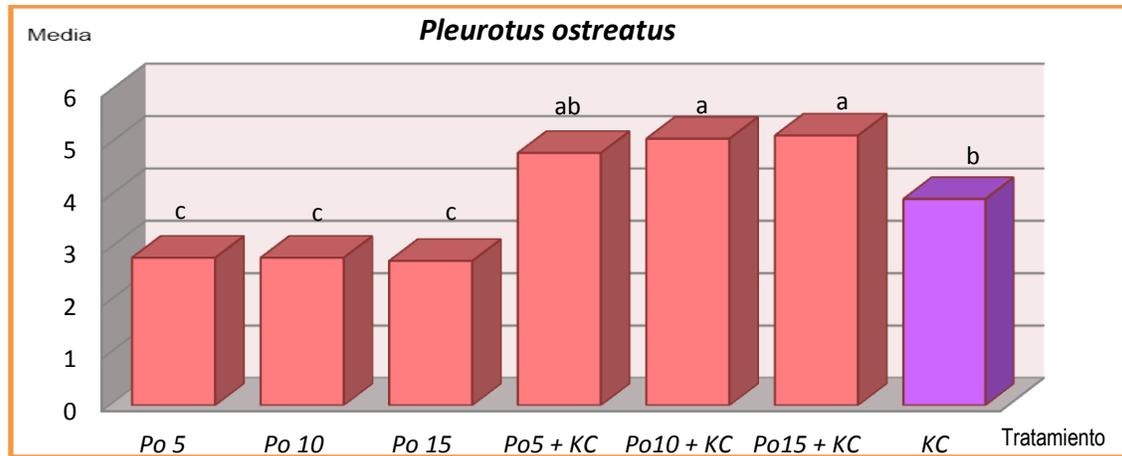
Gráfica 29.- Comparación del efecto de los extractos de *Agaricus bisporus* con y sin medio nutritivo "Knudson C" en el desarrollo durante la germinación de *Guarianthe aurantiaca*

En la comparación múltiple de las medias se observó que hay diferencias significativas con relación a los tratamientos *Agaricus bisporus* en concentración 5mL y *A. bisporus* adicionando con "Knudson C" en concentración 5mL, comparados con el testigo "Knudson C" cuya respuesta fue menor.



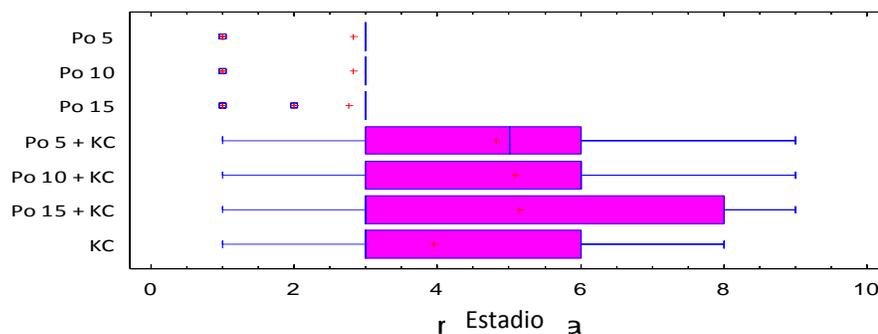
Gráfica 30.- Tratamientos con *Agaricus bisporus* y el testigo.

En la gráfica 30 se observa que el mejor tratamiento fue *Agaricus bisporus* adicionando con "Knudson C" en concentración de 5mL, ya que llega al estadio ocho (planta con raíz) y el menor estadio alcanzado fue el cuatro (protocormo con rizoides), siendo el de mejor eficacia, por lo tanto, tiene mejor velocidad de crecimiento, pero con una menor sincronía ya que tiene cinco estadios al mismo tiempo. Mientras *A. bisporus* en su concentración de 5mL tiene una mejor sincronía ya que solo se encuentran el estadio cinco y seis al mismo tiempo.



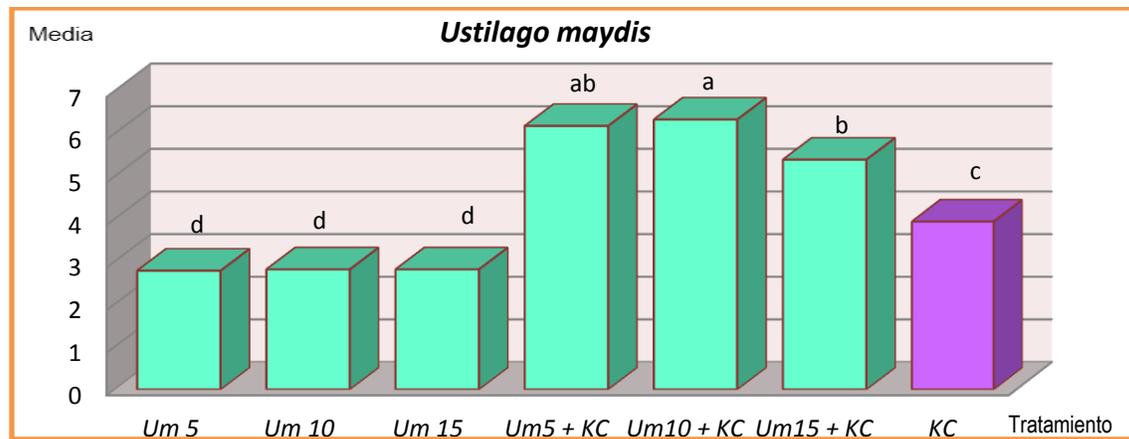
Gráfica 31.- Comparación del efecto de los extractos de *Pleurotus ostreatus* con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de *Guarianthe aurantiaca*.

En la gráfica 31 con la comparación múltiple de las medias se presentan diferencias significativas con respecto a *Pleurotus ostreatus* adicionados con “Knudson C” en sus concentraciones 5mL y 10mL, siendo mejor que el testigo (KC). Sin embargo *P. ostreatus* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL), no favoreció la germinación. Es notorio que los tratamientos con la adición de “Knudson C” son estadísticamente mejor que sin la adición de las sales de “Knudson C”.



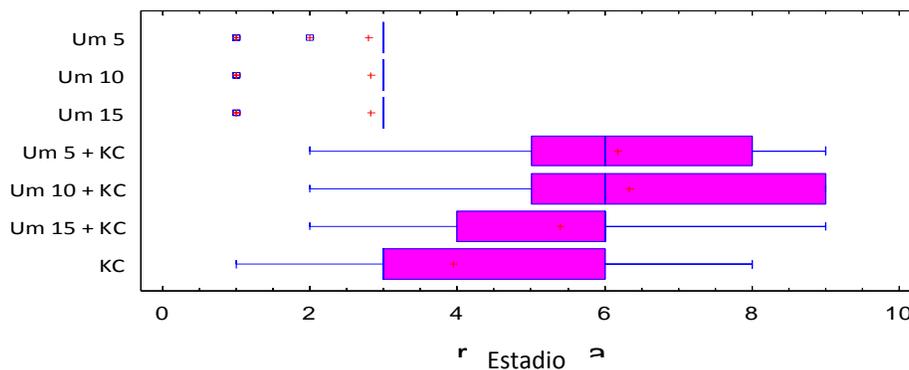
Gráfica 32.- Tratamientos con *Pleurotus ostreatus* y el testigo.

En la gráfica 32 se ve que el mejor tratamiento fue *Pleurotus ostreatus* en concentración de 15mL adicionado con sales basales de “Knudson C” ya que llega hasta el estadio ocho (planta con raíz) y el estadio tres (protocormo) por lo tanto tiene mejor velocidad de crecimiento, mientras *P. ostreatus* en sus tres concentraciones 5mL, 10mL y 15mL obtuvo una respuesta por debajo del testigo (KC).



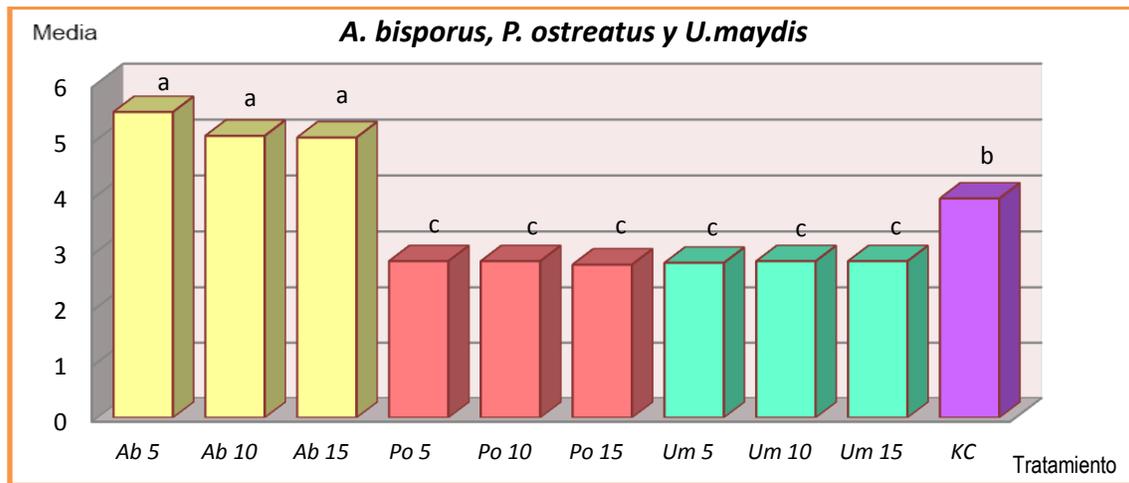
Gráfica 33.- Comparación del efecto de los extractos de *Ustilago maydis* con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de *Guarianthe aurantiaca*.

En la gráfica de comparación múltiple de las medias se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ya que el extracto de *Ustilago maydis* adicionado con sales basales de “Knudson C” en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL), tiene una respuesta mejor que el testigo. El tratamiento *U. maydis* en sus concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) tiene una respuesta menor al testigo y a los demás tratamientos en la inducción de la germinación y desarrollo de las plantas *in vitro* de *Guarianthe aurantiaca*.



Gráfica 34.- Tratamientos con *Ustilago maydis* y el testigo.

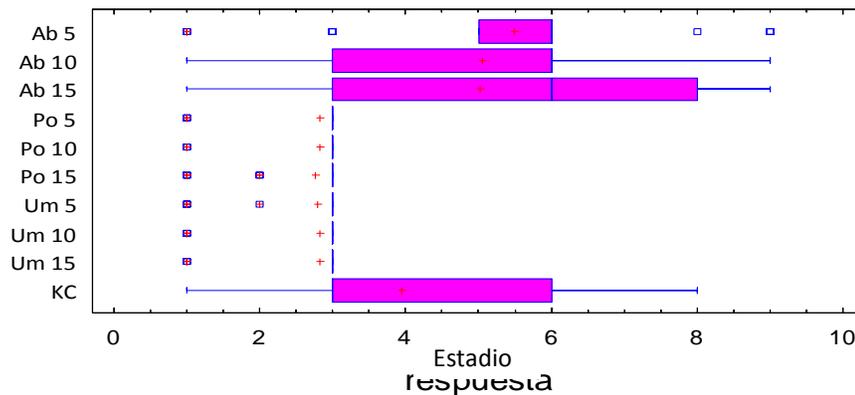
En la gráfica 34, *Ustilago maydis* adicionado con sales de “Knudson C” en concentración 10mL llegó al estadio nueve (planta con raíz y rizoides) y el estadio cinco (plántula con primordio de hoja), siendo eficaz y eficiente, por lo tanto tiene mejor velocidad de crecimiento. El tratamiento *U. maydis* adicionado con sales de “Knudson C” en concentración 15mL tuvo una sincronía estable, ya que tiene tres estadios, desarrollándose al mismo tiempo. El testigo (KC) está por debajo. Los tratamientos de *U. maydis* sin sales de “Knudson C” se comportaron por debajo del testigo.



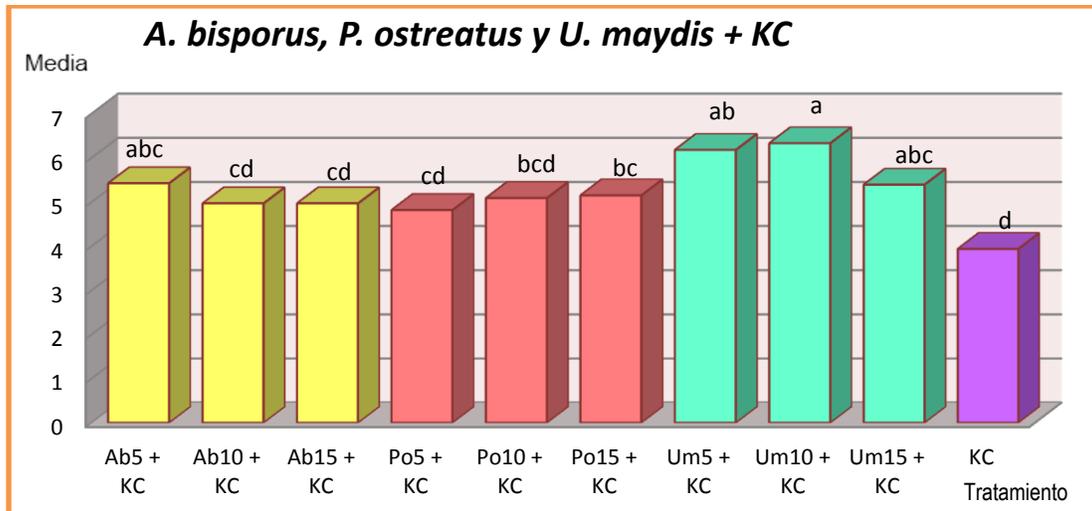
Gráfica 35.- Comparación del efecto de los extractos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* sin medio nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de *Guarjanthe aurantiaca*.

En la gráfica 35 se observa que los tratamientos con extracto de *Agaricus bisporus* en sus tres concentraciones fueron significativamente mejores que el resto. Los tratamientos con *Pleurotus ostreatus* en sus tres concentraciones, al igual que *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones tienen una respuesta significativamente menor al testigo.

Gráfico de Cajas y Bigotes

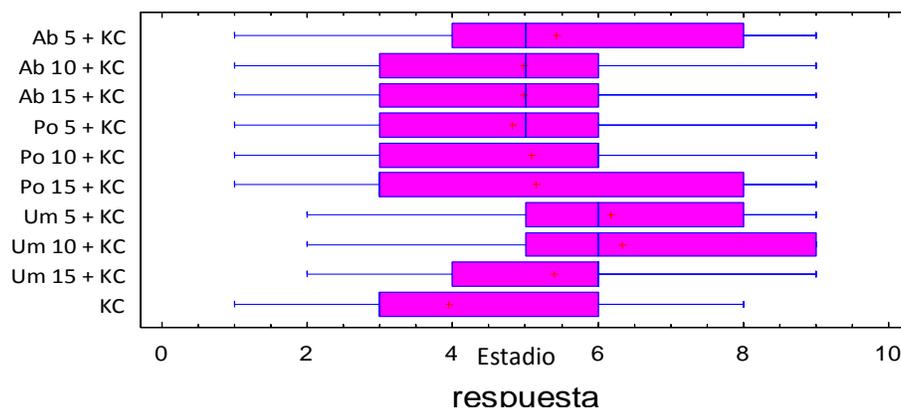


En esta gráfica se presenta que el mejor tratamiento fue *Agaricus bisporus* en concentración 15mL, ya que llegó hasta el estadio ocho (planta con raíz) siendo el tratamiento con mejor velocidad de crecimiento.



Gráfica 37.- Comparación del efecto de los extractos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* con medio nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de *Guarjanthe aurantiaca*.

En la gráfica se observaron diferencias significativas entre tratamientos, *Ustilago maydis* adicionando con sales basales de “Knudson C” en concentraciones 5, 10 y 15mL, *Agaricus bisporus* en concentraciones 5, 10 y 15mL adicionado con sales basales de “Knudson C”, seguido de *Pleurotus ostreatus* adicionando con “Knudson C” en concentraciones 5 y 10mL, son estadísticamente mejores que el testigo (KC).

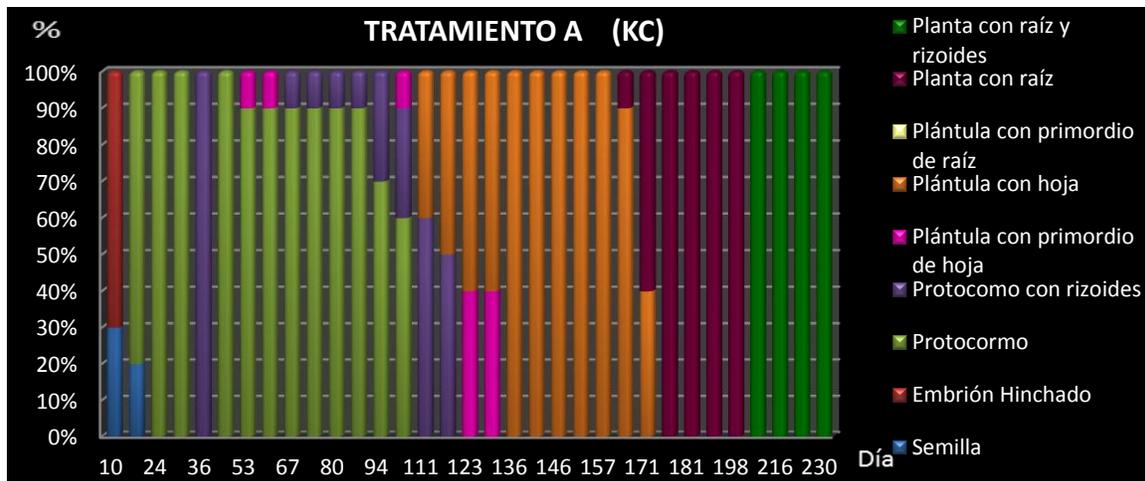


Gráfica 38.- Tratamientos con “Knudson C” y el testigo.

En la gráfica 38 se advierte que el mejor tratamiento fue *Ustilago maydis* adicionando con “Knudson C” en concentración de 10mL, llegando hasta el estadio nueve (planta con raíz y rizoides) y el menor estadio alcanzado fue el cinco (plántula con primordio de hoja), por lo tanto tuvo mejor velocidad de crecimiento en comparación con los demás tratamientos, sin embargo tiene una menor sincronía ya que presentó cinco estadios desarrollándose al mismo tiempo. Mientras que *Ustilago maydis* en concentración 15mL adicionado con las sales basales de “Knudson C” tiene una mejor sincronía, ya que presenta solo tres estadios al mismo tiempo.

II.- *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

1.- Efecto en la germinación de semillas de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* con medio nutritivo “Knudson C”.

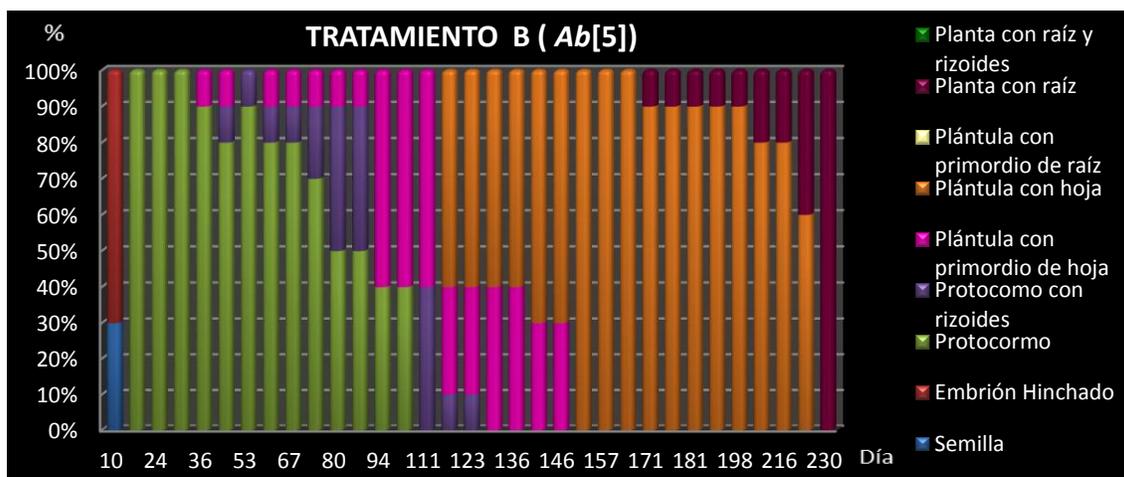


Gráfica 39.- Estados de desarrollo con “Knudson C” (Testigo).

En la gráfica 39 se nota que el estadio de semilla y el de embrión hinchado son de corta duración. El estadio de protocormo inicia a los 18 días y dura 82 días, mientras el estadio de protocormo con rizoides inicia a los 36 días y duró 64 días, los rizoides presentados fueron efímeros. El estadio de planta con raíz y planta con raíz y rizoides, presentan una sincronía en el cambio de fase, su desarrollo es óptimo (Ver Figuras 49 -60).

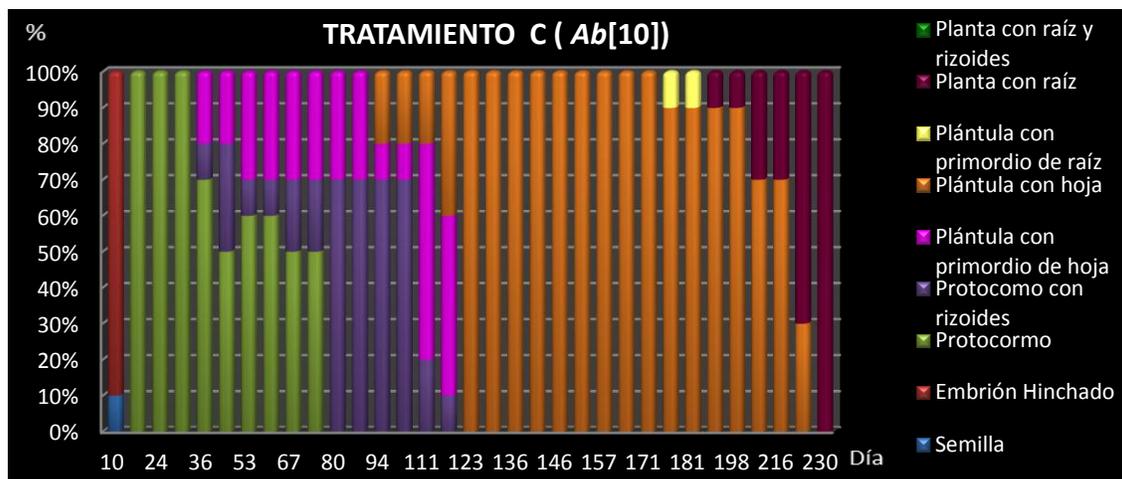
2.- Efecto en la germinación de semillas de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* de la adición de extractos de origen fúngico y sin medio nutritivo “Knudson C”.

A.- *Agaricus bisporus*



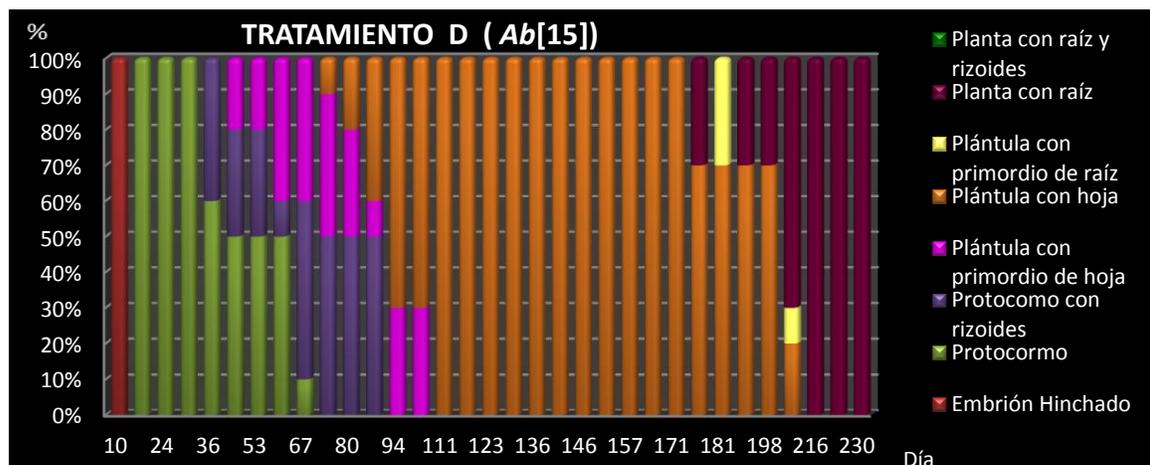
a.- Gráfica 40.- Estados de desarrollo con concentración 5mL.

En la gráfica 40 el tratamiento B, mantuvo el estadio de semilla y llegó al de embrión hinchado en el día 10, indicando que son etapas de corta duración. El estadio de protocormo inicia a los 18 días y duró 82 días. El estadio de protocormo con rizoides inició a los 44 días y duró 79 días, los rizoides presentados fueron efímeros. El estadio de plántula con hoja, empezó a los 118 días y duró 102 días siendo largo su cambio de fase. El estadio más avanzado en este tratamiento fue planta con raíz, por lo tanto *Agaricus bisporus* por si solo es inductor del desarrollo a pesar de no llegar al estadio de planta con raíz y rizoides durante el tiempo de estudio (Ver Figura 57).



b.- Gráfica 41.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

En la gráfica 41 se observa que el tratamiento C presentó ya alrededor del 90 % de los individuos el estadio de embrión en el día 10, indicando ser un promotor del cambio de la fase de semilla. El estadio de protocormo inicia a los 18 días y duró 58 días. El estadio de plántula con hoja, empezó a los 118 días y duró 126 días siendo largo su cambio de fase. El estadio más avanzado alcanzado fue el de planta con raíz, por lo tanto *Agaricus bisporus* por si solo es inductor de germinación y desarrollo de *Euchile mariae x Euchile citrina* (Ver Figura 57).

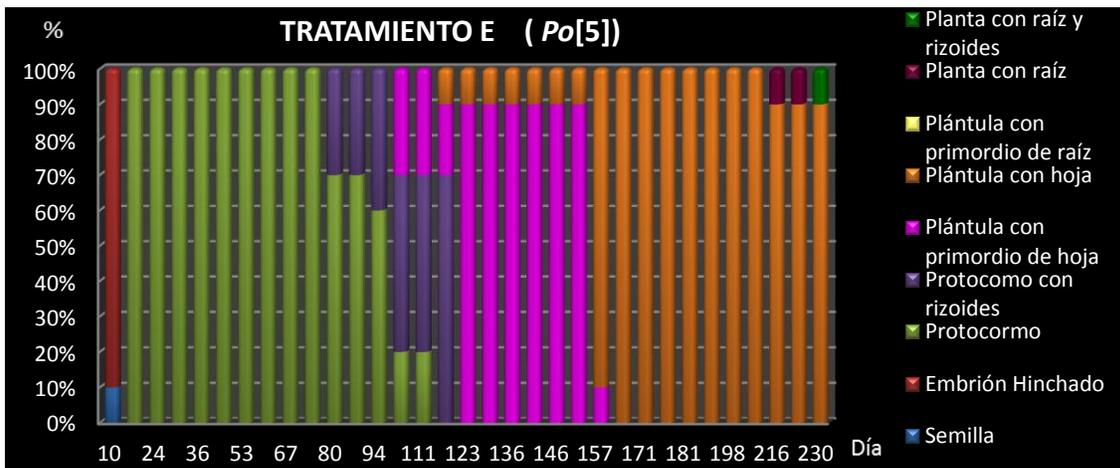


c.- Gráfica 42.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

Con el tratamiento D, el estadio uno (semilla) su cambio de fase fue rápido, tanto que no se registró en la evaluación semanal. El estadio dos (embrión hinchado), duró hasta el día 10, su cambio de fase es rápido. El tercer estadio (protocormo) duró 49 días. El estadio de protocormo con rizoides duró 56 días. El estadio de plántula con primordio de hoja inicia a los 36 días y duró 56 días. El estadio de plántula con hoja, empieza, a los 74 días y es importante señalar la permanencia en esta fase (137 días) es la más larga de los tres tratamientos (Ver Figura57).

El proceso de la germinación y desarrollo en los tres tratamientos con *Agaricus bisporus* es similar. La presencia del estadio de protocormo duró alrededor de 42 días, aunada a la fase de primordio de raíz donde se avistó en pocos individuos y en semanas discontinuas. Finalmente el estadio 9 no se observó en ninguno de éstos tratamientos. A pesar de lo anterior, se demostró que el extracto de *A. bisporus* es inductor de la germinación por sí solo y que este complejo orgánico puede sustituir a los medios básicos.

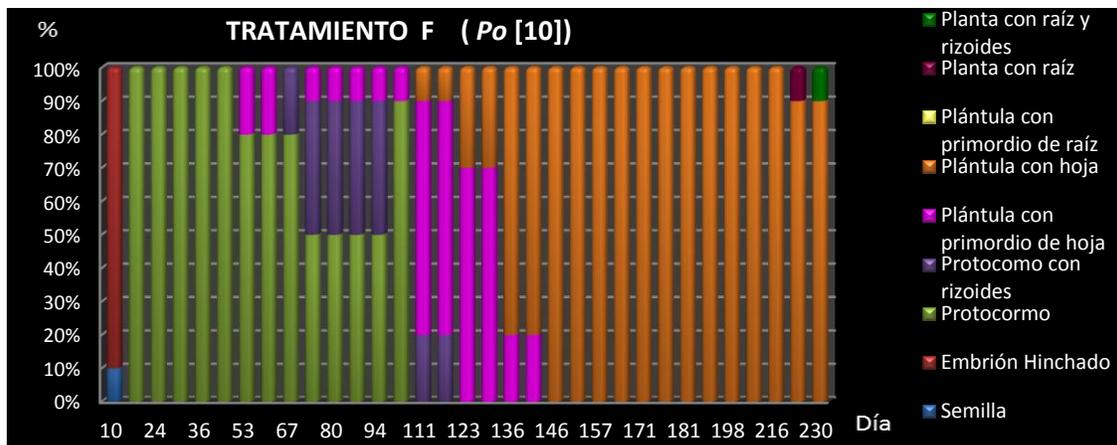
B.- *Pleurotus ostreatus*



a.- Gráfica 43.- Estados de desarrollo con concentración 5mL.

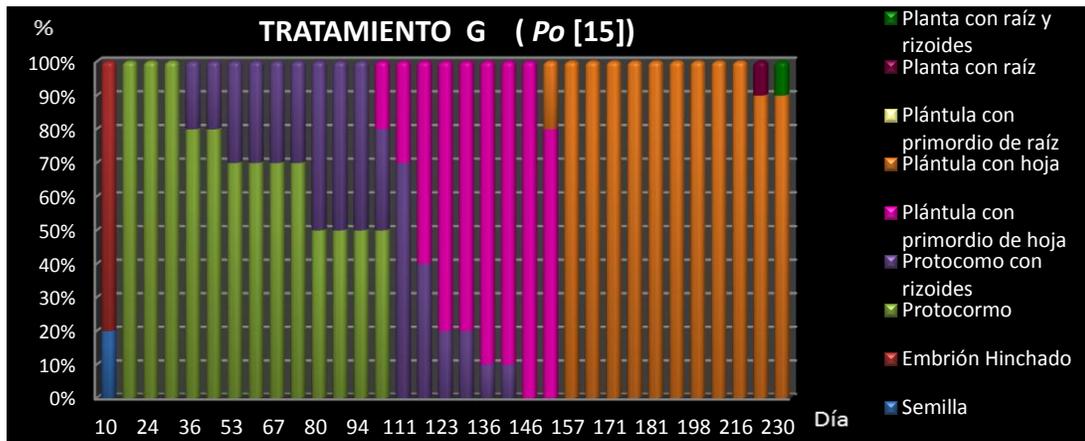
En la gráfica 43, el tratamiento E presentó el estadio de semilla y el de embrión hinchado hasta el día 10, su cambio de fase es rápido. El tercer estadio de desarrollo (protocormo) duró 93 días. El estadio de protocormo con rizoides duró 38 días. El estadio de plántula con primordio de hoja duró 57 días. El estadio de plántula con hoja empezó a los 118 días. Es importante señalar que la permanencia en esta fase fue larga (112 días).

El estadio de planta con raíz se presenta a partir de los 216 días de cultivo y duró sólo 15 días, siendo rápida la generación y crecimiento de raíces. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides) se presenta hasta los 230 días (Ver Figuras 51,53 y 59).



b.- Gráfica 44.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL .

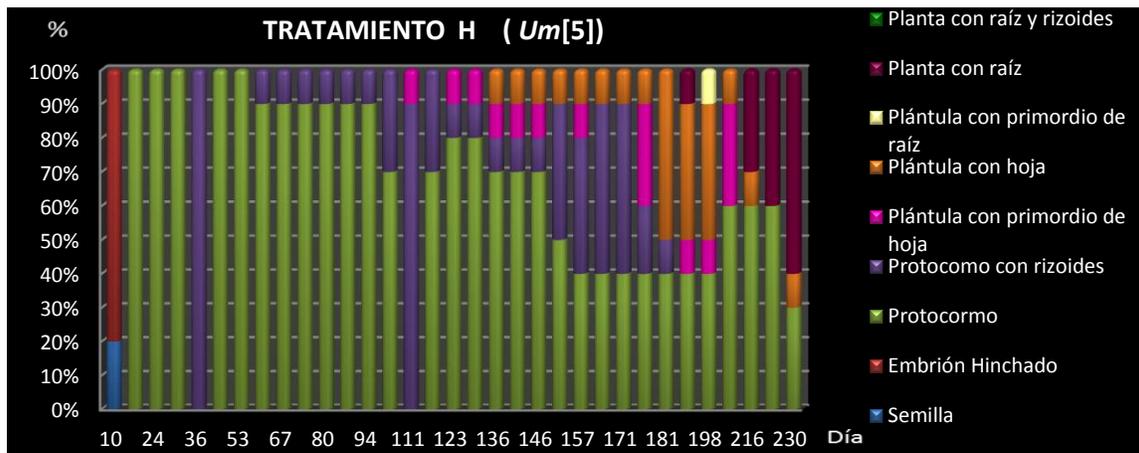
En la gráfica 44 el tratamiento F se observó el estadio de semilla y el de embrión hinchado en el día 10, indicando ser una etapa de corta duración como sucedió en la concentración de 5mL. El estadio de protocormo inicia a los 18 días. El estadio de protocormo con rizoides inicia a los 67 días y duró 51 días, los rizoides fueron efímeros. El estadio de plántula con hoja, empezó a los 111 días y duró 119 días siendo largo su cambio de fase. El octavo estadio (planta con raíz) se presentó a los 220 días, durando sólo cuatro días, siendo rápida la generación y crecimiento de raíces. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides) se presentó hasta los 230 días (Ver Figuras 51, 53 y 59).



c.- Gráfica 45.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

En la gráfica 45 (tratamiento G) tuvo el estadio de semilla y el de embrión hinchado en la revisión del día 10, indicando ser una etapa rápida. El estadio de protocormo inicio a los 18 días y duró 82 días. El estadio de protocormo con rizoides duró 51 días, el de plántula con primordio de hoja duró 51 días, el sexto estadio (plántula con hoja) duró 79 días. El octavo estadio (planta con raíz) duró como fue el caso de la concentración de 10mL sólo cuatro días. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides) se presentó a los 230 días.

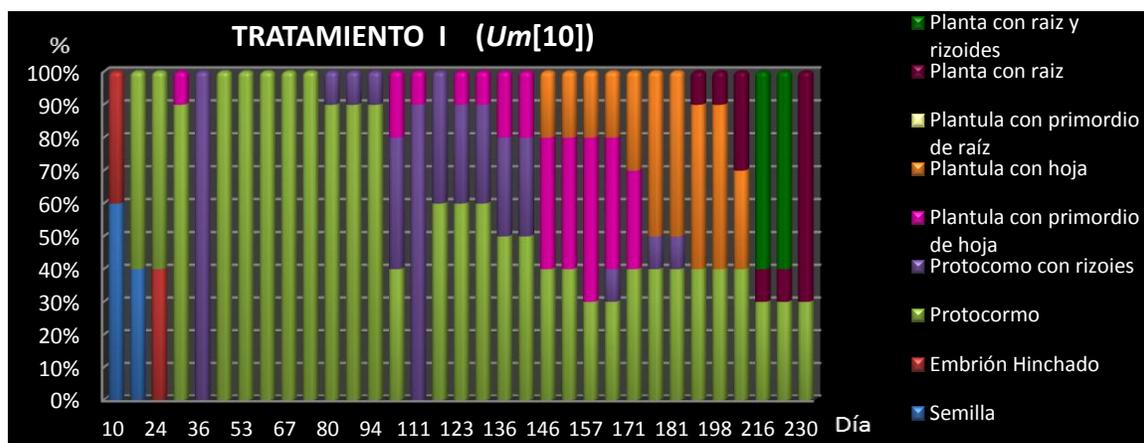
Los tres tratamientos con *Pleurotus ostreatus* no manifestaron diferencias importantes con respecto a su aparición y permanencia de las diferentes fases, con excepción a la presencia de los primordios de hoja los cuales en el tratamiento E, adelanta su aparición 30 días. La aparición de raíces es tardía y se presentaron en pocos individuos (Ver Figuras 51, 53 y 59).

C.- *Ustilago maydis*

a.- Gráfica 46.- Estados de desarrollo con concentración 5mL.

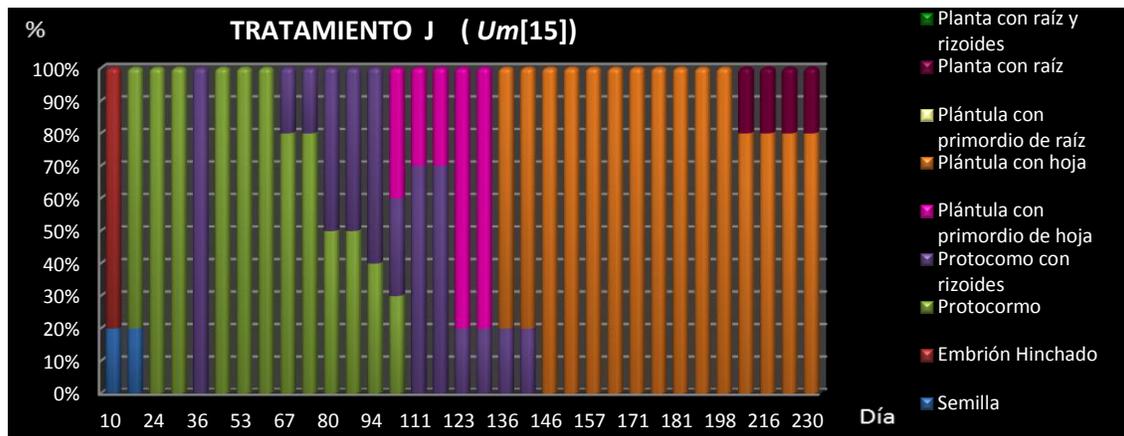
En el tratamiento H el estadio de semilla y el de embrión hinchado se avistaron sólo en la revisión del día 10, indicando ser una etapa de corta duración.

El estadio de protocormo inició a los 18 días y duró 212 días, lo cual indicó un bajo desarrollo; el estadio de protocormo con rizoides inició a los 18 días y duró 145 días, los rizoides presentados fueron efímeros, las plántulas con raíces pero que perdieron sus rizoides no pudieron registrarse en el último estadio de desarrollo, ya que se requería la presencia de éstos para considerarse de un estadio más desarrollado. Por lo tanto, no se alcanzó el estadio más avanzado esperado (Ver Figuras 49 y 53).



b.- Gráfica 47.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

En esta gráfica el estadio de protocormo duró 212 días, indicando un escaso desarrollo. El estadio de protocormo con rizoides inició a los 18 días y duró 145 días, los rizoides presentados en este estadio y en el de planta con raíz y rizoides fueron efímeros. Por otra parte este tratamiento presentó una a sincronía ya que en algunos períodos hubo la presencia al mismo tiempo de hasta cuatro diferentes estadios (Ver Figura53).

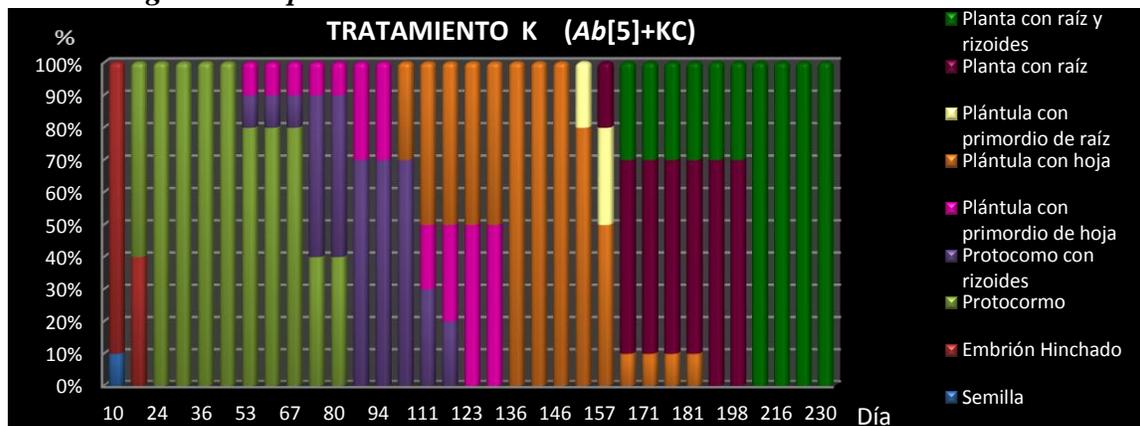


c.- Gráfica 48.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

En la gráfica 48 (tratamiento J), el estadio de semilla y el de embrión hinchado fueron de corta duración. El estadio de protocormo inició a los 18 días y duró 82 días, mientras que el estadio de protocormo con rizoides inició a los 36 días y duró 104 días, sus rizoides fueron efímeros. El estadio de planta con hojas duró 94 días. El estadio más avanzado alcanzado fue el de planta con raíz en este tratamiento (Ver Figura 53). En los tratamientos H e I se retrasó el desarrollo en general, ya que el 30% de los individuos se quedaron en el estadio de protocormo hasta el final del estudio. Además en estos dos tratamientos el desarrollo fue asincrónico, ya que se presentaron de tres a cuatro fases de desarrollo al mismo tiempo en una misma revisión, a diferencia el tratamiento J, que no se presentaron más de dos estadios al mismo tiempo y la fase de protocormo fue más corta (hasta el día 111).

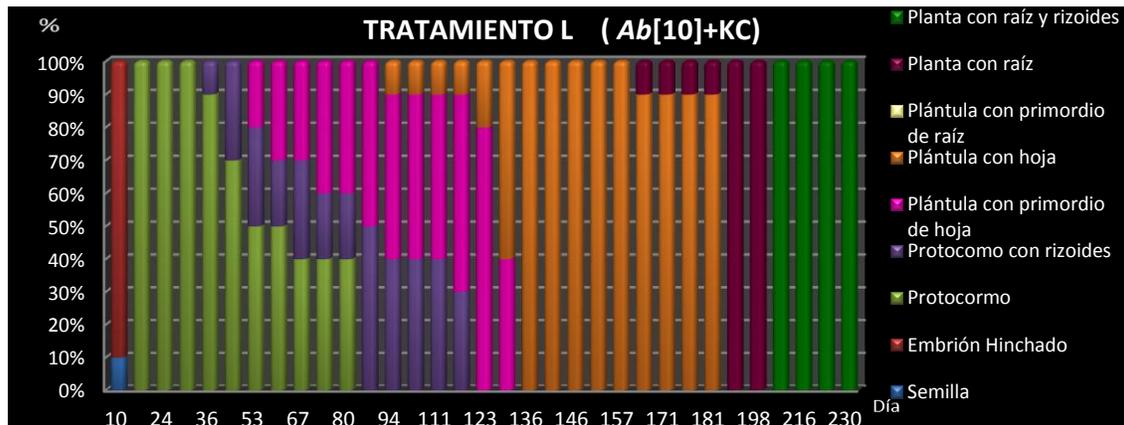
3.- Efecto en la germinación de semillas de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* con la adición de extractos de origen fúngico al medio nutritivo “Knudson C” durante el periodo de evaluación.

A.- *Agaricus bisporus*



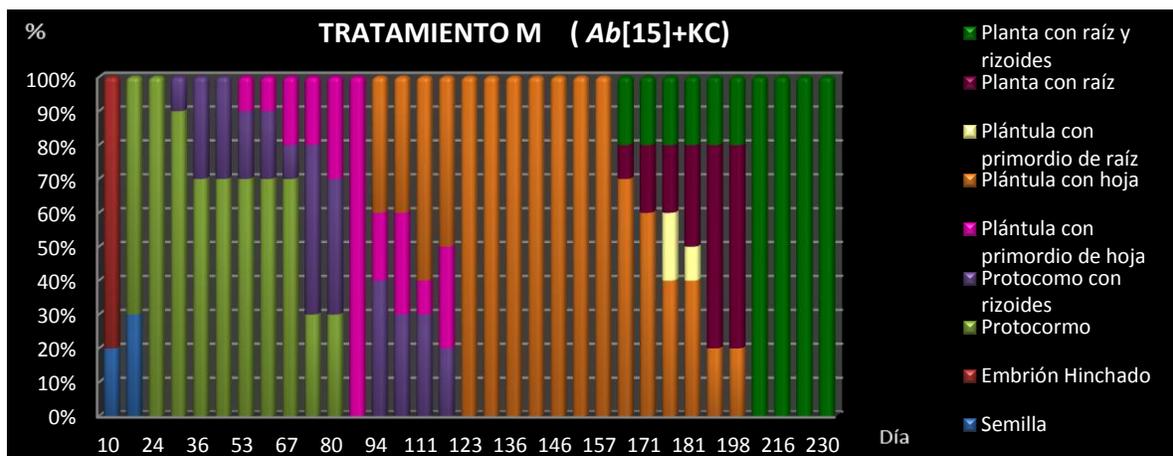
a.- Gráfica 49.- Estados de desarrollo con concentración 5 mL.

En la gráfica 49 el tercer estadio (protocormo) inició a los 18 días, se observó que duró 62 días, el estadio de plántula con hoja duró 81 días siendo la fase de más duración en el desarrollo. La presencia del primordio de raíz fue de corta duración (seis días) para posteriormente formar una raíz verdadera, la cual creció hasta el término del estudio. Finalmente, todas las semillas completaron su desarrollo (Ver Figuras 50 y 56).



b.- Gráfica 50.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

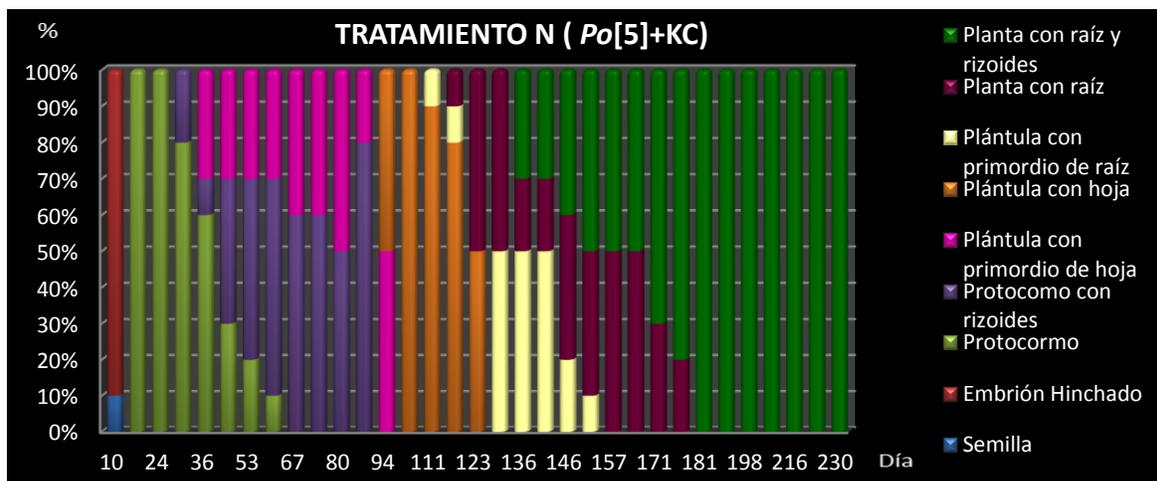
En el tratamiento L, el estadio de semilla y el de embrión hinchado se presentaron sólo hasta el día 10. El estadio de protocormo inició a los 18 días durando 62 días, al igual que el tratamiento K. El cuarto estadio (protocormo con rizoides) duró 82 días. La aparición de los primordios de hoja principió a los 53 días de desarrollo, la presencia de esta estructura dura 76 días. La duración de la presencia de plántula con hoja es similar que el tratamiento K durando 87 días. El estadio de plántula con primordio de raíz presentó un cambio de fase rápido. La aparición de plantas con raíz inició a los 164 días y el estadio planta con raíz y rizoides fue a los 211 días, durando 19 días. Todas las semillas terminaron su desarrollo en este tratamiento.



c.- Gráfica 51.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

En el tratamiento M el estadio de semilla duró 18 días, esta fase fue larga (casi el doble) que en los tratamientos K y L. El embrión hinchado está presente en la revisión del día 10, esta fase fue de corta duración al igual que el tratamiento L. El cuarto estadio (protocormo con rizoides) duró 88 días y el estadio de plántula con primordio de hoja duró 65 días. El estadio de plántula con hoja inició a los 94 días, este estadio duró 104 días siendo el estadio de mayor duración en las tres concentraciones experimentales (Ver Figuras 50 y 56).

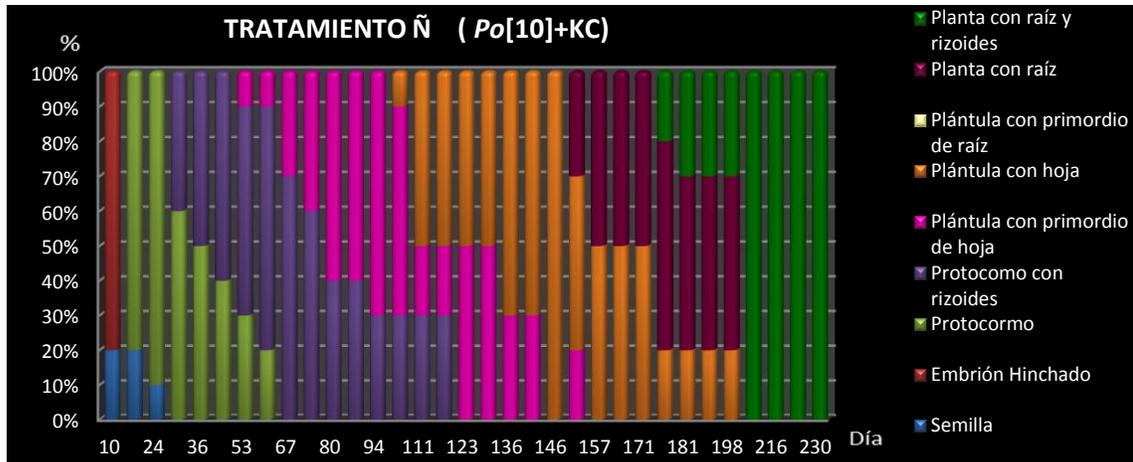
B.- *Pleurotus ostreatus*



a.- Gráfica 52.- Estados de desarrollo con concentración 5 mL.

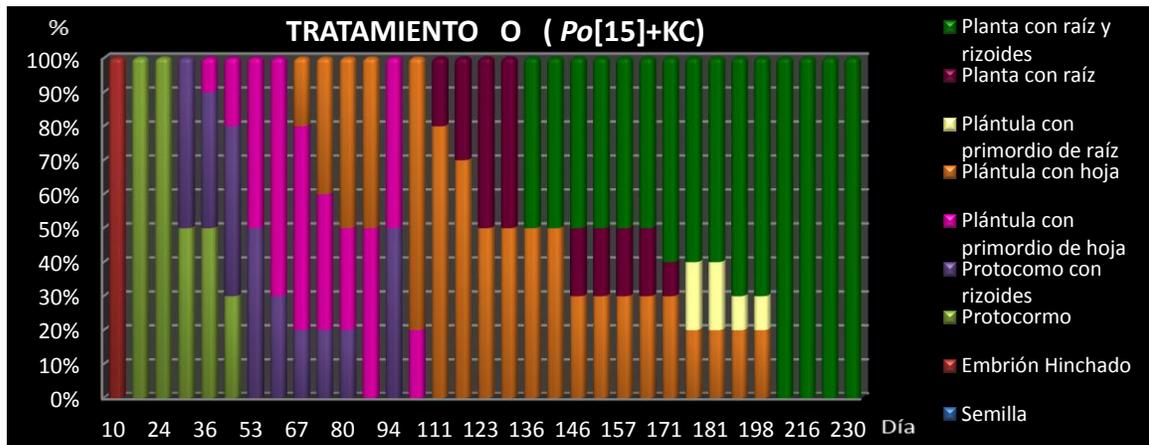
En el tratamiento N el estadio de semilla y el de embrión hinchado se presentaron sólo en el día 10. El estadio de protocormo duró 53 días y la estructura de protocormo con rizoides estuvo presente 60 días. La aparición de plántula con hoja, empezó a los 94 días, este estadio duró cinco semanas induciendo una estancia corta, ya que los tratamientos Ñ y O permanecieron en esta fase 16 y 21 semanas. Las plántulas con primordio de raíz aparecieron a los 111 días, este estadio fue largo ya que duró 59 días, indicando que siempre tuvo la generación de primordios de raíz nuevos o bien que los ya formados tardaron mucho en convertirse en raíces verdaderas, por lo tanto su presencia fue evaluada durante varias semanas. Este comportamiento no se observó en los otros tratamientos con este hongo.

El estadio de desarrollo más avanzado de planta con raíz y rizoides inició a los 136 días, siendo este tratamiento de *Pleurotus ostreatus* el mejor para la germinación, ya que todas las semillas llegan a su máximo desarrollo en un menor tiempo (a los 181 días de incubación), ya que los otros dos tratamientos lograron esto hasta los 205 días (Ver Figuras 52 y 58).



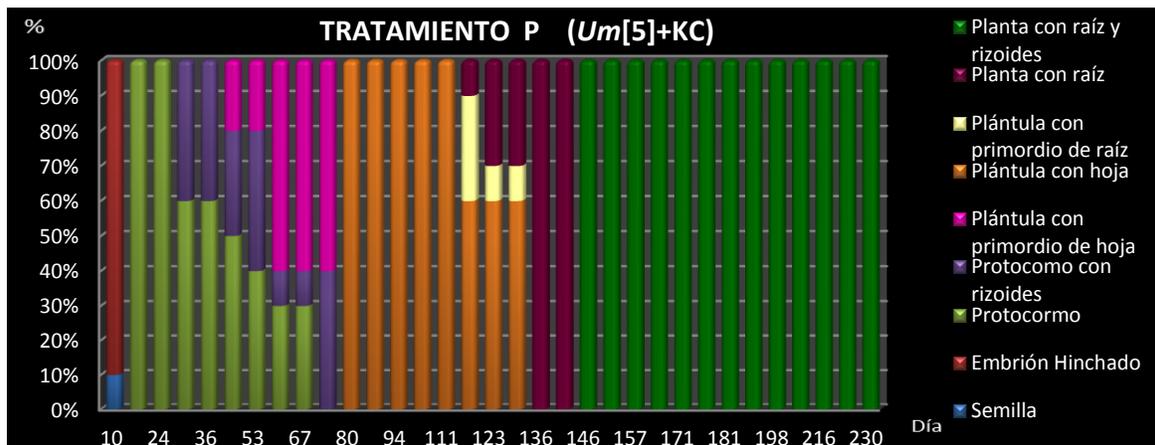
b.- Gráfica 53.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

En el tratamiento Ñ, el estadio de semilla duró 24 días, comparándolo con los tratamientos N y O, su desarrollo fue lento. El segundo estadio (embrión hinchado), está presente en la revisión del día 10 teniendo un comportamiento idéntico a los otros dos tratamientos con este hongo. El quinto estadio (plántula con primordio de hoja) inició tres semanas después que en los tratamientos N y O a los 53 días, durando 98 días manifestando un desarrollo lento. El estadio de desarrollo plántula con hoja, empezó a los 100 días, duró 98 días, induciendo rápidamente el cambio fase. El estadio de plántula con primordio de raíz, tuvo un cambio de fase rápido que no se alcanzó a registrar durante la evaluación. El estadio más avanzado planta con raíz y rizoides inició a los 177 días lo indicado que indujo un desarrollo lento, ya que los otros tratamientos alcanzaron el máximo desarrollo 41 días antes (Ver Figuras 52 y 58).



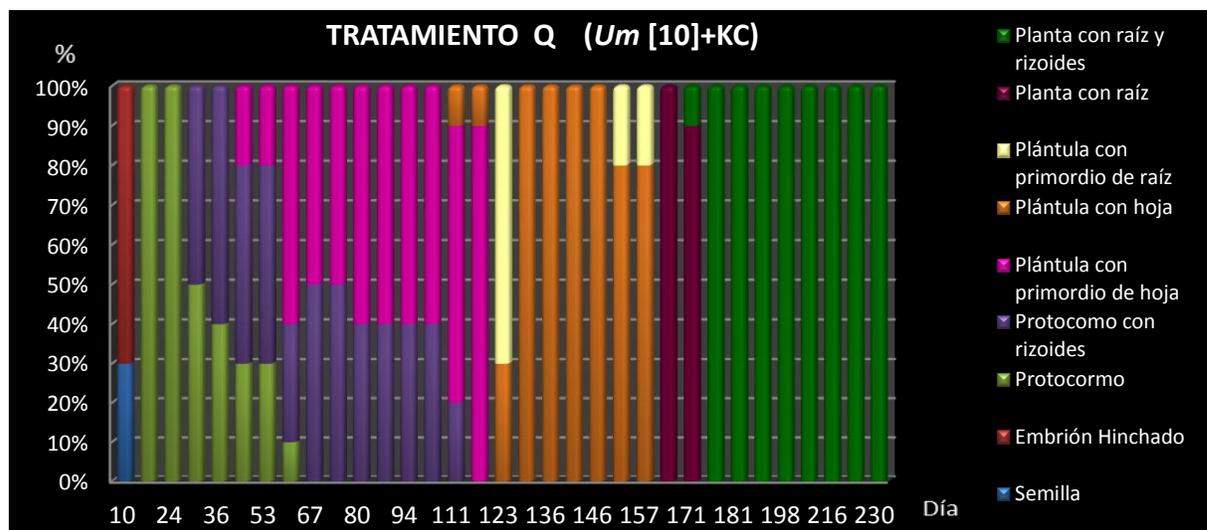
c.- Gráfica 54.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

Para la gráfica 54 en el tratamiento O el estadio uno (semilla) tuvo un cambio de fase muy rápido (menos de 10 días). El segundo estadio de desarrollo (embrión hinchado), duro hasta el día 10, su cambio de fase es rápido. El estadio más avanzado lo alcanzó la totalidad de las semillas a partir del día 205 de incubación (Ver Figuras 52 y 58).

C.- *Ustilago maydis*

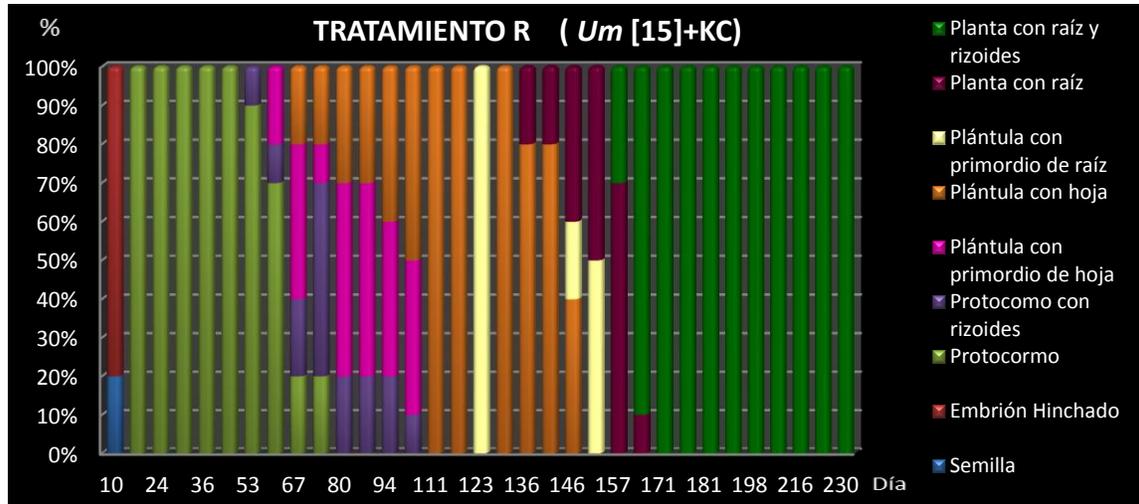
a.- Gráfica 55.- Estados de desarrollo con concentración 5 mL.

En la gráfica 55 para el tratamiento P el estadio de semilla y el de embrión hinchado se avistaron el día 10, indicando que son etapas de corta duración, coincidiendo estos mismos resultados con los otros tratamientos con este hongo. El estadio de protocormo inició a los 18 días. El estadio de desarrollo más avanzado lo alcanzan todas las plantas y de forma sincronizada a los 146 días de incubación. El desarrollo completo de la planta dura solo 102 días (Ver Figuras 54 y 60).



b.- Gráfica 56.- Estados de desarrollo con concentración 10 mL.

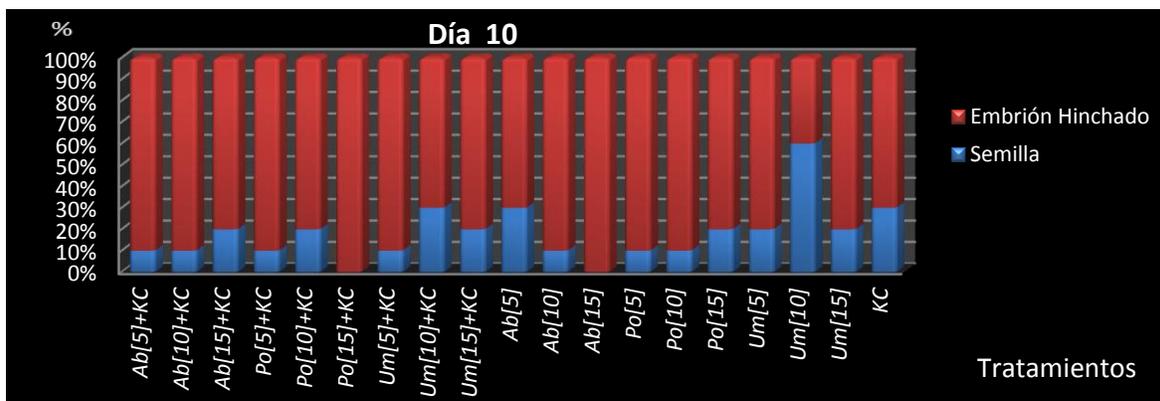
Para la gráfica 56 en el tratamiento Q se evidenciaron los nueve niveles de desarrollo notándose que el sexto estadio (plántula con hoja), empieza a los 111 días, apareciendo de una forma retardada con respecto a los otros tratamientos experimentales en los cuales, este estadio aparece en el día 80 y 67 respectivamente, evidenciándose un retraso de 40 días. El estadio más avanzado (planta con raíz y rizoides) lo alcanzan la totalidad de plantas a partir del día 178 de incubación (Ver Figuras 54 y 60).



c.- Gráfica 57.- Estados de desarrollo con concentración 15 mL.

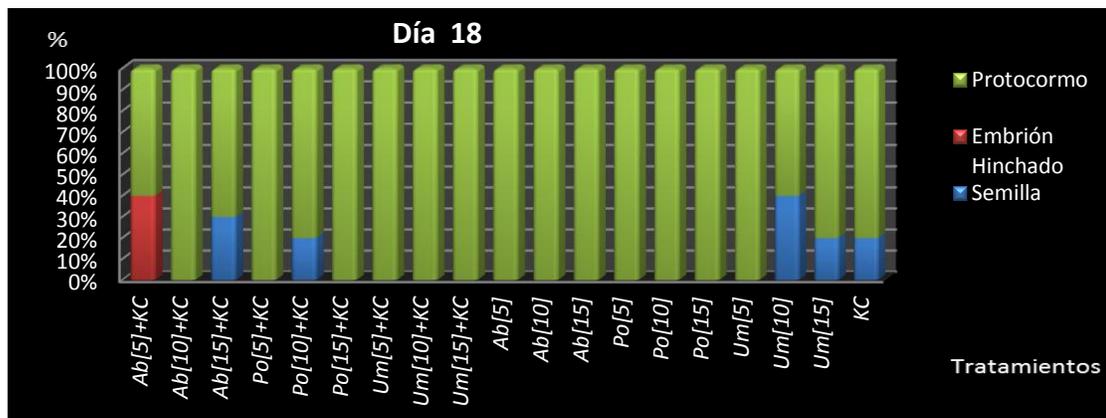
Para la gráfica 57 en el tratamiento R el estadio de semilla y el de embrión hinchado apareció el día 10 siendo rápido su cambio de estadio. El estadio de protocormo inició a los 18 días y duró 56 días, el estadio de protocormo con rizoides inició a los 53 días y duró 47 días. El quinto estadio (plántula con primordio de hoja), inició a los 60 días. El sexto estadio fenológico que es el de plántula con hoja, empieza, a los 67 días, duró 79 días desde su inicio hasta que desaparece, en la misma fecha de evaluación se presentaron cuatro estadios diferentes, haciendo evidente una gran desincronización en el desarrollo. Está a sincronía no se presentó en ningún otro tratamiento con *Ustilago maydis*. El estadio plántula con primordio de raíz, inició a los 123 días, duró 28 días. El estadio más avanzado planta con raíz y rizoides alcanza su totalidad a partir del día 171 de incubación, siendo óptimo (Ver Fig. 54 y 60).

4.- Comportamiento de la germinación de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en cada día de evaluación.



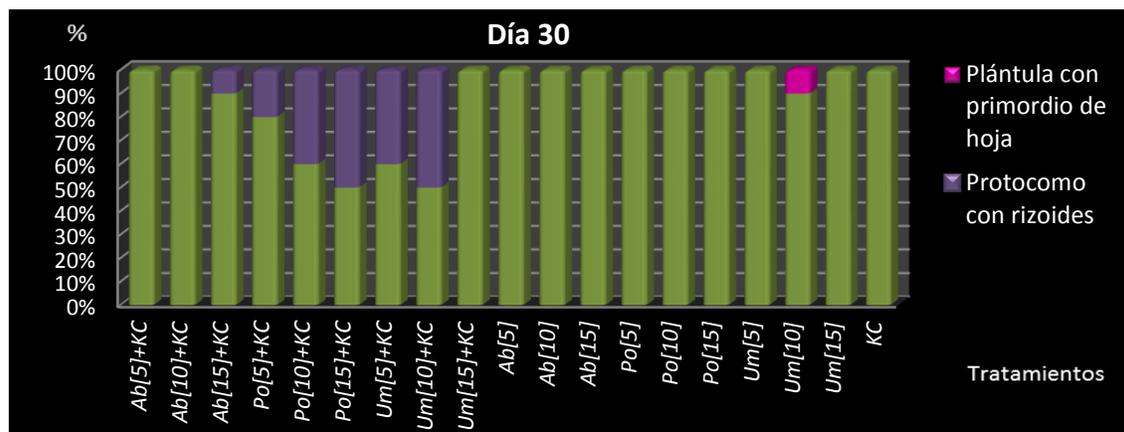
Gráfica 58.- Respuesta de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en el día 10.

En la gráfica 58 en el día 10 se observa que los mejores tratamientos son, *Pleurotus ostreatus* en concentración 15mL con “Knudson C” y *Agaricus bisporus* en concentración 15mL ya que la totalidad de las semillas pasaron al estadio de embrión hinchado, el cambio fue rápido y se dio en 10 días. El tratamiento que tuvo una menor respuesta fue el de *Ustilago maydis* en concentración 10mL, ya que el 60 % estuvo en el estadio de semillas.



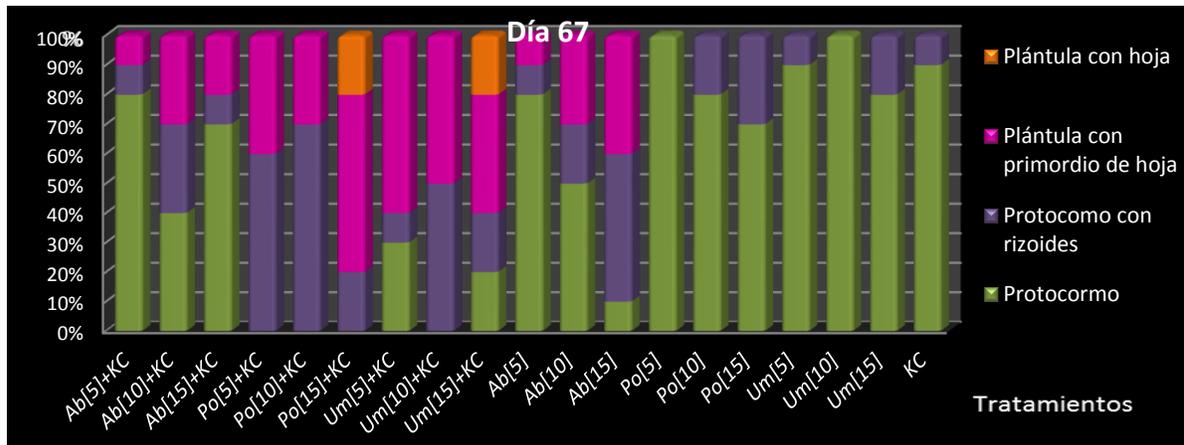
Gráfica 59.- Respuesta de *Euschile mariae* x *Euschile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en el día 18.

En la gráfica 59 en el día 18 la mayor parte de los tratamientos está respondiendo rápido y favorablemente ya que han alcanzado todos sus individuos el estadio tres (protocormo). *Ustilago maydis* en concentración de 10mL y 15mL, *Agaricus bisporus* con “Knudson C” en concentración 15mL, *Pleurotus ostreatus* con “Knudson C” en concentración 10mL y el testigo (KC) presentaron individuos en el estadio de semilla.



Gráfica 60.- Respuesta de *Euschile mariae* x *Euschile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en el día 30.

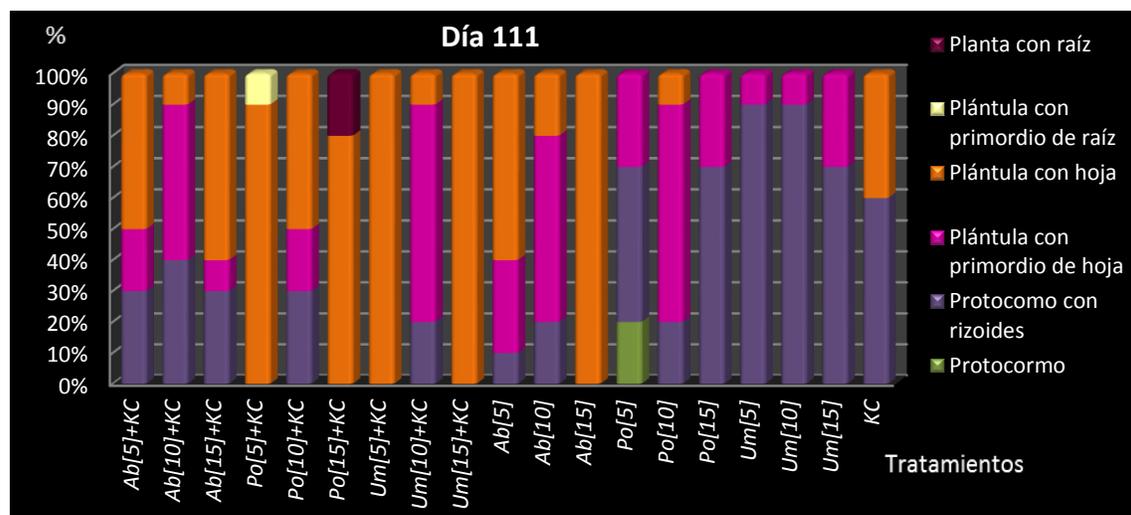
En la gráfica 60, en el día 30 se evidencia que el mejor tratamiento fue *Ustilago maydis* en concentración de 10mL ya que alrededor del 10 % de los protocormos han pasado de la fase tres a la cinco (plántula con primordio de hoja), a pesar de que en las revisiones anteriores estaba atrasado. Le siguen los tratamientos de *Pleurotus ostreatus* con “Knudson C” en sus tres concentraciones, entre más alta fue la concentración mejor la respuesta.



Gráfica 61.- Respuesta de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en el día 67.

En el día 67 los mejores tratamientos fueron *Pleurotus ostreatus* con “Knudson C” en concentración de 15mL y *Ustilago maydis* con “Knudson C” en concentración de 15mL alcanzado el estadio seis (plántula con hoja). Todos los tratamientos con “Knudson C” se comportan mejor.

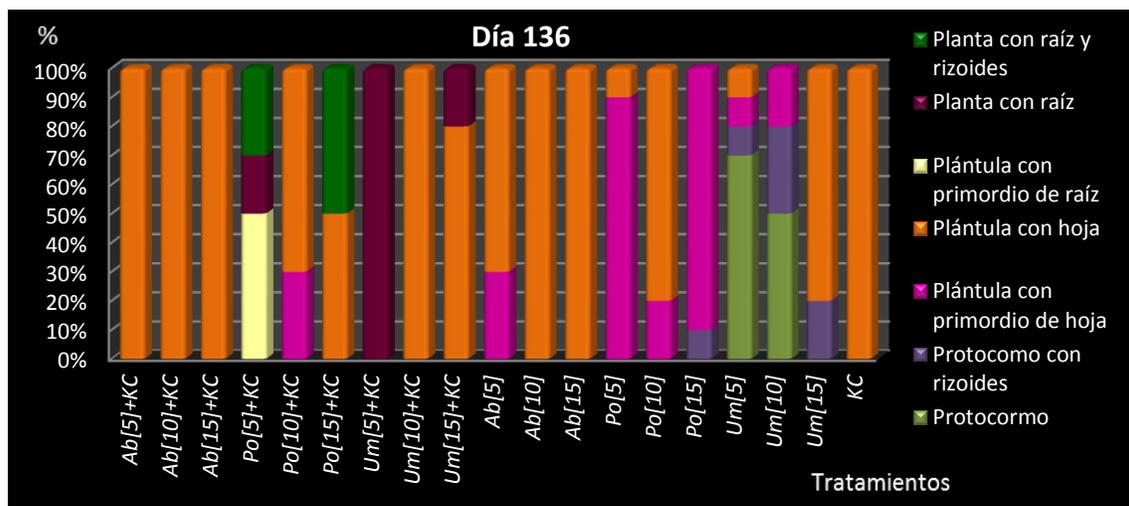
Agaricus bisporus sin la adición de “Knudson C” obtuvo una respuesta favorable y entre más alta fue su concentración tuvo una mejor respuesta. El medio *Pleurotus ostreatus* en concentración 5mL y *Ustilago maydis* en concentración 10mL estuvieron en el estadio tres (protocormo) al 100%, no mostraron efecto promotor de la germinación.



Gráfica 62.- Respuesta de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en el día 111.

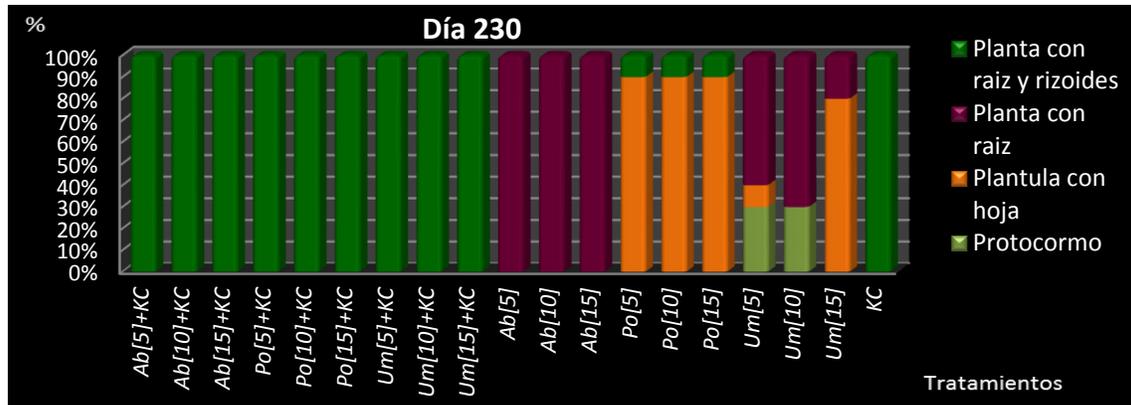
En el día 111 los mejores tratamientos son el extracto de *Pleurotus ostreatus* con “Knudson C” en concentración 15 mL ya que han alcanzado el estadio ocho que es el de plántula con raíz, notándose un rápido enraizamiento, ya que no se observó la presencia de primordios de raíz. Le sigue *P. ostreatus* con “Knudson C” en concentración 5mL con “Knudson C”, el cual ha alcanzado el estadio 7 que es el de plántula con primordio de raíz.

El tratamiento con el extracto de *Pleurotus ostreatus* en concentración 5mL, es el menos eficiente hasta el momento ya que algunos individuos se encuentran aún en el estadio tres que es el de protocormo. Es evidente que la adición al medio de los extractos solos de *Ustilago maydis* tienen un efecto inductor del desarrollo menor que el testigo al cual se le adicionaron sales basales de “Knudson” y a todos los demás tratamientos experimentales los cuales, todos alcanzaron la fase de plántula con hoja.



Gráfica 63.- Respuesta de *Euschile mariae* x *Euschile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en el día 136.

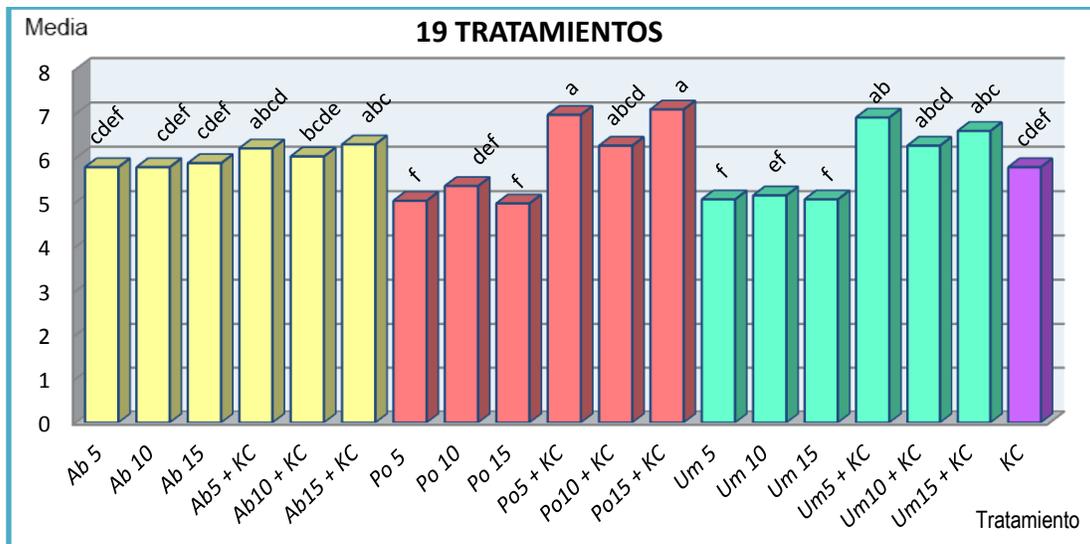
En el día 136 los mejores tratamientos fueron *Pleurotus ostreatus* con “Knudson C” en concentraciones 5mL y 15mL ya que el 30 % de sus individuos alcanzaron el máximo desarrollo (planta con raíz y rizoides) (Ver Figura 80). Le sigue *Agaricus bisporus* adicionando “Knudson C” en concentraciones 5mL, 10mL y 15mL (Ver Figura 50), *Ustilago maydis* más “Knudson C” en concentración 10mL (Ver Figura 54), *Agaricus bisporus* en concentraciones 10mL y 15mL al igual que el testigo se encuentran en su totalidad en el estadio de plántula con hoja (Ver Figura 51).



Gráfica 64.- Respuesta de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* en los 19 tratamientos experimentales en el día 230.

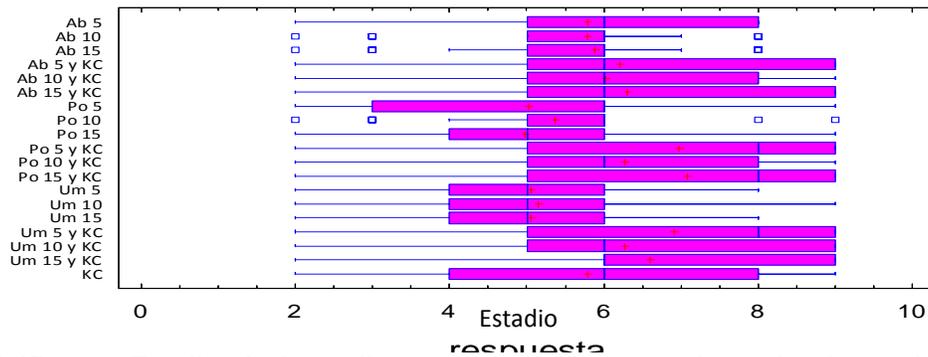
En la gráfica 64 al término del estudio (día 230 de desarrollo) fue evidente que si bien hubo tratamientos que alcanzaron su máximo desarrollo en menos tiempo, a los 146 días, diez fueron los tratamientos que lograron alcanzar el máximo nivel de desarrollo en su totalidad (entre ellos el testigo), (Ver Figuras 56, 58 y 60). Es importante señalar que todos los medios que contenían las sales minerales de “Knudson C”, las plántulas terminaron su desarrollo y los que carecieron de estas se quedaron en estadios intermedios o con un desarrollo menor. De los tratamientos con extractos, pero sin sales de “Knudson C”, el que indujo por sí mismo el desarrollo de las plantas fue el de *Agaricus bisporus* en sus tres concentraciones, demostrando que proporciona los componentes minerales adecuados y suficientes para lograr la formación de plantas completas al 100%.

5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.



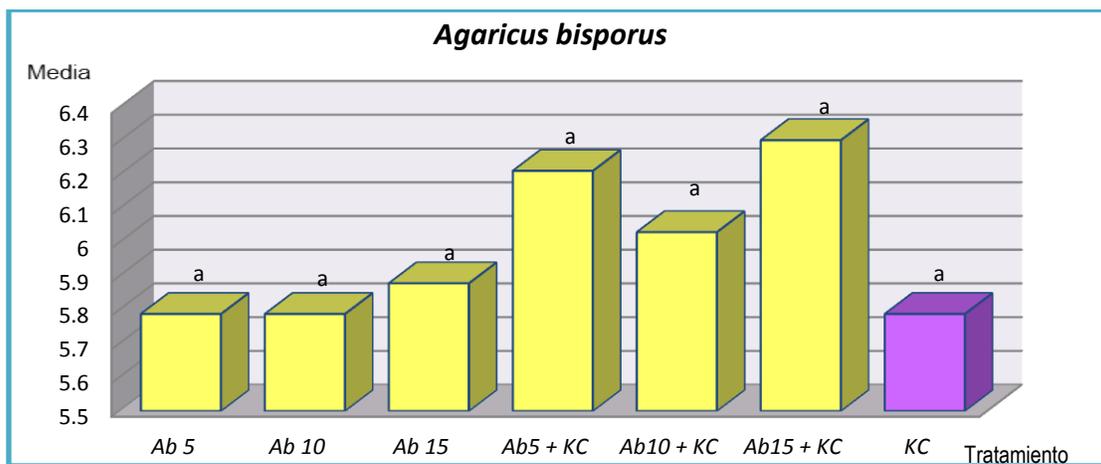
Gráfica 65.- Comparación de los 19 tratamientos.

En la gráfica 65 hay diferencias significativas con relación a los tratamientos, ya que *Pleurotus ostreatus* en sus concentraciones de 5mL y 15mL al igual que *Ustilago maydis* en concentración de 5mL adicionado con “Knudson C”, tienen una respuesta significativamente mejor para la inducción de la germinación y crecimiento de las plantas *in vitro* del híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, en comparación con otros tratamientos y el mismo testigo.



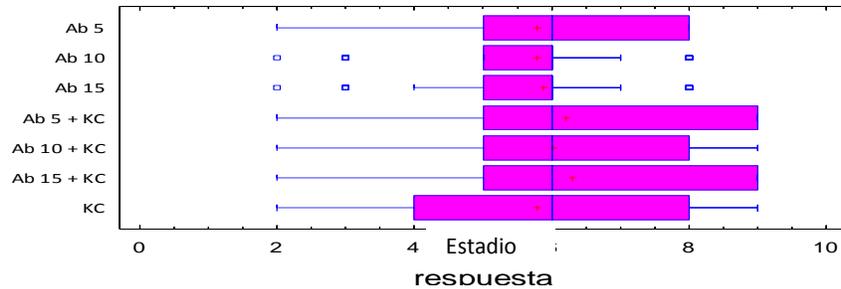
Gráfica 66.- Estadios de desarrollo en cada tratamiento experimental en la germinación de *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

En la gráfica 66 el tratamiento *Ustilago maydis* en su concentración de 15mL adicionando “Knudson C” llegó al máximo estadio (planta con raíz y rizoides), y el estadio menor alcanzado por todos sus individuos fue el seis (plántula con hoja), siendo por esto el mejor.



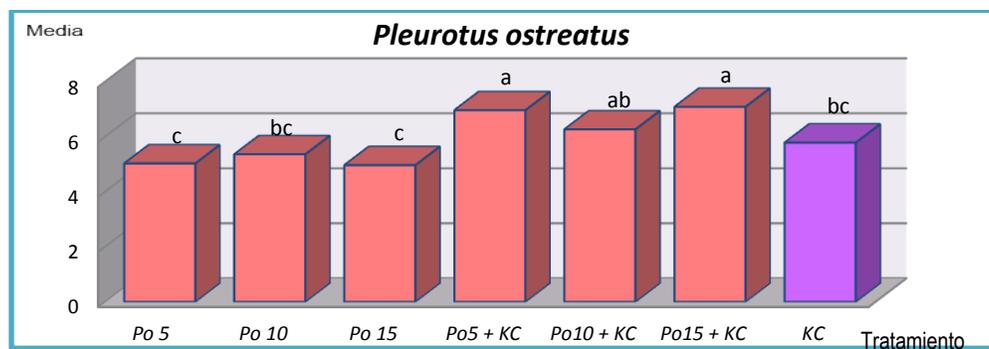
Gráfica 67.- Comparación del efecto de los extractos de *Agaricus bisporus* con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo, durante la germinación de *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

En la gráfica 67 el análisis estadístico de la comparación múltiple de las medias en *Agaricus bisporus*, mostró que no hay diferencias significativas entre tratamientos.



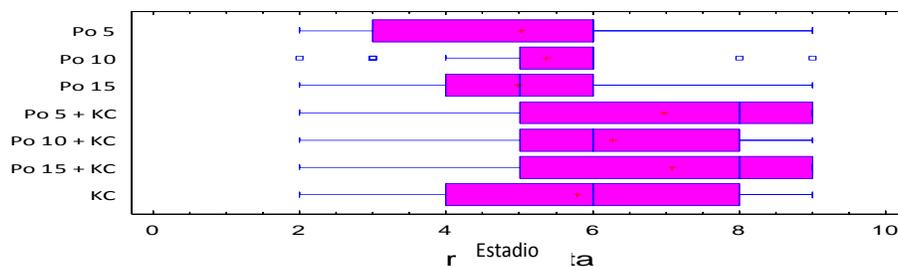
Gráfica 68.- Tratamientos con *Agaricus bisporus* y el testigo.

En esta grafica 68 *Agaricus bisporus* adicionado con las sales de “Knudson C” en sus concentraciones de 5mL y 15mL llegó al último estadio de desarrollo (planta con raíz) y el menor estadio alcanzado fue el cinco (plántula con primordio de hoja), siendo éste tratamiento el mejor.



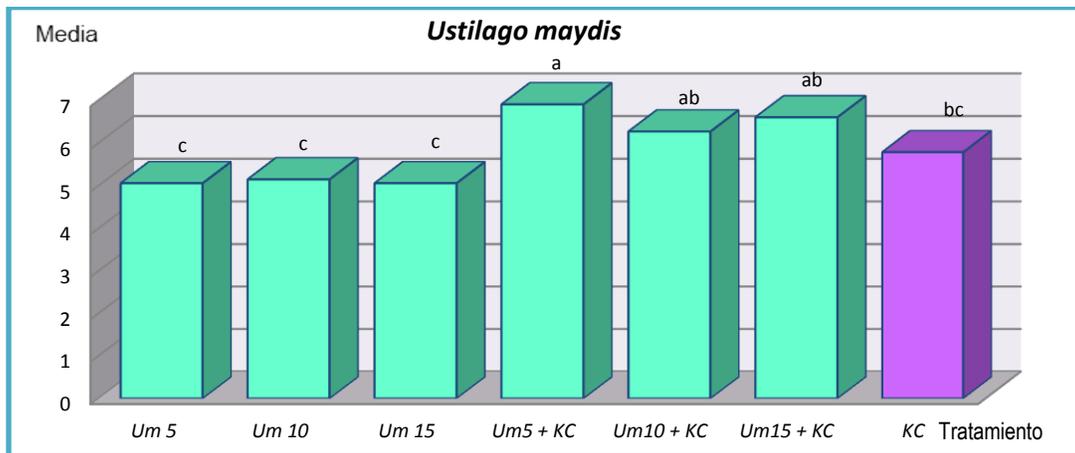
Gráfica 69.- Comparación del efecto de los extractos de *Pleurotus ostreatus* con y sin medio nutritivo “Knudson C” en el desarrollo durante la germinación de *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

En la gráfica 69 en la comparación múltiple se observan diferencias significativas con relación a los tratamientos *Pleurotus ostreatus* adicionando “Knudson C” en sus concentraciones de 5mL y 15mL, que fueron mejor que el testigo (KC).



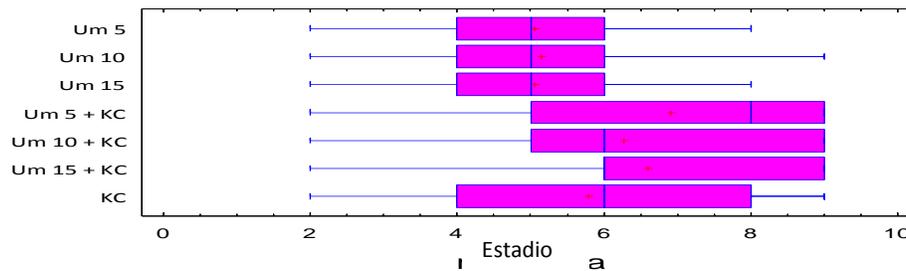
Gráfica 70.- Tratamientos con *Pleurotus ostreatus* y el testigo.

En esta grafica 70 los tratamientos *Pleurotus ostreatus* adicionando con “Knudson C” en sus concentraciones de 5mL y 15mL llegaron al estadio más avanzado de desarrollo (planta con raíz y rizoides) y el menor estadio alcanzado fue el cinco (plántula con primordio de hoja), por lo tanto tienen mejor velocidad de crecimiento.



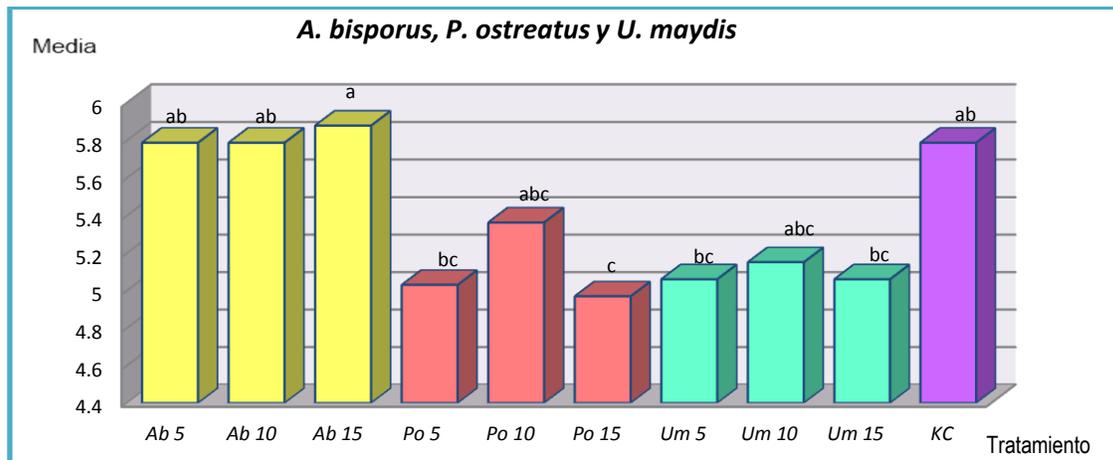
Gráfica 71.- Comparación del efecto de los extractos de *Ustilago maydis* con y sin medio nutritivo "Knudson C" en el desarrollo durante la germinación de *Euschile mariae* x *Euschile citrina*.

En la gráfica 71 se evidencia que *Ustilago maydis* adicionado con sales minerales de "Knudson C" en concentración de 5mL tuvo una respuesta significativa mejor que el testigo y que los tratamientos con *U. maydis* sin la adición de las sales de "Knudson C" en la germinación y desarrollo de *Euschile mariae* x *Euschile citrina*.



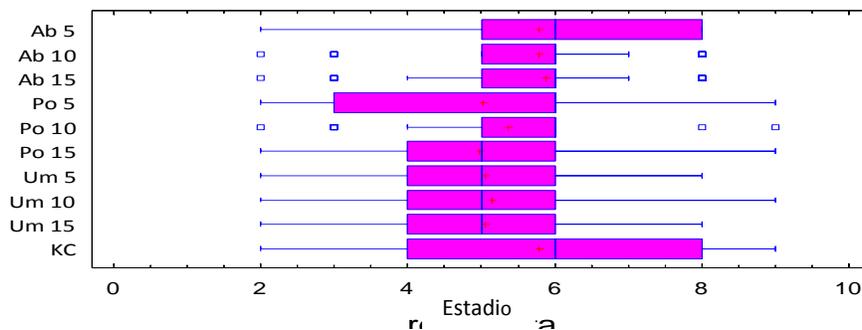
Gráfica 72.- Tratamientos con *Ustilago maydis* y el testigo.

Ustilago maydis adicionando con las sales minerales de "Knudson C" en concentración de 15mL llegó al máximo estadio (planta con raíz y rizoides), y el menor estadio alcanzado por los individuos fue el de planta con hoja, por lo tanto fue el de mejor velocidad de crecimiento. Mientras que el desarrollo de *U. maydis* en concentraciones 5mL, 10mL y 15mL presenta una menor velocidad pero una mejor sincronía.



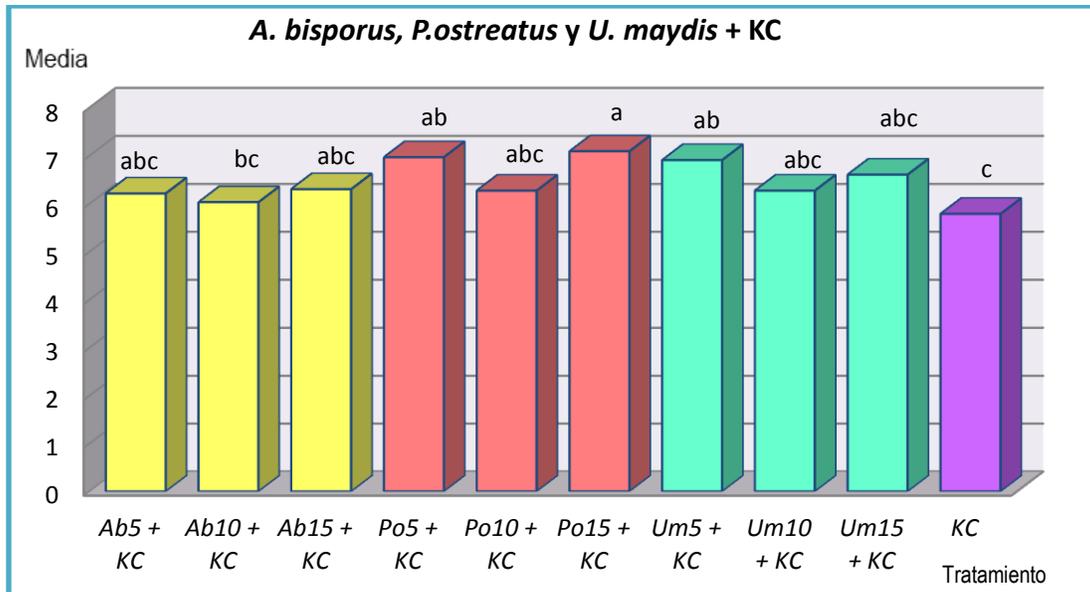
Gráfica 73.- Comparación del efecto de los extractos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* sin medio nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Se observan diferencias significativas con relación a los tratamientos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis*, teniendo estos dos últimos una respuesta menor.



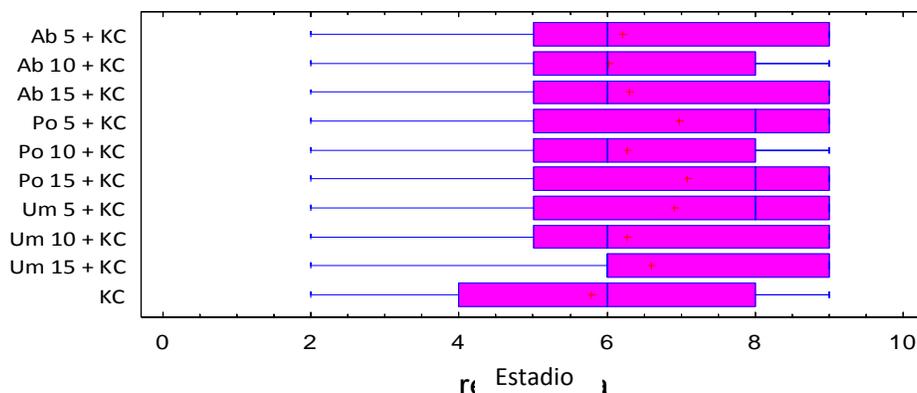
Gráfica 74.- Tratamientos sin “Knudson C” y el testigo.

En la gráfica 74 el mejor tratamiento fue *Agaricus bisporus* en concentración de 5mL, el cual llegó al estadio ocho (planta con raíz) y su menor estadio alcanzado fue el cinco (plántula con primordio de hoja), por lo tanto es el tratamiento que tiene mejor velocidad de crecimiento. Sin embargo, *A. bisporus* en concentraciones de 10mL y 15mL y *Pleurotus ostreatus* en concentración de 10mL tienen mejor sincronía ya que todos sus individuos se encuentran en el mismo estadio.



Gráfica 75.- Comparación del efecto de los extractos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* con nutritivo “Knudson C” en la germinación y desarrollo de *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

En la gráfica 75 se observa que *Pleurotus ostreatus* adicionado con las sales basales de “Knudson C” en concentración de 15mL es significativamente mejor que el testigo. Los tratamientos con “Knudson C” adicionados con extracto en general fueron mejores que el testigo.



Gráfica76.- Tratamientos con “Knudson C” y el testigo.

En la gráfica 76 se observa que el tratamiento con *Ustilago maydis* adicionado con las sales de “Knudson C” en concentración 15mL, es ligeramente mejor que los demás ya que todos sus individuos han alcanzado por lo menos el estadio seis.

3.- COMPORTAMIENTO DE LA GERMINACIÓN EN *Guarianthe aurantiaca* Y EL HÍBRIDO *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Los embriones de las orquídeas tienen materiales que se depositan en forma de lípidos y proteínas en el citoplasma para su germinación y desarrollo (Lee *et al.*, 2006). Si bien en la naturaleza, la mayoría de las orquídeas dependen de la infección de un hongo simbiote para la germinación, la mayoría de las especies son capaces de germinar *in vitro* en el laboratorio, usando el tipo y la cantidad adecuada de azúcares y sales para su alimentación. Los carbohidratos, sales minerales y sustancias complementarias (vitaminas, fitohormonas, aminoácidos) pueden adicionarse al medio de cultivo mediante fórmulas nutritivas preestablecidas (“Knudson C”, “Murashige y Skoog” y otras) preparadas con reactivos analíticos o bien pueden adicionarse complejos o extractos naturales que las contengan y de esta forma lograr la germinación *in vitro*. Harrison y Arditti (1978), mencionan que los requerimientos de carbohidratos para la germinación de semillas de orquídea son diversamente variables, por lo tanto, la respuesta *in vitro* dependerá de las variaciones en la composición del complejo en cada caso, sumado a los diferentes requerimientos nutricionales y hormonales intrínsecos de cada especie de orquídea (Hadley, 1982).

Lo anterior coincide con lo establecido para la germinación asimbiótica *in vitro* de *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* que fue favorable al utilizar las sales basales “Knudson C”, así también con lo propuesto por Arditti (1972) y Gil y colaboradores (2007) quienes mencionan que el éxito en el cultivo *in vitro* de orquídeas depende de la selección del medio nutritivo a utilizar. Hicks (2005), señala que el 75 % de especies de orquídeas, tienen una respuesta favorable *in vitro* cuando se les suministra un medio de cultivo con sales minerales para su nutrición.

Se han adicionado diversos extractos vegetales al medio de cultivo para la inducción de la germinación de orquídeas, donde varios complejos químicos naturales como lo son el homogenizado de plátano, papa (Arditti y Ernst, 1984), jitomate, harina de pescado, endospermo líquido de coco (Merino, 1987), manzana (Flores *et al.*, 2008), germinado de soya (Obaidul *et al.*, 2000) y extracto de piña (Kitsaki *et al.* 2004), entre otros. Santos y colaboradores (2005), reportan un porcentaje de germinación entre 70 y 90% en *Laelia albida* utilizando el medio de “Knudson C”, suplementado con extracto de papa.

Los hongos tienen un gran potencial como alimento con propiedades nutricionales y medicinales que favorecen la salud. Estas propiedades son únicas y diferentes a las aportadas por otros alimentos ampliamente consumidos, ya que los hongos constituyen un reino de la naturaleza independiente de las plantas y animales (Feeney, 2008) contienen fibra, minerales, proteínas, grasas, vitaminas, así como otros componentes (Jayakumar, *et al.*, 2007). En la antigüedad eran conocidos por prevenir y aliviar enfermedades generadas por bacterias, hongos y patógenos parásitos (Jayakumar, *et al.*, 2007), recientemente, se utilizan en terapias antitumorales, antivirales y otros tratamientos (Yang, *et al.*, 2002).

Esta gran actividad nutricional y medicinal de los hongos, basada en una composición bromatológica rica y compleja, indica que si sus extractos son adicionados como complementos nutritivos en plantas, estos seguramente tendrán algún tipo de actividad biológica positiva o negativa. Al utilizar, en el presente estudio, los extractos fúngicos la actividad biológica de los hongos basidiomicetos estudiados fue totalmente positiva para inducir la germinación de ambas especies pero variaron en el tiempo de inducción, como en el porcentaje de germinación. Para *Guarianthe aurantiaca*, al adicionar el extracto del hongo *Ustilago maydis*, en tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL), a las sales basales “Knudson C” la germinación se inició a partir de los 15 días de cultivo (Ver Gráfica 20) entre 20% y 70%, obteniendo un mayor porcentaje a mayor concentración; mientras que, en las semillas del híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* se inició a los 10 días, entre un 40% y 100% de germinación, este último porcentaje se obtuvo en aquellos tratamientos donde se empleó 15mL del extracto fúngico de *Pleurotus ostreatus* adicionado a las sales basales “Knudson C” y en 15 ml del extracto fúngico de *Agaricus bisporus* sin sales basales (Ver Gráfica58).

La composición de las tres especies de hongos estudiados, a partir de los cuales se obtuvieron los extractos fúngicos, contienen entre ocho y diez tipos de carbohidratos, por lo que al utilizarlos con o sin el medio nutritivo, el efecto en la germinación asimbiótica *in vitro* de los dos ejemplares de orquídeas en estudio fue optimo; ya que, aportaron un extra de hidratos de carbono. Esto coincide con Ernst y colaboradores (1971) quienes al utilizar diferentes tipos de azúcares como los monosacáridos D-Glucosa, D-Fructuosa, D-Galactosa; disacáridos como sacarosa, maltosa, celobiosa, trealosa, melibiosa y lactosa y trisacáridos como farinosa, melezitosa y almidón, adicionados al medio nutritivo “Knudson C” para germinar semillas de *Phalaenopsis* obtuvieron resultados favorables en la germinaron.

4.- COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO EN *Guarianthe aurantiaca* Y EL HIBRIDO *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

En el presente estudio, la especie de *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* alcanzaron el máximo estadio de desarrollo durante la germinación asimbiótica *in vitro* que fue el de planta con raíz y rizoides.

Las plantas completas (planta con raíz y planta con raíz y rizoides) de ambos ejemplares se desarrollaron en el medio de cultivo con sales basales “Knudson C” y también con la adición de extractos fúngicos; sin embargo, al utilizar únicamente los extractos como medio de cultivo, las plantas de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* son las únicas que alcanzan este estadio ontogénico (Ver Gráfica 64); ya que las de *Guarianthe aurantiaca* se desarrollan solo con el extracto de *Agaricus bisporus* (Ver Gráficas 2,3,4 y 26). Se han señalado (Hahn y Paek, 2001; Harrison y Arditti, 1978) que las diferentes especies de orquídeas tienen requerimientos particulares de nutrimentos para la germinación y subsecuentemente para el crecimiento de las plántulas de aquí que sea importante realizar investigaciones para definir los nutrientes con diferentes composiciones químicas y concentraciones y otras sustancias provistas por el hongo simbiote que inducen la formación de plantas completas a partir de semillas.

La diferenciación de plantas completas se inicia a los 111 días de cultivo con un 20% en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* con el medio de 15mL de extracto de *Pleurotus ostreatus* (Ver Gráfica 62) mientras que, en la especie *Guarianthe aurantiaca* a los 137 días con 10% en el medio de 10mL de extracto de *Ustilago maydis* (Ver Gráfica 24) ambos medios adicionados con las sales basales “Knudson C”. Alberico (2004), reporta que en la germinación *in vitro* de semillas de *Laelia speciosa*, utilizo cuatro medios “Knudson C”; “Knudson C” adicionado con 0.002g de AG₃; “Knudson C” con extracto de plátano y carbón activado; y “Knudson C” con extracto de plátano, carbón activado y 0.002g de AG₃, donde el mejor resultado lo obtuvo con “Knudson C” adicionando extracto de plátano y carbón activado y concluye que el medio de “Knudson C” es favorable, pero lo es más con este extracto natural aunado al carbón activado. Fay (1994) reporto que la adición de pulpa de plátano y carbón activado en el medio de cultivo, incrementó el crecimiento de especies de orquídeas amenazadas como *Dendrobium spectalissimum*, *Cattleya dowiana* var. *aurea*, *Clowesia rosea*, *Epidendrum ilense* y *Cymbidium rectum*, el extracto de plátano contiene vitaminas (B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, C, etc.), sodio, zinc, yodo, hierro, calcio, magnesio, potasio, triptófano, betacaroteno, cobre, manganeso, fósforo, selenio, proteínas, agua, sacarosa, glucosa, celulosa, almidón y dextrosas; comparado con los extractos fúngicos, estos también son ricos en vitaminas, azúcares y minerales (Vidalie, 1976; Lizarraga y López 1998; Paredes, *et al*, 2006; Ramos, 2007 y Sánchez, 2009) como el plátano; por lo tanto, en este estudio al suplementar el medio nutritivo “Knudson C” con extractos fúngicos, se promovió la respuesta del desarrollo de las plántulas durante la germinación de las orquídeas.

Sin embargo, el desarrollo de la plántula durante la germinación de la especie *Guarianthe aurantiaca* en el medio con extracto fúngico de 5mL, 10mL y 15mL de *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis*, sin sales nutritivas “Knudson C”, promovió el inicio de la germinación y únicamente el cambio de fase al estadio de protocormo, mismo estadio que se mantiene en la naturaleza cuando no se encuentra el hongo simbiote (Ver Gráficas 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 26), contrariamente a lo que señalan Arditti y colaboradores (1982), quienes al emplear el homogenizado de plátano adicionado al medio nutritivo tiene un efecto inhibitorio sobre la germinación; George y Sherrington (1984), señalan que al adicionar el endospermo de coco inhibe el crecimiento de embriones cultivados *in vitro*, sugiriendo que es inductor natural de la dormancia; Obaidul y colaboradores (2000), reportan que al utilizar diversos extractos como el de papa, plátano y germen de soya combinados con sacarosa indujeron la germinación de semillas de *Cattleya* a las 10 semanas, encontrando que a mayor concentración de los extractos naturales provocaron efectos deletéreos en la germinación y a menor concentración incrementaron la producción de brotes. Lo contrario sucede en el presente estudio cuando los extractos fúngicos de *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* son adicionados a las sales nutritivas de “Knudson C” promoviendo el cambio de fase de los protocormos de *Guarianthe aurantiaca* hasta obtener plantas completas.

En el presente estudio el efecto de los extractos fúngicos ejercieron en los dos ejemplares de orquídeas respuestas significativas sobre el desarrollo de las diferentes fases ontogénicas, ya que al final del cultivo (227 y 230 días) en la especie *Guarianthe aurantiaca*, aun cuando se desarrollaron plantas completas permaneció una alta proporción del estadio de semilla y protocormo a diferencia del híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina* donde la mayor proporción fue el de plantas completas con raíz y rizoides y en menor proporción la de protocormo, Álvarez y colaboradores (1990) y McKendrick, (2000), señalan la gran influencia que ejerce el genotipo en la respuesta al cultivo *in vitro*, lo que obliga a llevar a cabo estudios específicos para cada especie; Pierik y colaboradores (1988) además, señalan que algunos factores como luz, temperatura, pH y concentración de sales afectan la germinación y crecimiento de las orquídeas, influyendo de distintas formas, incluso en especies pertenecientes a un mismo género. Rodríguez y colaboradores (2001) señalan, que al evaluar la germinación de las semillas de cuatro especies de orquídeas silvestres, los resultados mostraron diversidad de respuestas en los diferentes medios de cultivo.

El utilizar el medio nutritivo adicionado con extractos de origen fúngico fue significativo ya que le proporciono un extra de minerales a las orquídeas de estudio, *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, para inducir la germinación y el desarrollo de los diferentes estadios. En el híbrido la combinación del medio “Knudson C” con todos los extractos fue más significativo para inducir el desarrollo de plantas con raíz y rizoides ya que se obtuvo un 100% de este estadio, mientras que para *G. aurantiaca* ese porcentaje solo se presentó al adicionar la más alta concentración del extracto de *Agaricus bisporus* y con las dos concentraciones más bajas de *Ustilago maydis*. Los minerales son importantes para los organismos siendo los alimentos naturales la principal fuente de metales, presentándose estos en forma de un complejo orgánico natural. Los elementos minerales son requeridos por las plantas durante toda la vida y son necesarios para procesos metabólicos y estructurales. Los hongos empleados en este estudio contienen diversos oligoelementos (Ver Anexo I), el champiñón o *Agaricus bisporus* contiene potasio, cobre, fósforo, calcio, magnesio, manganeso, hierro, zinc y sodio, la seta o *Pleurotus ostreatus* presenta fósforo, potasio, calcio, zinc, cobre, magnesio, hierro, manganeso y aluminio y el huitlacoche o *Ustilago maydis* contiene fósforo, sodio, potasio, hierro y magnesio. Siendo ricos en minerales; el fósforo es importante en el crecimiento de los tejidos, el hierro es esencial para el crecimiento tisular que generalmente se agrega en forma de quelato, algunos tejidos son sensibles al ácido bórico, manganeso y zinc (Vidalie, 1976; Sánchez, 2009). Probablemente, las semillas del híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, a diferencia de las de *G. aurantiaca*, fueron menos sensibles a la adición de los extra minerales que le proporcionaron los extractos fúngicos, de aquí que resultara más rápida la inducción de la germinación así como el completo desarrollo de las plantas.

Los extractos fúngicos para este estudio, adicionados al medio de sales basales “Knudson C”, constituyeron una fuente considerable y rica de componentes orgánicos como las vitaminas, proteínas y aminoácidos, así como carbohidratos (Ver Anexo I) para promover también la germinación y desarrollo de plantas de *Guarianthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*. Los hongos constituyeron una fuente considerable de diversas vitaminas; *Agaricus bisporus* contiene ácido fólico, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, biotina y ergosteína; *Pleurotus ostreatus* contiene altas concentraciones de tiamina, riboflavina y niacina, biotina, ácido ascórbico, vitamina D, ácido fólico, ergosteína, y piridoxina; *Ustilago maydis* presenta en sus constituyentes ácido fólico, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, niacina, piridoxina, retinol y biotina; de diversos aminoácidos esenciales: *Agaricus bisporus* contiene nueve: cisteína, metionina, treonina, valina, isoleucina, leucina, lisina, tirosina y fenilalanina además de ser una fuente de proteínas. *Pleurotus ostreatus*, contiene 18: ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina, arginina, alanina, prolina, cistina, es rico en lisina, fenilalanina, histidina, treonina, tirosina, valina, metionina, isoleucina, leucina y triptófano. *Ustilago maydis* incluye seis en su composición química, metionina, sobresaliendo la lisina y buenos niveles de metionina, isoleucina, leucina, treonina y aminoácidos azufrados; y de diversos carbohidratos; *Agaricus bisporus* contiene nueve, una alta proporción de quitina y glucanos, en sus paredes celulares, manitol y en bajas proporciones trealosa, glucosa, galactosa, manosa, xilosa y ribosa; *Pleurotus ostreatus* contiene ocho como pentosas, hexosas, azúcares-ácidos, sacarosa, azúcares alcohólicas, metil- pentosas y aminoazúcares como la quitina El análisis de los componentes de *Ustilago maydis* contiene 10 como glucosa, fructosa, manosa, glicerol, sorbitol, manitol que es característico de este hongo y predominante, además de polifenoles, β -glucano, arabinosa y azúcares libres (Müller y Loeffler, 1976; Alexopoulos y Mims, 1985; Bonifaz, 1990; De Diego, 1990; Herrera y Ulloa, 1990; Galindo, 1991; García, 1993; Valverde, *et al*, 1995; Gea y Tello, 1997; Carlile y Watkinson, 1998; Lizarraga y López, 1998; Krizkova, *et al*, 2001; Chang, y Miles, 2004; Soto y Arias, 2004; Salmones y Mata, 2005; Serafin, 2005; Paredes *et al*, 2006; Paredes y Valverde 2006; Molina y Kahmann, 2007; Ramos, 2007; Mendoza, 2008). Esto coincide con Sánchez (2009), quien reporta que para estimular la germinación así como el crecimiento de las orquídeas se requiere de un aporte adicional de sustancias al medio para su cultivo *in vitro*, como son la vitamina B₁ o tiamina, en concentraciones de 0.1 a 10 mg L⁻¹; los aminoácidos: glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina y tirosina entre otros; y con Ernst y colaboradores (1971) quienes reportan que las semillas de *Phalaenopsis* germinaron en el medio nutritivo “Knudson C” adicionado con diferentes tipos de azúcares como los monosacáridos D-Glucosa, D-Fructosa, D-Galactosa; disacáridos como sacarosa, maltosa, celobiosa, trealosa, melibiosa y lactosa y trisacáridos como farinosa, melezitosa y almidón y el desarrollo de plantas completas en presencia de sacarosa, maltosa celobiosa, trealosa, rafinoza y melezitosa en concentraciones de 2.0%.

CONCLUSIONES

Se determinó que la germinación asimbiótica *in vitro* de *Guarlanthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, es un proceso de larga duración, que pasa por nueve estadios de desarrollo ontogénico desde semilla hasta la obtención de la planta completa.

El obtener la germinación asimbiótica *in vitro* de *Guarlanthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, se confirma el potencial de propagación por semilla y la producción de individuos heterocigotos.

El estudio de la germinación asimbiótica *in vitro* de *Guarlanthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, permitió conocer los estadios de su desarrollo ontogénico y la morfología de cada uno de ellos.

Se estableció que el medio nutritivo “Knudson C” combinado con extractos de origen fúngico, es adecuado para la germinación asimbiótica de semillas *in vitro* de *Guarlanthe aurantiaca* y el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, ya que promovió el crecimiento de los protocormos y desarrollo de las plántulas.

La adición del extracto de origen fúngico al medio de cultivo, mejoró significativamente la germinación y desarrollo de plántulas en ambas especies de estudio.

Las semillas de *Guarlanthe aurantiaca* en 5mL, 10mL y 15mL el tratamiento con extracto de *Agaricus bisporus* sin la adición de sales, llegaron al máximo desarrollo, por lo tanto, este hongo es un inductor natural del crecimiento y la obtención de plantas completas, por lo que puede sustituir a los medios de cultivo minerales de fórmula.

El 100% de los individuos de *Euchile mariae* x *Euchile citrina* en el medio con extracto de *Ustilago maydis* en la concentración 5mL adicionado con sales minerales “Knudson C”, alcanzan el máximo desarrollo en el día 146, siendo este medio de cultivo experimental el que promovió más rápido y mejor la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas *in vitro*.

En *Guarlanthe aurantiaca* el mejor tratamiento fue el de 10mL medio con extracto de *Ustilago maydis* adicionado con sales minerales de “Knudson C”, mientras el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*, los mejores tratamientos fueron *Pleurotus ostreatus* con la adición de “Knudson C” en concentraciones 5mL y 15mL.

Los medios de cultivo de composición fúngica con *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones, adicionados con las sales minerales “Knudson C”, promueven más rápido el crecimiento y desarrollo de los protocormos y plantas completas, tanto en *Guarlanthe aurantiaca* como en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Los resultados obtenidos sirven de base para orientar futuras investigaciones acerca posibles composiciones de medios de cultivo con extractos fúngicos para la germinación *in vitro* de otras especies. Por lo anterior la hipótesis planteada en este estudio fue comprobada.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Abraham, A. y Vatsala, P. (1981). Introduction to Orchids. Tropical Botanic and Research Institute. Trivandrum 695011. India. p 11-180.

Agrios, G. (1985). Fitopatología. Limusa. p 513-515.

Alberico, L. F. (2004). Germinación in vitro de semillas de *Laelia speciosa*, orquídea en peligro de extinción. Tesis de Biólogo. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Alexopoulos, C. J. y Mims, C.W. (1985). Introducción a la micología. Barcelona. p 5, 422,454-470 y 531-536.

Alvarez, M. Nueva, L y Figueroa, A. (1990). Propagación de plantas Ornamentales. Pueblo y Educación. La Habana. 29: p 81-98.

Ammirato, P. V., W. R. Sharp., Evans R. D., and P. S. Bajaj. (1990). Hand Book of Plant Cell Culture. Mc Graw Hill Publishing Company. U.S.A. Vol. 5: p 25-43, 598-637, 638-651.

Anderson, L. (1967). Literature review of orchid seed germination. American Orchid Society Bulletin. p 304-308.

Aragón, S. and Ackerman J. D. (2004). Does flower color variation matter in deception pollinated *Psychilis monensis* (Orchidaceae). *Oecología* 138 (3): p 405-413.

Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchids seeds. Botanic. Review. 33: p 1-97.

Arditti, J. (1972). El profesor Lewis Knudson y la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas: Cincuentenario. Orquídea. p 229-236.

Arditti, J. (1977). Orchid Biology. Reviews and perspectives I. Cornell University Press. London. p 203-293.

Arditti, J. (1992). Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley, Nueva York. p 487-488, 504-549, 898.

Arditti, J., M.A. Clementes, G. Fast, G. Hadley, G. Nishimura, and R. Ernst. (1982). Orchid Biology, Review and perspectives II. Cornell University Press. USA. p 390.

Arditti, J. and R. Ernst. (1984). Physiology of germination orchid seeds in Orchid Biology. Reviews and Perspectives, III J., Arditti (Ed). Comstock Publishing Associates USA. p 177- 222.

Arditti, J. and R. Ernst. (1993). Micropropagation of Orchids. John Wiley and Sons, New York. USA. p 640.

Arditti, J., Ernst, R., Yam, T. W. and Glabe, C. (1990). The contributions of orchid micorrhizal fungi to seed germination: a speculate review. *Lindleyana*: p 249-255.

Zaragoza Domínguez Norma

- Arditti, J. and Ghani, A. (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 145: 367-461.
- Baker, K., Mathes, M. and Wallace, B. (1987). Germination of *Ponthieva* and *Cattleya* seeds and development of *Phalaenopsis* protocorms. *Lindleyana* 2 (2): p 77-124.
- Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen then induces tumors in maize. *Ann Reviews Genetic.* 29: p 179-208.
- Barba, A. A., Luna, R. S. y Romero, A. J. (2002). Orquídeología Básica. Biotemas U.I.B.V FES-Zaragoza, UNAM, México: 18.
- Becker, J. (2005). Curator orchid Identificatin Center, Marie Selby Botanical Gardens, 811 South Palme, Florida U.S.A.
- Beelman, R. B., Royse, D.J and Chikthimman, N. (2003). Bioactive Components in *Agaricus bisporus* of Nutritional, Medicinal or Biological Importance. *Int. J. Med. Mush.* 5(4) p 321-337.
- Beelman, R.B. (2005). Componentes biológicos en los champiñones (*Agaricus bisporus*) de importancia nutricional, medicinal o biológica. Propiedades saludables del consumo del champiñón. Gobierno de la Rioja, Actas de la I Jornada celebrada en Logroño el 16 de marzo de 2005 (SALICAL). p 23-31.
- Bellone, Roger., (2006). Orquídeas. Guía del aficionado. Ediciones Omega. 17-100, 197-200, 305-333.
- Benzing, D. H., Friedman, W.E., Peterson, G and Renfrow, A. (1983). Shootlessness, Velamentous Roots, and the Pre-Eminence of Orchidaceae in the Epiphytic Biotope. *American Journal of Botany.* 70(1): p 121-133.
- Benzing, D. H. (1989). The mineral nutrition of epiphytes. In: *Vascular plants as epiphytes: Evolution and ecophysiology.* Luttge. U (Ed). Springer Verlag. Berlin: p. 351-375.
- Bölker, M. (2001) *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology.* 147: p 1395-1401.
- Bonifaz, A. (1990). *Micología médica básica.* Ed. Méndez. p 9-33.
- Brundrett, M.C. (1991). Mycorrhiza in natural ecosystems. In: Macfayden, A, Begon, M and Fitter, AH. Ed. *Advances in Ecological Research*, Vol. 21. Academic Press, London. p 171-313.
- Brundrett, M., Sivassithamparam, K., Ramsay, M., Krauss, S., Taylor, R., Hicks, A., Abdul Karim, N., Debeljak, N., Mursidawati, S., Dixon, B., Batty, A. Bower, C. and Brown, A. (2001). *Orchid Conservation Techniques Manual.* First International Orchid Conservation Congress-Training Course. Perth. Australia.
- Caneva, S. (1978). Orquídeas. Principales Géneros y Especies de Cultivo. Buenos Aires. p 5-41, 220-226, 230.
- Carlile, M. J. and Watkinson, S. C. (1998). *The fungus.* New York. p 5-8, 52-68, 450-460.

Chang, S.T. y Miles. P.G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact*. CRC Press, Boca Raton. p 451.

Chung, M. Y. and Chung, M. G. (2005). Pollination biology and breeding systems in the terrestrial orchid. *Bletilla striata*. Plant System. Evolution.

Coenders, A. (1996). Química culinaria. Ed. Acribia, España. p 35- 47.

Currah, R. S., Zelmer, C.D. Hambleton, S and Richarson, K.A. (1997). Fungi from orchid mycorrhizal. J. Ardite and A.M. Pridgeon (Ed.) *Orchid Biology. Reviews and Perspectives*. Vol. 11. p 117-170.

Damon, A., Agular. G. E. Rivra, L y Nikolaeva, V. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 10 (2) p 813- 820.

De Diego, C.F. (1990). Setas (hongos). *Guía Ilustrada, Segunda Edición*, Madrid España. p79-90, 172-180.

Devek, B. J and Holmer, P. (2006). *The Encyclopedia of sedes Scince, Tecnology and Uses*. Cab Internacional, Inglaterra. p 470-420.

Dressler, L. R. (1981). *The Orchids*. Harvard University Press. London England. p 1-73.

Dressler, R.L. and Higgins, W.E. (2003). Guarianthe, a generic name for the “Cattleya” skinneri complex. *Lankesteriana* 7: 37-38.

Ernst, R., Arditti, J., Healey, P.L. (1971). Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *American Journal of Botany*. 58(9): p 827-935.

Espejo, S. A, García C. J, López F. A. R., Jiménez. M. R. y Sánchez. S. L. (1999). Orquídeas silvestres del estado de Morelos. Herbario Metropolitano, Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa y Herbario AMO. México, D. F. p. 46.

Espejo, A., García, J., López, A., y Sánchez, L. (2000). Orquídeas del estado de Morelos. Orquídea (Mex) XVI. Herbario AMO y Universidad Autónoma Metropolitana. México. p 99.

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

Fay, M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28 p 1-4.

Fay, M. F. (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation. *Biodiversity and Conservation* 3, p 176-183.

Fanfani, A. and Rossi, W. (1989). *Guide to orchids*. Simon and Schuster,s. New York. p 256.

Feeney, M.J. (2008). Nutrition research-the future begins now. Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII: Proceedings of the 17 th Congress of the International Society for Mushroom Science, keynote lectures. p 52-69.

Fehér, A. Pasternak. T. P. and Dudits. D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74. p 201-228.

Flores, E. G., Legaria, S. J. P., Vásquez, G. I y Colinas. L. M. T. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo Serie Horticultura 14 (3) p 347-353.

García, G. M. (1993). Biotecnología alimentaria. Ed. Limusa. México. p 22- 25.

Galindo. M. J.M. (1991). Cultivo moderno del champiñon. Mundi-Prensa. Madrid España. p7-30, 78-89.

Gea, A. F. J. y Tello, M.J. (1997). Miosis del cultivo del Champiñon. Coedium Misterio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Ediciones Mundi prensa Madrid España. p 3-25.

George. F. and Sherrigton. P.D. (1984). Plant propagación by tissue culture. Vol. 1. Exegetics Limited. U.S.A. p 39-71.

Gil, I. V., Bastida, A. T., Flores, G.E., y Navarro, E. L. (2007). Reproducción y manejo de orquídeas mexicanas. Universidad Autónoma Chapingo. México. p 31-42.

Glen, L. (2002). Botanica's Pocket orchids. San Diego California. Advantage Publishers Group. p 124-275.

Hadley, G. (1982). Orchid seed germination and seedling culture a manual: European terrestrial orchids. Vol. 2 Cornell University Press, Ithaca, N.Y. p 326-329.

Hahn, E.J. and Paek, K. Y. (2001) High photosynthetic flux and high CO₂ concentration under increased number of air exchanges promote growth and photosynthesis of four kinds of orchid plantlets *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. September – October. Society for *in vitro* Biology 37: p 678- 682.

Hágsater, G. E. (1999). Estudio taxonómico –florístico de la familia Orchidaceae en el Bajío: tribus Epidendreae y Maxillariae. Instituto Chinoín AC, Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología AC. México. p 63-68.

Hágsater, E. , Soto, A.M.A., Salazar, C. G y Jiménez, M.R. (2005). Las Orquídeas de México, Productos farmacéuticos Chinoín, México. p 13-37, 41,55-69,218-225, 263-269.

Hágsater, E. y Soto, A.M.A. (2003). Orchids of Mexico prts 2 and 3. Icones Orchid. AMO; p 41-43.

Hágsater, E. y Salazar, G. A. (1990). Ícones Orchidacearum. Orchids of México. Fascicle I. AMO; p 7.

Harley, J. I. and Smith, S.E. (1983). Mycorrizal Symbiosis. Academia, Press, New Cork. p 406.

Zaragoza Domínguez Norma

Harrison, C. R. (1977). Ultrastructure and histological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 139 p 180-189.

Harrison, C. R. and J. Arditti. (1978). Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanic*. 139(2). p 180-189.

Hernández., C. L.,Castillo., A. S., Guadarrama, C. P., Martínez, O.Y., Romero. R.M.A y Sánchez, G.I. (2003). Hongos micorrizógenos arbusculares del pedregal de San Ángel. Las Prensas de ciencias Facultad de Ciencias UNAM. México. p 1-77.

Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos, Micología básica y aplicada. Ed Fondo de cultura Económica. México, D.F. p 21-50 y 283-339.

Hew, C.S and Yong, J. W. (1999). The physiology of tropical Orchids in Relation to the Industry. World Scientific. Publishing. Singapore, Singapore. p 341.

Hicks, J. A. (2000). Asymbiotic technique of orchid seed germination. The Orchids Seed Bank Project. USA. p 1-5 y 15-30.

Hicks, J. A. (2005). Propagation of orchids from seed. *The Orchid Review*. USA. p 200-203.

Jayakumar, T., E. Ramesh and Geraldine, P. (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄- induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44 p 1989-1996.

Jayakumar, T., Thomas, P. A. and Geraldine, P. (2007). Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology*, 42 p 183-191.

JiuZhou, Z. (2005). Studies on optimized fertilization for *Cymbidium hybridum*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*. 27 (4): p 553-556.

Johnson, S. D. and Brown, M. (2004). Transfer of pollinaria on bird's feet: a new pollination system in orchids. *Plant System. Evolution*. 244: p 181-188.

Kano, K. (1965). Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Agr. Kagawa University*. 20 p 30-74.

Kendrick, B. (1992). *The Fifth Kingdom*. Myciloque Publications, Waterloo. p7.

Kitsaki, C. K., Zygouraki, K., Ziobora, M and Kintzios, S. (2004). In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae) *Plant Cell Rep* 23: p 284-290.

Knudson, C. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73: p 1-25.

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

Zaragoza Domínguez Norma

- Kotomori, S y Murashige, T. (1965). Some aspects of aseptic propagation of orchid. American Orchid oct. Bull 34: p 484-489.
- Krizkova, L. Durackova, Z., Sandula, J., Sasinkova, V, and Krajcovic, J. (2001). Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell Wall mannans in vitro. Mutat Res 497 (1-2): p 213-222.
- Kronstad, J.W. (2003). Castles and huitlacoche: the first international *Ustilago* conference. Fungal Genetics and Biology. 38: p 265-271.
- Lakon, G. (1949). The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of the seed. Plant Physiol. 24: p 3389-394.
- Lapiner, J. (1973). Orquídeas Michoacanas. Comisión Forestal del Estado de Michoacán (CFEM). Serie técnica. época 2ª. Numero 4.
- Lawrence, W.Z. (1997). Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and perspectives. Selbyana 18(2): p 188-194.
- Lecoufle. M. (2006). Orquídeas. Barcelona España. Ediciones Omega. p 7-75.
- Lee, Y. I., Yeung, E., Lee, N and Chung, M.C. (2006). Embryo Development in the Lady's Slipper Orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with Emphasis on the Ultrastructure of the suspensor. Annals of Botany 98: 1311-1319.
- Leroux, G., Barabé, D. y Vieth, J. (1995). Morphogenese comparee de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultives *in vitro* avec ou sans sucre. Canada Jardin Botanique 73 Imprime au Canada. p 1391-1406.
- Lesica, P and K. R. Antibus. (1990). The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes Costa Rica rain forests. Biotropical. 22: (3) p 250-258.
- Lizarraga, G. R y López, G.M. (1998). Mososaccharide and aldiol contents of huitlacoche (*Ustilago maydis*). Journal of Food Composition and Analysis. 11(1) p 334-339.
- López, C. E (1990). Cultivo del Champiñón, la Trufa y otros Hongos. Biblioteca Agrícola AEDO. Barcelona, España. p.13-22.
- Lückel, Baumbach and Röth. (2006). Orchideenkartei. Beilage zu Die Orchider. 57(4) p 1047-1048.
- Martínez, C.D. (2000). Mushroom biotechnology in tropical America. International Journal of Mushroom Sciences 3: p 9-20.
- Markovina, A.L. and Mc Gee, P. A. (2000). Comparison of symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandae; Orchidaceae). Lindleyana 15(2): 68-72.
- Mayo, M. A, Cázares, C. J. G., De la Cruz, L.E. y Flores, H. A. (2008). Informe final. Proyecto: Conservación y propagación de orquídeas de Tabasco. Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT.

Zaragoza Domínguez Norma

McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Ecuador: p 20.

Mendoza, M. A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranés, M., Kämper, J. y Kahmann, R. (2008). Physical- chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. Molecular microbiology. 71 (4) p 895-911.

Merino, M. M. E. (1987). Medio de cultivo. En: Hurtado, M. D.V. y Merino M.M.E. (ED) Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. p 232.

Molina, L. and Kahmann, R (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ Detoxification Is Required for Virulence. The Plant Cell. 19 p 2293-2309.

Moreno, M. E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología UNAM, México. p 383.

Müller, E and Loeffler, W. (1976). Micología, Manual para naturistas y médicos. Ed. Omega. Barcelona. p 125-280, 296-298.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture." Physiologia Plantarum 15: 473 - 497.

Murashige, T. (1973). Nutrition of plant cell and organs *in vitro*. In vitro: p 9.

Niemann, D. (2001). Orchid Propagation. The Magazine of the American Orchid Society. 70 (5), p 460-470.

Olivera, F. M. (2007). Maestra de la Facultad de Química. UNAM. Asesora personal.

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

Paul, E. A. and Clark, F.E. (1989). Soil microbiology and Biochemistry. Academic Press. California, USA. (8) p 618-625.

Paredes, L. O y Valverde, M.E. (2006). Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. Revista Cinvestav. 3: p65-73.

Paredes, L.O., Guevara, L.F. y Bello, P. L.A. (2006). VIII El huitlacoche: exquisitez culinaria mexicana con altas propiedades nutraceuticas. En O. Paredes-López, F. Guevara- Lara, y L.A. Bello- Pérez (Eds.). Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericana. Primera Edición. México. Fondo de Cultura Economica. p 75.

Penningsfeld, F. (1985). Soils propagation and cultivation of orchids. Possibilities advantages and distantness. Soil Culture. 1: (1) p 55- 66.

Peterson, R.L and Currah, R.S. (1990). Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* y *Ceratobasidium cereale*. Canada. Jarden. Botanical. 68: p 1117-1125.

Zaragoza Domínguez Norma

Peterson, R. L., Uetake, Y. and Zelmer, C. (1998). Fungal symbiosis with orchid protocorms. *Symbiosis*. 25 (1-3): p 29-55.

Pierik, R.Sprekels, B. Vander, H y Vander, M. (1988). Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolares* Pfitz *in vitro*. *Scientia Horti* 34; p 139-153.

Plenchett, Ch. (1982). Les endomycorhizes a vésicules et erbusculares (VA): Un potential a exploiter en agricultura. *Phytoprotection* 63: p 86-102.

Pritchard, H.W., Poynter, A.C. and Seaton, P.T. (1999). Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-drying and cryopreservation. *Lindleyana*. 14: p 92-101.

Ramírez, F. C. (1990). Establecimiento de Cultivo *In vitro* de Orquídeas Mexicanas en Peligro de Extinción. Tesis Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D. F. p 64.

Ramos, O. G.I. (2007). *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos de palma aceitera como importante fuente proteica para la dieta humana. Tesis Ingeniero en biotecnología ambiental. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Rasmussen, H. N. (1995). Terrestrial orchids from seed to microtrophic plant. Cambridge. University Press. p 17-24, 113-135.

Rasmussen, H. N. (1998). The underground phase: a special challenge I studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 126: p 49-64.

Rayman, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*. 356 p 233-241.

Rayman, M.P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*. Vol 61. Issue 2, p 203-215.

Read, D.J., H.K.Kouchecki and J. Hodgson. (1991). Micorrizal in ecosystems nature's responder to the law of the minimum, in; *Frontiers in mycology*, D.L. Hawksworth Ed. International, Walqllingfort, U.K. p 101-130.

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

Rodríguez, L. González, R. Alvarado, K. Téllez, E. Díaz, A y Sánchez, E. (2001). Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. *Biotecnología Vegetal* 1(2) p 115-116.

Rubluo, A., Chavez, V. and Martinez, A. (1989). *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana* 4 (2): p 68-73.

Rudolph, D., Rauer, G., Nieder, J. and Barthlott, W. (1998). Distributional paters of epiphytes in the canopy and phorophyte characteristics in a western Andean rain forest in Ecuador . *Selbyana* 19(1): p 27-33.

Zaragoza Domínguez Norma

Salmones, D. y Mata, G. (2005). Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus ssp.* Rev. Mex. Mic. 21: p 63-69.

Sánchez, C., Montilla, E., Rivera, R. y Cupull, R. (2005). Comportamiento de 15 Cepas de Hongos Micorrizogenos (Hma) Sobre el Desarrollo de Posturas de Cafeto en un Suelo Pardo Gleyzoso. Reviews For. Lat. 38: p 83-95.

Sánchez, V. J.E., Martínez. C. D., Mata. G y Leal. L. H. (2007). El cultivo de Setas, *Pleurotus ssp* en México. Ecosur Colegio de la Frontera. p7-26.

Sánchez, R. M.M. (2009). Evaluación de médios de cultivo para la reproducción in vitro de *Laelia anceps*. Tesis Maestria. Colegio de Posgraduados, Montecillo.

Santos, H. L., Martínez, G. M., Campos, J. E. y Aguirre, L. (2005). In vitro Propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in México. HortScience 40 (2) p 439-442.

Serafin, M.A.H., Kubachka, K., Wrobel, K., Gutierrez, C.F., Yathavakilla, S.K.V., Caruso, J.A. y Wrobel, K. (2005). Metallomics Approach to Trace Element Analysis in *Ustilago maydis* Using Cellular Fractionation, Atomic Absorption Spectrometry, and Size Exclusion Chromatography with ICP-MS Detection. J. Agric. Food Chem. 53(13) p 5138-5143.

Sheehan, T.J. (1996). In: Introduction to floriculture. AGT. USA. pp 119-146.

Shelley, E. and Geoffrey, K. (2005). Guías de Bolsillo de Hongos. Ediciones Omega Barcelona España. p 200-220,236-240.

Shushan, S. (1959). Developmental anatomy of an orchid, *Cattleya x Timos*. En : Withner, L. The Orchids. Ronald Press Co. New York, USA: 45-72.

Smith, (1973). Uptake of glucose, trehalose and manitol by leaf slices of the orchid *Bletilla hyacinthine*. New Phytol. p72, 957-964.

Soto, A. M.A, Salazar, G. A. and Hágsater, E. (1995). The orchidaceae of Mexico: A taxonomic synopsis. p 7, 15.

Soto, M. A. (1996). Orchids. Alec M. Pridgeon (Ed.). Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y sus Recursos. Gland Switzerland. p153.

Soto, V. C y Arias, A. (2004). Cultivo de las setas (*Pleurotus spp*) una tecnología de producción de alimentos. Ediciones Cuéllar, p 89.

Spaulding, T. and Beelman, R. (2003). Survey Evaluation of Selenium and Other Minerals in *Agaricus* Mushrooms Commercially Grown In The United States. Mushroom News 51(5) p 6-9.

Stancato, G., Ferreira, A. M e Cangiani, F. A. (2008). Crescimento de orquídeas *in vitro*: Adição de polpa de frutos. Centro de Solos e Recursos Agroambientais, Instituto Agrônomo, Campinas (SP). Bragantia, Campinas. 67 (1) p 51-57.

Zaragoza Domínguez Norma

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

Tomita, M. and S. Konns. (1998). Preliminary report on the symbiotic germination of nine Japanese terrestrial orchids. *Society. Hortic. Scientific*. 67 (5): 696-698.

Vacin, E. F. and Went, F.W. (1949). Use of tomato juice I the asymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz*. 111: p 174-183.

Valverde, M. E. y Paredes, L.O. (1993). "Production and evaluation of some food properties of huitlacoche (*Ustilago maydis*)" *Food Biotechnology* 3: p 207-219.

Valverde, M.E., Paredes, L.O., Pataky, J.K. y Guevara. L.F. (1995). "Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a Food Source- Biology, Composition, and Production". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: p 191-229.

Velázquez, V. R. (1997). Efecto de Sacarosa, Glucosa y Fructuosa Sobre la Germinación de las Semillas, el Desarrollo y Crecimiento de Plántulas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR. Cultivadas. Tesis de Biólogo. FES- Zaragoza.UNAM. 63.

Vidalie, H. (1976). Cultivo *in vitro*. Científica S.A de C.V. México. p 217.

Yang, J.H., Lin. H. C. and Mau, J.L.(2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. 77 p 229-235.

Yanagawa, T., Nagai, M., Ogino, T and Maeguchi, R. (1995). Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. *Lindleyana*. 10 (1); p 33-36.

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

Yu, H. and Goh, J. C. (2001). Molecular genetics of reproductive biology in orchids. *Plant Physiology* 127 (4), p 1390-1393.

Williams, N. (1982). The biology of orchids and *Euglossine* bees. In: *Orchid Biology. Reviews and perspectives*, II. J. Arditti (Ed.). Cornell University. Press. USA. p 119-171.

Withner, C. and Krieger, R. (1985). *The Orchids*. Scientific Studies. Publishing Company. Florida. USA. p 224-245.

Withner, C. (1998). *Sobralia citrina*. *AOS Bulletin* Vol. 71(6).

Wright, N. P. (1958). *Orquídeas de México*. Fournier, S.A. México. p 14.

Zettler, W. L. Burkhead, C. J., and Marshall, A.J. (1999). Us of mycorrizal fungus from *Epidendrum Conopseum* To Germinate Seed of *Encyclia tampensis in vivo*. *Lindleyana* 14 (2); p 102-105.

Zaragoza Domínguez Norma

Zettler, L. W., Sharma J. and Rasmussen F. N. (2003). Micorrizal diversity. Dixo K. W., Keel S. P., Barret R. L. y Cribb P. J. (Ed.) Orchid Conservation, Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu: p 205-226.

NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-059-ECOL-2001, PROTECCIÓN AMBIENTAL- ESPECIES NATIVAS DE MÉXICO DE FLORA Y FAUNA SILVESTRES – CATEGORIAS DE RIESGO Y ESPECIFICACIONES PARA SU INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN O CAMBIO – LISTA DE ESPECIES EN RIESGO.

DIRECCIONES ELECTRONICAS

- 1.- <http://www.amo.com.mx>. (revisado en mayo de 2008).
- 2.- <http://www.Troygardens.org/farm.html>. (Revisado en junio de 2008).
- 3.- <http://www.scribd.com.Reserch.science>. (Revisado noviembre 2011).

APÉNDICES

APÉNDICE I

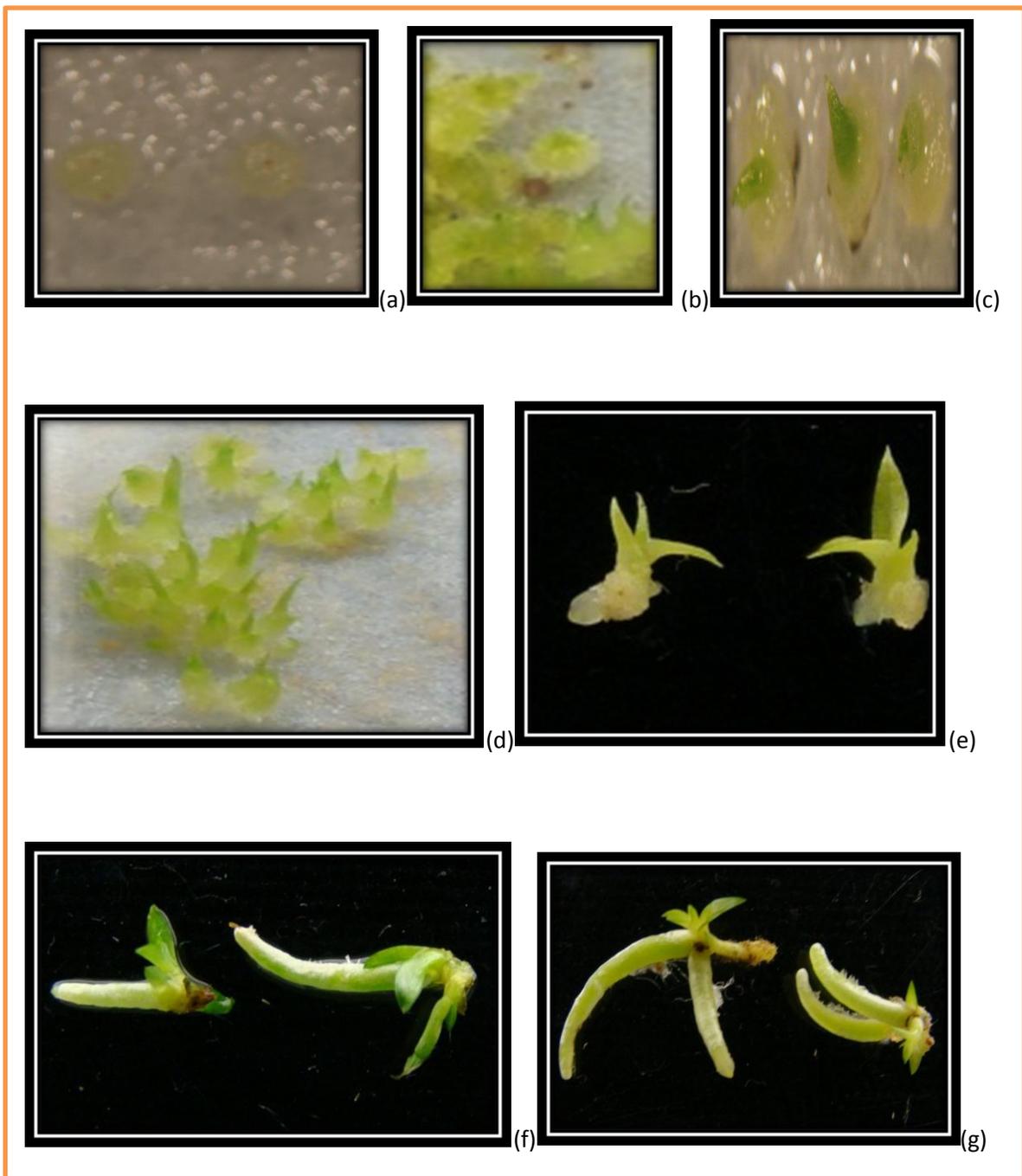
COMPOSICIÓN DEL MEDIO NUTRITIVO “KNUDSON C”

Sales inorgánicas		(mg/l)
Macronutrientes		
Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500.0
Nitrato de Calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	694.4
Fosfato de Potasio	KH_2PO_4	250.0
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	122.12
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.68
Sulfato Ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25.0
Micronutrientes		
Ácido Bórico	H_3BO_3	0.056
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.062
Molibdato d Sodio	NaMoO_3	0.016
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.33
Otros		
Sacarosa		20,000.0
Agar		9,000.0
pH	5.6	
Agua destilada		

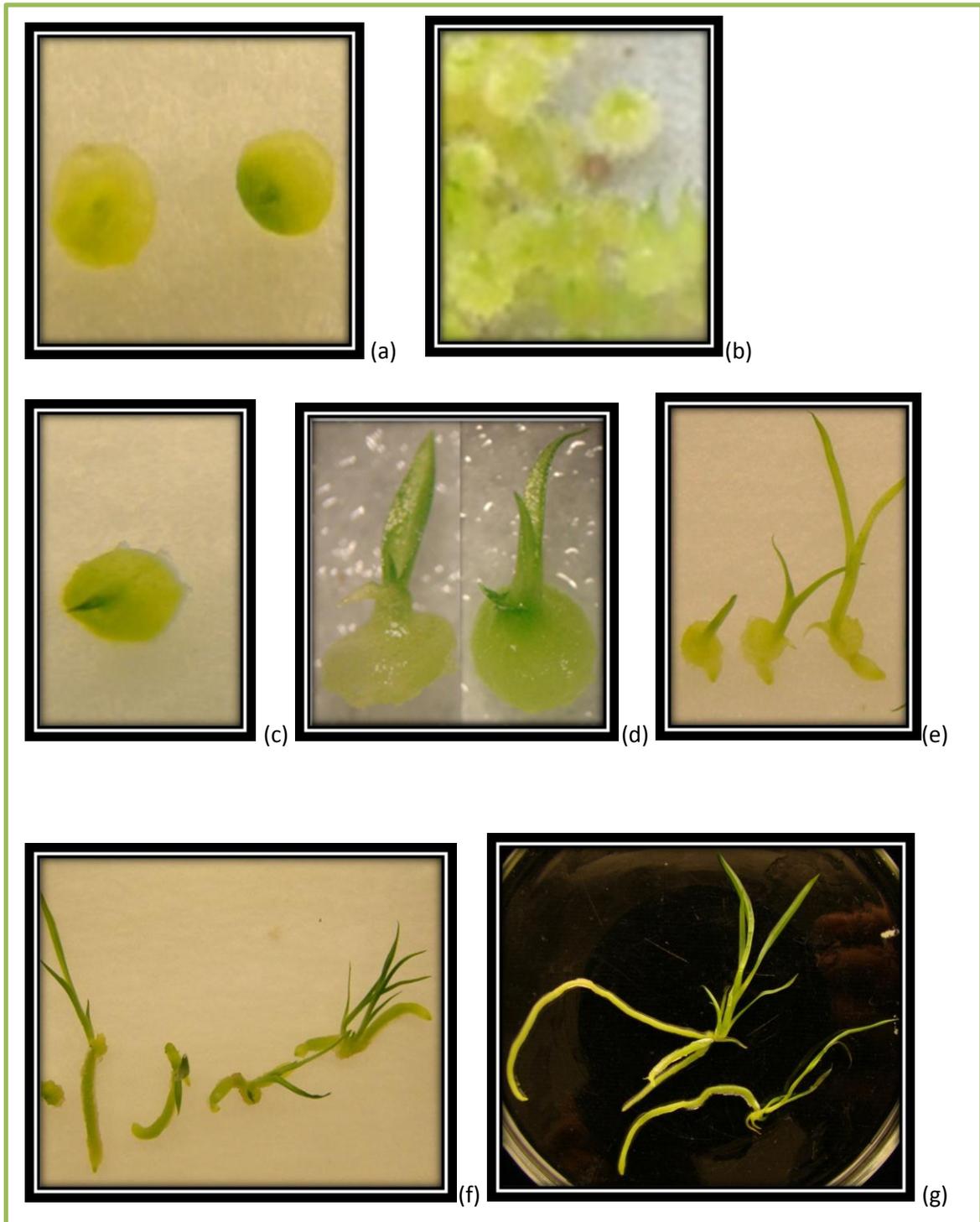
APÉNDICE II.- TRATAMIENTOS Y SU NOMENCLATURA.

Tratamiento	[]	KC	Abreviatura	Simbología
“Knudson C”	-	+	KC	A
<i>Agaricus bisporus</i> (Champiñon)	5	-	<i>Ab</i> [5]	B
	10	-	<i>Ab</i> [10]	C
	15	-	<i>Ab</i> [15]	D
	5	+	<i>Ab</i> [5]+ KC	K
	10	+	<i>Ab</i> [10] + KC	L
	15	+	<i>Ab</i> [15] + KC	M
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Seta)	5	-	<i>Po</i> [5]	E
	10	-	<i>Po</i> [10]	F
	15	-	<i>Po</i> [15]	G
	5	+	<i>Po</i> [5]+ KC	N
	10	+	<i>Po</i> [10] + KC	Ñ
	15	+	<i>Po</i> [15] + KC	O
<i>Ustilago maydis</i> (Huitlacoche)	5	-	<i>Um</i> [5]	H
	10	-	<i>Um</i> [10]	I
	15	-	<i>Um</i> [15]	J
	5	+	<i>Um</i> [5]+ KC	P
	10	+	<i>Um</i> [10] + KC	Q
	15	+	<i>Um</i> [15] + KC	R

APÉNDICE III- DESARROLLO ONTOGÉNICO DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO.



i-. Desarrollo ontogénico de *Guarianthe aurantiaca*: (a) Protocormo, (b) Protocormo con rizoides, (c) Plántula con primordio de hoja, (d) Plántula con hoja, (e) Plántula con primordio de raíz (f) Planta con raíz y (g) Planta con raíz y rizoides.



ii.- Desarrollo ontogénico de *Euchile mariae* x *Euchile citrina*: (a) Protocormo, (b) Protocormo con rizoides, (c) Plántula con primordio de hoja, (d) Plántula con hoja, (e) Plántula con primordio de raíz, (f) Planta con raíz y (g) Planta con raíz y rizoides.

APÉNDICE IV. REGISTRO FOTOGRÁFICO

i.- *Guarianthe aurantiaca* EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.



Fig. 35. Comparación de los tratamiento B, C Y D a los 128 días de cultivo.



Fig. 36. Comparación de los tratamientos P, Q y R a los 128 días.



Fig.37. Comparación de los tratamientos N, Ñ, O y A (testigo), a los 135 días.

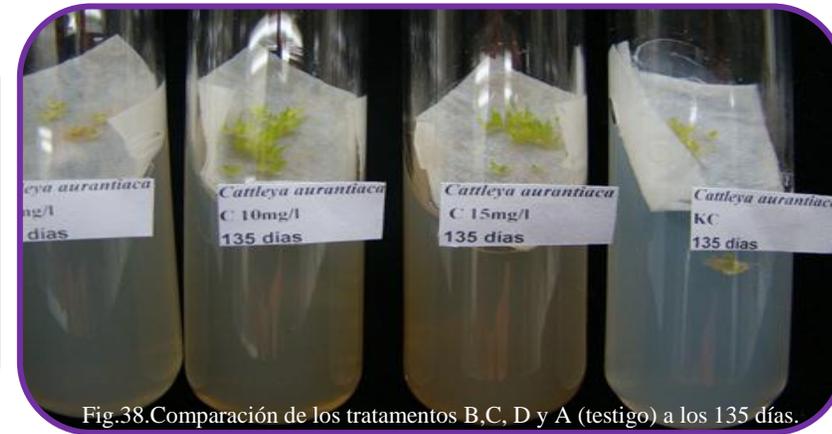


Fig.38. Comparación de los tratamientos B, C, D y A (testigo) a los 135 días.



Fig.39. Comparación de los tratamientos N, Ñ, O y A(testigo) a los 135 días.

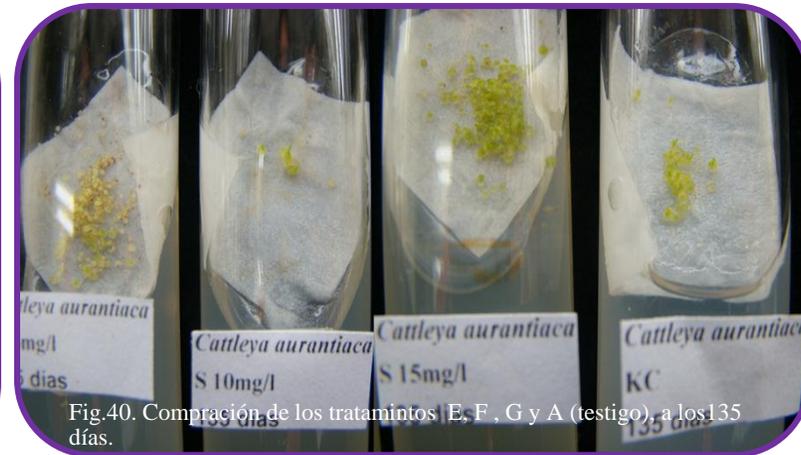


Fig.40. Comparación de los tratamientos E, F, G y A (testigo), a los 135 días.



Fig.41. Comparación de los tratamientos P, Q, R y A (testigo) a los 135 días.



Fig.42. Comparación de los tratamientos H, I, J y A (testigo) a los 135 días.



Fig.43. Comparación de los tratamientos A (testigo) K, L y M a los 271 días.



Fig.44. Comparación de los tratamientos A (testigo), B, C y D a los 271 días..

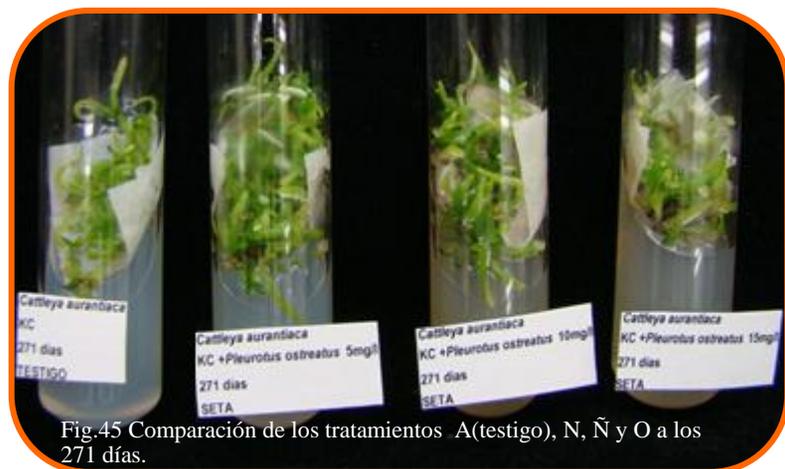
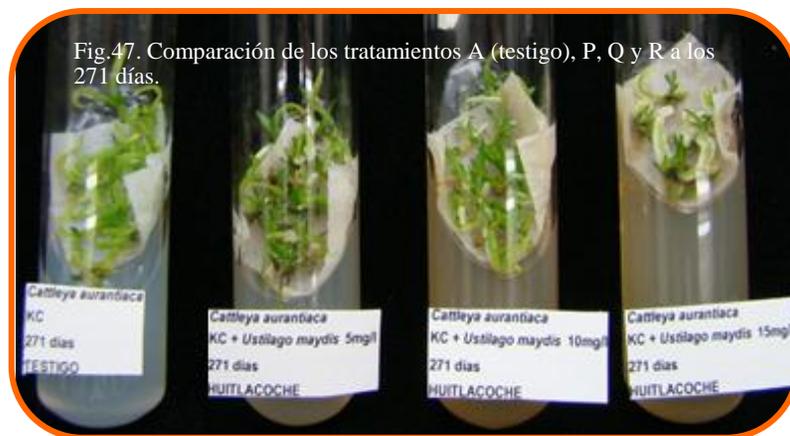


Fig.45 Comparación de los tratamientos A(testigo), N, Ñ y O a los 271 días.



Fig. 46 Comparación de los tratamientos A (testigo), E, F y G a los 271 días.



ii.- *Euchile mariae* x *Euchile citrina* EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.





Fig.51. Comparación de los tratamientos E, F, G y A(testigo) a los 138 días.



Fig.52. Comparación de los tratamientos N, Ñ, O y A(testigo) a los 138 días.



Fig.53. Comparación de los tratamientos E, F, G y A(testigo) a los 138 días.

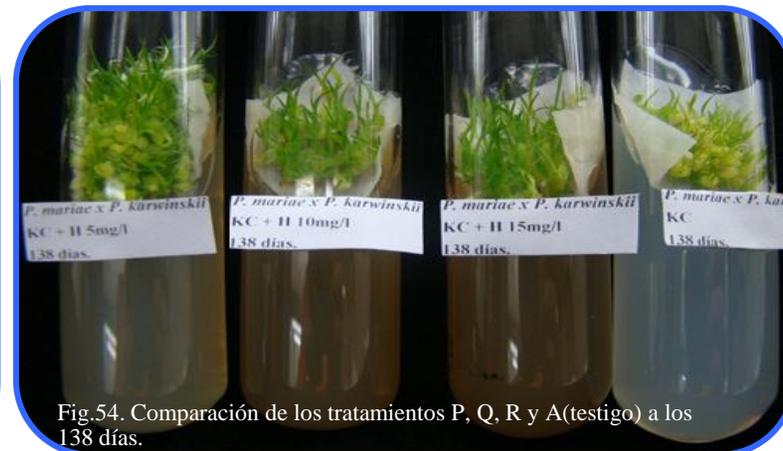


Fig.54. Comparación de los tratamientos P, Q, R y A(testigo) a los 138 días.



Fig.55. Comparación de los tratamientos H, I, J y A (testigo) a los 138 días.



Fig.56. Comparación de los tratamientos A (testigo) K, L y M a los 274 días.

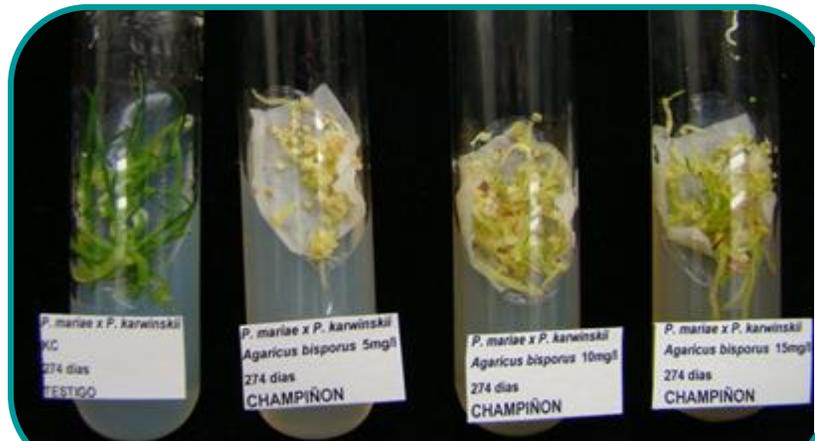


Fig.57. Comparación de los tratamientos A (testigo) B, C, y D a los 274 días.

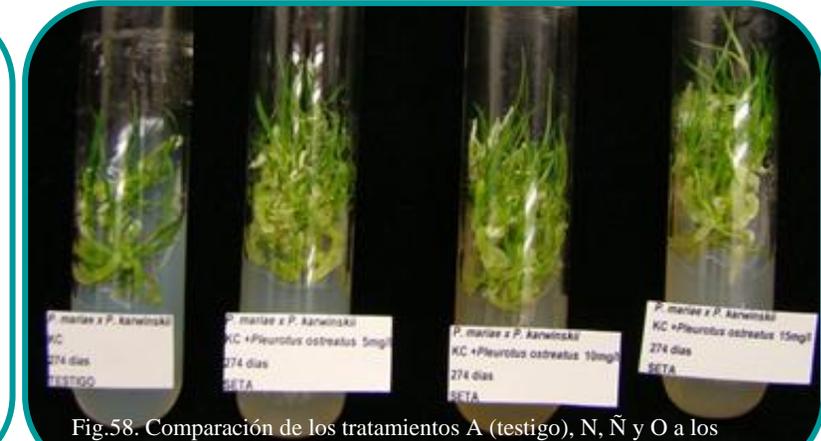
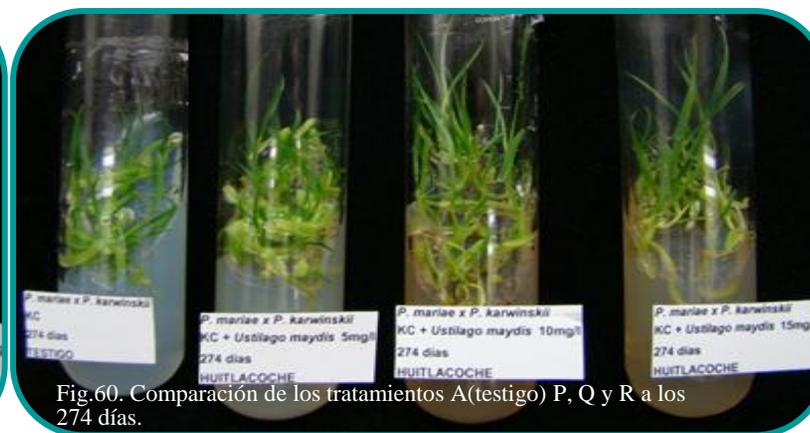
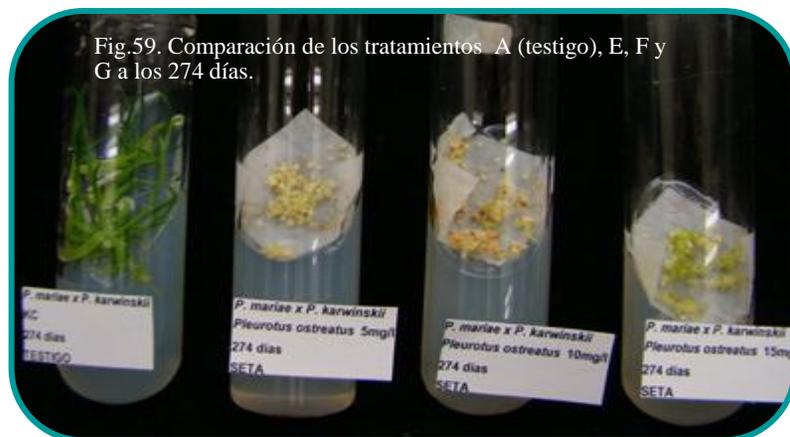


Fig.58. Comparación de los tratamientos A (testigo), N, Ñ y O a los 274 días.



ANEXOS

Anexo I. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LOS HONGOS DE ESTUDIO

ESPECIE		<i>Agaricus bisporus</i> (Champiñón)	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Seta)	<i>Ustilago maydis</i> (Huitlacoche)
COMPOSICIÓN				
(mg/100 gr)	Gr	0.3	1.0	1.2
	Kcal	22	30	*
	Prot	4.0	3.0	3.2
	HC	6.0	4.0	1.0
	H₂O	85%	88%	80%
	Fib	1.0	1.0	2.5
	Cel	0.8	*	0
VITAMINAS (mg /100 gr)	A	*	1.0	0.10
	B1	0.1	0.4	0.2
	B2	0.4	0.6	*
	B3	1.9	1.8	1.7
	B6	0.6	0.6	*
	B9	0.4	12	0.46
	C	3.0	*	7.0
OLIGO- ELEMENTOS (mg /100 gr)	D	1.9	*	*
	K	0.4	*	0.15
	Na	0.02	0.1	0.032
	Ca	0.025	1.0	0.098
	Mg	0.005	0.005	0.047
	Fe	0.001	0.010	0.010
	Cu	0.0006	0.018	*
	P	0.13	0.14	0.656
	Mn	0.0006	*	*
Cl	0.08	*	0.018	
Zn	0.0005	0.0005	*	

Kcal= Calorías, Prot= Proteínas, Gr= Grasas, H₂O= Agua, Fib= Fibra, Cel= Celulosa, HC= Hidratos de Carbono, Na= Sodio, K= Potasio, Ca= Calcio, Mg= Magnesio, Zn= Zinc, Fe= Hierro, Cu= Cobre, Cl= Cloro, P= Fosforo, Mn= Manganese. (*)= No hay información.

ESPECIE	<i>Agaricus bisporus</i> (Champiñón)	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Seta)	<i>Ustilago maydis</i> (Huitlacoche)	
COMPOSICIÓN				
	CARBOHIDRATOS	Quitina	Quitina	Prolifenoles
		Glucanos	Hexosas	β-glucano
		Manitol	Azúcares- ácidos	Manitol
		Trealosa	Sacarosa	Arabinosa
		Glucosa	Azúcares alcohólicas	Glucosa
		Manosa	Metil-pentosas	Manosa
		Xilosa	Amino azúcares	Azúcares libres
		Ribosa	Pentosa	Fructuosa
				Glicerol
			Sorbitol	
PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	Cisteína	Prolina		
	Metionina	Metionina	Metionina	
	Treonina	Treonina	Treonina	
	Valina	Valina		
	Isoleucina	Isoleucina	Isoleucina	
	Leucina	Leucina	Leucina	
	Lisina	Lisina	Lisina	
	Tirosina	Tirosina		
	Fenilalanina	Fenilalanina		
		Triptófano		
			Aminoácidos azufrados	
		Histidina		
		Serina		
		Glicina		
		Cistina		
	Alanina			
	Arginina			
	Ácido glutámico			
	Ácido aspártico			
ANTIOXIDANTES	Fenoles	Ergotioneína	Fenoles	
	Selenio			

(Müller y Loeffler, 1976; Alexopoulos y Mims, 1985; Bonifaz, 1990; De Diego, 1990; Herrera y Ulloa, 1990; Galindo, 1991; García, 1993; Valverde, *et al*, 1995; Gea y Tello, 1997; Carlile y Watkinson, 1998; Lizarraga y López, 1998; Krizkova, *et al*, 2001; Chang, y Miles, 2004; Soto, y Arias, 2004; Salmones y Mata, 2005; Serafin, 2005; Paredes y Valverde 2006; Paredes *et al*, 2006; Molina y Kahmann, 2007; Ramos, 2007; Mendoza, 2008).

Anexo II.- ESTADIOS ONTOGÉNICOS

i.- PERMANENCIA (DÍAS) DE LOS ESTADIOS ONTOGÉNICOS POR TRATAMIENTO EN *Guarlanthe aurantiaca*.

ESPECIE	TRATAMIENTOS	[]	Estadios	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<i>Guarlanthe aurantiaca</i>	TESTIGO (KC)		1er Registro	7	27	27	137	120	120	0	174	189		
			Último registro	227	27	120	148	164	168	0	178	227		
	<i>Agaricus bisporus</i> + KC (Champiñón) (C)	5		1er Registro	7	21	27	41	120	126	0	168	189	
				Último registro	227	33	33	133	126	195	0	189	227	
		10		1er Registro	7	21	27	120	120	133	0	174	189	
				Último registro	227	33	126	133	148	189	0	178	227	
	15		1er Registro	7	21	27	120	120	126	174	0	189		
			Último registro	227	27	120	154	126	195	178	0	227		
	<i>Pleurotus ostreatus</i> + KC (Seta) (S)	5		1er Registro	7	27	27	120	120	137	0	0	189	
				Último registro	227	71	227	178	168	227	0	0	227	
		10		1er Registro	7	27	27	77	120	120	0	189	189	
				Último registro	227	71	97	120	120	178	0	227	227	
	15		1er Registro	7	27	33	126	137	126	137	161	189		
			Último registro	227	33	120	154	154	227	178	178	227		
	<i>Ustilago maydis</i> + KC (Huitlacoche) (H)	5		1er Registro	15	7	27	41	41	97	137	161	161	
				Último registro	21	33	50	91	91	168	168	178	227	
		10		1er Registro	15	7	27	41	41	97	148	137	168	
				Último registro	27	27	227	108	91	161	161	178	227	
	15		1er Registro	7	7	27	64	97	120	0	178	189		
			Último registro	227	21	83	133	115	174	0	178	227		
	<i>aurantiaca</i>	<i>Agaricus bisporus</i> (Champiñón) (C)	5		1er Registro	7	27	27	64	64	71	0	189	195
					Último registro	227	41	227	137	137	178	0	189	227
			10		1er Registro	7	27	27	115	115	120	0	174	195
					Último registro	227	27	227	133	120	178	0	189	227
		15		1er Registro	7	27	27	120	0	120	178	168	200	
				Último registro	227	71	227	126	0	174	178	195	227	
		<i>Pleurotus ostreatus</i> (Seta) (S)	5		1er Registro	7	27	27	0	0	0	0	0	0
					Último registro	227	27	227	0	0	0	0	0	0
10				1er Registro	7	27	27	0	0	0	0	0	0	
				Último registro	227	27	227	0	0	0	0	0	0	
15			1er Registro	7	27	27	0	0	0	0	0	0		
			Último registro	227	33	227	0	0	0	0	0	0		
<i>Ustilago maydis</i> (Huitlacoche) (H)		5		1er Registro	7	27	27	0	0	0	0	0	0	
				Último registro	227	27	227	0	0	0	0	0	0	
		10		1er Registro	7	27	27	0	0	0	0	0	0	
				Último registro	227	33	227	0	0	0	0	0	0	
15		1er Registro	7	0	27	0	0	0	0	0	0			
		Último registro	227	0	227	0	0	0	0	0	0			

ii. PERMANENCIA (DÍAS) DE LOS ESTADIOS ONTOGÉNICOS POR TRATAMIENTO EN *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

ESPECIE	TRATAMIENTOS	[]	Estadios	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<i>Euchile mariae</i>	TESTIGO (KC)		1er registro	10	10	18	36	53	111	0	164	211		
			Último registro	18	10	100	118	129	171	0	198	230		
	<i>Agaricus bisporus</i> + KC (Champiñón) (C)	5		1er Registro	10	10	18	53	53	100	151	157	164	
				Último registro	10	18	80	118	129	181	157	198	230	
		10		1er Registro	10	10	18	36	53	94	0	164	211	
				Último registro	10	10	80	118	129	181	0	198	230	
		15		1er Registro	10	10	18	30	53	94	177	164	164	
				Último registro	18	10	80	118	118	198	181	198	230	
	<i>Pleurotus ostreatus</i> + KC (Seta) (S)	5		1er Registro	10	10	18	30	36	94	111	118	136	
				Último registro	10	10	60	118	94	123	151	177	230	
		10		1er Registro	10	10	18	30	53	100	0	151	177	
				Último registro	24	10	60	86	151	198	0	198	230	
		15		1er Registro	0	10	18	30	36	67	177	111	136	
				Último registro	0	10	44	118	100	198	198	177	230	
	<i>Ustilago maydis</i> + KC (Huitlacoche) (H)	5		1er Registro	10	10	18	30	44	80	118	118	146	
				Último registro	10	10	67	94	74	129	129	140	230	
		10		1er Registro	10	10	18	30	44	111	123	164	171	
				Último registro	10	10	60	74	118	157	157	171	230	
		15		1er Registro	10	10	18	30	60	67	123	136	157	
				Último registro	10	10	74	111	100	146	151	164	230	
	<i>Euchile citrina</i>	<i>Agaricus bisporus</i> (Champiñón) (C)	5		1er Registro	10	10	18	53	36	118	0	171	0
					Último registro	10	10	100	100	146	220	0	230	0
			10		1er Registro	10	10	18	44	36	94	177	177	0
					Último registro	10	10	74	123	118	220	181	230	0
15				1er Registro	0	10	18	36	44	74	181	177	230	
				Último registro	0	10	67	86	100	211	211	230	230	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Seta) (S)		5		1er Registro	10	10	18	80	100	118	0	216	230	
				Último registro	10	10	111	118	157	230	0	220	230	
		10		1er Registro	10	10	18	67	53	111	0	220	230	
				Último registro	10	10	100	118	140	230	0	220	230	
<i>Ustilago maydis</i> (Huitlacoche) (H)		15		1er Registro	10	10	18	36	100	151	164	220	230	
				Último registro	10	10	100	140	151	230	164	220	230	
		5		1er Registro	10	10	18	36	111	136	198	216	0	
				Último registro	10	10	230	181	211	230	198	230	0	
		10		1er Registro	10	18	18	36	30	146	0	192	216	
				Último registro	18	24	230	181	171	211	0	230	220	
15			1er Registro	10	10	18	36	100	136	0	211	0		
			Último registro	18	10	100	140	129	230	0	230	0		

Anexo III. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN LAS ESPECIES DE ESTUDIO

i.- Comparación de los tratamientos en la germinación de *Guarjanthe aurantiaca*.

ESTADIO TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	30%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	70%
B	30%	0%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	50%
C	50%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	40%
D	10%	0%	30%	0%	0%	0%	0%	0%	60%
E	90%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
F	90%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
G	90%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
H	80%	0%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
I	50%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
J	80%	0%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
K	30%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	70%
L	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	80%
M	40%	0%	40%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
N	50%	0%	30%	0%	0%	10%	0%	0%	10%
Ñ	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	30%
O	50%	0%	0%	0%	0%	10%	0%	0%	40%
P	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
Q	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
R	30%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	60%

ii.- Comparación de los tratamientos en la germinación de *E. mariae x E. citrina*.

ESTADIO TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
B	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%
C	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%
D	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%
E	0%	0%	0%	0%	0%	90%	0%	0%	10%
F	0%	0%	0%	0%	0%	90%	0%	0%	10%
G	0%	0%	0%	0%	0%	90%	0%	0%	10%
H	0%	0%	30%	0%	0%	10%	0%	60%	0%
I	0%	0%	30%	0%	0%	0%	0%	70%	0%
J	0%	0%	0%	0%	0%	80%	0%	20%	0%
K	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
L	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
M	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
N	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
Ñ	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
O	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
P	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
Q	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
R	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%

Anexo IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

i. - Comparaciones en la especie de *Guarlanthe aurantiaca*.

1. Diferencias entre los 19 tratamientos en *Guarlanthe aurantiaca*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	Proporción	Valor
Entre grupos	933.362	18	51.8534	12.50	0.0000
Dentro de grupos	2522.18	608	4.14833		
Total (Corr.)	3455.54	626			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
Po 15	33	2.75758	X
Um 5	33	2.78788	X
Um 15	33	2.81818	X
Po 10	33	2.81818	X
Um 10	33	2.81818	X
Po 5	33	2.81818	X
KC	33	3.93939	X
Po 5 + KC	33	4.81818	XX
Ab 15 + KC	33	4.9697	X
Ab 10 + KC	33	4.9697	X
Ab 15	33	5.0303	X
Ab 10	33	5.06061	X
Po 10 + KC	33	5.09091	X
Po 15 + KC	33	5.15152	X
Um 15 + KC	33	5.39394	XX
Ab 5 + KC	33	5.42424	XX
Ab 5	33	5.48485	XX
Um 5 + KC	33	6.18182	X
Um 10 + KC	33	6.33333	X

2. Diferencias entre los tratamientos con *Agaricus bisporus* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) sin “Knudson C” y con “Knudson C”, en *Guarlanthe aurantiaca*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	50.961	6	8.49351	1.45	0.1978
Dentro de grupos	1314.97	224	5.8704		
Total (Corr.)	1365.93	230			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
KC	33	3.93939	X
Ab 10 + KC	33	4.9697	XX
Ab 15 + KC	33	4.9697	XX
Ab 15	33	5.0303	XX
Ab 10	33	5.06061	XX
Ab 5 + KC	33	5.42424	X
Ab 5	33	5.48485	X

3. Diferencias entre los tratamientos con *Pleurotus ostreatus* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) sin “Knudson C” y con “Knudson C”, en *Guarlanthe aurantiaca*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza

Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	246.632	6	41.1053	11.54	0.0000
Dentro de grupos	797.636	224	3.56088		
Total (Corr.)	1044.27	230			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
Po 15	33	2.75758	X
Po 10	33	2.81818	X
Po 5	33	2.81818	X
KC	33	3.93939	X
Po 5 + KC	33	4.81818	XX
Po 10 + KC	33	5.09091	X
Po 15 + KC	33	5.15152	X

4. Diferencias entre los tratamientos con *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) sin “Knudson C” y con “Knudson C”, en *Guarlanthe aurantiaca*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza

Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	517.316	6	86.2193	30.30	0.0000
Dentro de grupos	637.333	224	2.84524		
Total (Corr.)	1154.65	230			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
Um 5	33	2.78788	X
Um 15	33	2.81818	X
Um 10	33	2.81818	X
KC	33	3.93939	X
Um 15 + KC	33	5.39394	X
Um 5 + KC	33	6.18182	XX
Um 10 + KC	33	6.33333	X

5. Diferencias entre los tratamientos con *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) sin “Knudson C”, en *Guarlanthe aurantiaca*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	384.452	9	42.7168	17.66	0.0000
Dentro de grupos	774.182	320	2.41932		
Total (Corr.)	1158.63	329			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
Po 15	33	2.75758	X
Um 5	33	2.78788	X
Um 15	33	2.81818	X
Po 10	33	2.81818	X
Po 5	33	2.81818	X
Um 10	33	2.81818	X
KC	33	3.93939	X
Ab 15	33	5.0303	X
Ab 10	33	5.06061	X
Ab 5	33	5.48485	X

6. Diferencias entre los tratamientos con *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) con “Knudson C”, en *Guarlanthe aurantiaca*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	138.076	9	15.3418	2.64	0.0059
Dentro de grupo	1861.88	320	5.81837		
Total (Corr.)	1999.95	329			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
KC	33	3.93939	X
Po 5 + KC	33	4.81818	XX
Ab 15 + KC	33	4.9697	XX
Ab 10 + KC	33	4.9697	XX
Po 10 + KC	33	5.09091	XXX
Po 15 + KC	33	5.15152	XX
Um 15 + KC	33	5.39394	XXX
Ab 5 + KC	33	5.42424	XXX
Um 5 + KC	33	6.18182	XX
Um 10 + KC	33	6.33333	X

ii.- Comparaciones en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

1. Diferencias entre los 19 tratamientos en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	Proporción	Valor
Entre grupos	281.841	18	15.6578	4.26	0.0000
Dentro de grupos	2234.48	608	3.67514		
Total (Corr.)	2516.33	626			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
Po 15	33	4.9697	X
Po 5	33	5.0303	X
Um 5	33	5.06061	X
Um 15	33	5.06061	X
Um 10	33	5.15152	XX
Po 10	33	5.36364	XXX
Ab 5	33	5.78788	XXXX
Ab10	33	5.78788	XXXX
KC	33	5.78788	XXXX
Ab 15	33	5.87879	XXXX
Ab 10 + KC	33	6.0303	XXXX
Ab 5 + KC	33	6.21212	XXXX
Po 10 + KC	33	6.27273	XXXX
Um 10 + KC	33	6.27273	XXXX
Ab 15 + KC	33	6.30303	XXX
Um 15 + KC	33	6.60606	XXX
Um 5 + KC	33	6.90909	XX
Po 5 + KC	33	6.9697	X
Po 15 + KC	33	7.09091	X

2. Diferencias entre los tratamientos con *Agaricus bisporus* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) sin "Knudson C" y con "Knudson C", en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	9.27273	6	1.54545	0.44	0.8542
Dentro de grupos	793.515	224	3.54248		
Total (Corr.)	802.788	230			

Prueba de Rango Múltiple

Método: 95.0 por ciento Fisher LSD

	Total	Media	Grupos Homogéneos
Ab 5	33	5.78788	X
KC	33	5.78788	X
Ab 10	33	5.78788	X
Ab 15	33	5.87879	X
Ab 10 + KC	33	6.0303	X
Ab 5 + KC	33	6.21212	X
Ab 15 + KC	33	6.30303	X

3. Diferencias entre los tratamientos con *Pleurotus ostreatus* en sus tres concentraciones (5mL, 10mLy 15mL) sin “Knudson C” y con “Knudson C”, en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	152.416	6	25.4026	6.89	0.0000
Dentro de grupos	825.333	224	3.68452		
Total (Corr.)	977.749	230			
Prueba de Rango Múltiple					
Método: 95.0 por ciento Fisher LSD					
	Total	Media	Grupos Homogéneos		
Po 15	33	4.9697	X		
Po 5	33	5.0303	X		
Po 10	33	5.36364	XX		
KC	33	5.78788	XX		
Po 10 + KC	33	6.27273	XX		
Po 5 + KC	33	6.9697	X		
Po 15 + KC	33	7.09091	X		

4. Diferencias entre los tratamientos con *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) sin “Knudson C” y con “Knudson C”, en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	119.082	6	19.847	4.99	0.0001
Dentro de grupos	890.667	224	3.97619		
Total (Corr.)	1009.75	230			
Prueba de Rango Múltiple					
Método: 95.0 por ciento Fisher LSD					
	Total	Media	Grupos Homogéneos		
Um 15	33	5.06061	X		
Um 5	33	5.06061	X		
Um 10	33	5.15152	X		
KC	33	5.78788	XX		
Um 10 + KC	33	6.27273	XX		
Um15+ KC	33	6.60606	XX		
Um 5 + KC	33	6.90909	X		

5. Diferencias entre los tratamientos con *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) sin “Knudson C”, en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	42.7152	9	4.74613	1.68	0.0935
Dentro de grupos	905.636	320	2.83011		
Total (Corr.)	948.352	329			
Prueba de Rango Múltiple					
Método: 95.0 por ciento Fisher LSD					
	Total	Media	Grupos Homogéneos		
Po 15	33	4.9697	X		
Po 5	33	5.0303	XX		
Um 5	33	5.06061	XX		
Um 15	33	5.06061	XX		
Um 10	33	5.15152	XXX		
Po 10	33	5.36364	XXX		
Ab 5	33	5.78788	XX		
KC	33	5.78788	XX		
Ab10	33	5.78788	XX		
Ab 15	33	5.87879	X		

6. Diferencias entre los tratamientos con *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Ustilago maydis* en sus tres concentraciones (5mL, 10mL y 15mL) con “Knudson C”, en el híbrido *Euchile mariae* x *Euchile citrina*.

Tabla ANOVA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	proporción	valor
Entre grupos	55.1545	9	6.12828	1.34	0.2165
Dentro de grupos	1466.36	320	4.58239		
Total (Corr.)	1521.52	329			
Prueba de Rango Múltiple					
Método: 95.0 por ciento Fisher LSD					
	Total	Media	Grupos Homogéneos		
KC	33	5.78788	X		
Ab 10 + KC	33	6.0303	XX		
Ab 5 + KC	33	6.21212	XXX		
Po 10 + KC	33	6.27273	XXX		
Um 10 + KC	33	6.27273	XXX		
Ab 15 + KC	33	6.30303	XXX		
Um15+ KC	33	6.60606	XXX		
Um 5 + KC	33	6.90909	XX		
Po 5 + KC	33	6.9697	XX		
Po 15 + KC	33	7.09091	X		