



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Efecto de infusiones de sábila y nopal sobre la germinación y
desarrollo *in vitro* de *Epidendrum radicans* Pav.ex Lindl.
(Orchidaceae).**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

Hernández Trejo Héctor Javier

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Barbará Susana Luna Rosales

Proyecto PAPIME Pe207715



MÉXICO CD.MX.

Mayo, 2018



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.

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **HERNÁNDEZ TREJO HÉCTOR JAVIER**, con número de cuenta **302181890**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **08 de mayo de 2018** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. MARÍA SOCORRO OROZCO ALMANZA

VOCAL M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES

SECRETARIO Biol. JUAN ROMERO ARREDONDO

SUPLENTE M. en C. GENARO MONTAÑO ARIAS

SUPLENTE M. en C. FLORENCIA BECERRIL CRUZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de infusiones de sábila y nopal sobre la germinación y desarrollo *in vitro* de *Epidendrum radicans* Pav. ex. Lindl. (Orchidaceae).**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 16 de marzo de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

DEDICATORIAS

A mis padres Javier Hernández V. y María Trejo M. personas extraordinarias de las que me siento orgulloso gracias por haber confiado en mi y por su esfuerzo invertido para lograr mis metas.

A mi hermana por ser una gran guía, por estar conmigo en los buenos y malos momentos y enseñarme que todo se puede en esta vida siempre y cuando uno se lo proponga.

A mi cuñado un ejemplo a seguir de que a pesar de las circunstancias por las que uno atravesase nunca hay dejarse vencer siempre hay que seguir adelante, después vienen las glorias.

A Alejandra la persona más importante en mi etapa universitaria, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por tus palabras de aliento, por tus consejos, por hacerme más alegre y feliz esos días en la universidad por apoyarme y ayudarme a llegar a la meta, tu apoyo es parte importante de mi trabajo.

A mi sobrina Alexa por darme la felicidad de ser tío y darle alegría a nuestras vidas.

A Ruffo mi mejor amigo el más fiel gracias por todo este tiempo que estuviste a mi lado, se que algún día nos volveremos a encontrar amigo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido ser parte de ella.

A la Facultad de Estudios Zaragoza por brindarme los conocimientos para una excelente formación profesional

A la carrera de biología por darme otra perspectiva de la vida.

Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez[†], por sus grandes consejos y por compartir sus conocimientos ¡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 los miembros del jurado, por su tiempo, disposición y aportaciones durante la revisión de la tesis.

Dra. María Socorro Orozco Almanza
M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales
Biól. Juan Romero Arredondo
M. en C. Genaro Montaña Arias
M. en C. Florencia Becerril Cruz

A todos los profesores quienes me forjaron durante la carrera compartiendo sus conocimientos y vivencias.

A mis amigos **Denis, Isis, Freddy, Lenin y Julio** por compartir grandes experiencias a lo largo de la carrera y grandes días de fiesta, los estimo profundamente y siempre serán recordados.

Y gracias también a todos aquellos que tuve la oportunidad de conocer y que me brindaron un consejo y me impulsaron a seguir adelante.

ÍNDICE

RESUMEN

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO | 2 |
| 2.1 Generalidades de las orquídeas | 2 |
| 2.2 La flor de la orquídea | 3 |
| 2.3 Germinación de las semillas de orquídeas | 4 |
| 2.4 Reproducción | 5 |
| 2.5 Cultivo <i>in vitro</i> | 5 |
| 2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas | 6 |
| 2.7 Germinación <i>in vitro</i> | 6 |
| 2.8 Germinación simbiótica y asimbiótica | 6 |
| 2.9 Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> | 7 |
| 2.10 Medios de cultivo | 8 |
| 2.11 Medios nutritivos | 8 |
| 2.12 Sales inorgánicas | 8 |
| 2.13 Carbohidratos | 9 |
| 2.14 Suplementos naturales | 10 |
| 2.15 Complejos naturales | 10 |
| 2.16 Sábila (<i>Aloe barbadensi</i> Mill) | 11 |
| 2.17 Obtención del extracto de <i>Aloe vera</i> | 11 |
| 2.18 Nopal (<i>Opuntia auberi</i>) | 13 |
| 2.19 Género <i>Epidendrum</i> | 14 |
| 2.20 Descripción botánica de <i>Epidendrum radicans</i> Pav. ex. Lindl. | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.21 Taxonomía | 17 |
| 2.22 Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> del género <i>Epidendrum</i> | 17 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 18 |
| IV. HIPÓTESIS | 18 |
| V. OBJETIVO GENERAL | 18 |
| VI. OBJETIVOS PARTICULARES | 18 |
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 7.1 Material biológico | 19 |
| 7.2 Medios nutritivos | 19 |
| 7.3 Complejos orgánicos | 19 |
| 7.4 Diseño experimental | 19 |
| 7.4.1 Germinación | 19 |
| 7.4.2 Desinfestación y siembra de semillas <i>in vitro</i> | 20 |
| 7.4.3 Evaluación de la germinación | 20 |
| 7.4.4 Evaluación del índice de desarrollo | 21 |
| 7.4.5 Desarrollo de plántulas <i>in vitro</i> | 21 |
| 7.4.6 Medios de cultivo | 21 |
| 7.4.7 Evaluación del desarrollo de las plántulas <i>in vitro</i> | 22 |
| 7.4.8 Diseño estadístico | 22 |
| VIII. RESULTADOS | 24 |
| 8.1 Germinación de semillas de <i>Epidendrum radicans</i> | 24 |
| 8.2 Desarrollo ontogénico | 24 |
| 8.3 Índice de desarrollo | 27 |
| 8.4 Estadios de desarrollo presentes en cada tratamiento a los 126 días de cultivo de <i>Epidendrum radicans</i> | 29 |

| | |
|---|----|
| 8.4.1 Protocormos o estadio 3 | 29 |
| 8.4.2 Protocormos con primordio foliar o estadio 4 | 30 |
| 8.4.3 Protocormo con una hoja o estadio 5 | 31 |
| 8.4.4 Protocormo con dos hojas o estadio 6 | 32 |
| 8.5 Desarrollo de plántulas | 33 |
| 8.5.1 Altura de las plántulas | 33 |
| 8.5.2 Número de hojas | 35 |
| 8.5.3 Número de raíces | 37 |
| 8.5.4 Longitud de la raíz | 39 |
| IX. DISCUSIÓN | 42 |
| X. CONCLUSIONES | 46 |
| XI. BIBLIOGRAFÍA | 47 |
| XII. ANEXOS | |
| Anexo 1. Medios nutritivos utilizados para la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de <i>Epidendrum radicans</i> | 55 |
| Anexo 2. Medios de cultivo utilizados para la inducción de la germinación <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum radicans</i> . | 56 |
| Anexo 3. Medios de cultivo utilizados para el desarrollo <i>in vitro</i> de <i>E. radicans</i> . | 57 |
| Anexo 4. Resultados | 58 |
| Anexo 5. Ontogenia de <i>Epidendrum radicans</i> | 62 |

RESUMEN

Epidendrum radicans es una orquídea nativa de México que ha sido poco estudiada en relación a su biología básica y en particular al proceso del desarrollo ontogénico del embrión durante la geminación hasta su formación en plántula. En el presente estudio se indujo la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de esta especie, durante 126 días de cultivo se describió la ontogenia del embrión durante su proceso de germinación. Asimismo, se estableció su índice de desarrollo y se determinó al término del cultivo el máximo estadio ontogénico alcanzado. Se compararon 11 tratamientos, los cuales consistieron en la variación del Medio nutritivo y la presencia de sábila (S) *Aloe barbadensi* Mill y nopal (N) *Opuntia auberi*. Las semillas germinaron a partir de los 21 días de iniciado el cultivo en todos los tratamientos. El porcentaje de germinación fue del 100% en los 11 tratamientos, durante el proceso de germinación se describieron seis estadios ontogénicos: (1) semilla sin germinar, (2) embrión hinchado de color verde y dentro de la testa, a los 21 días, (3) protocormo, a los 42 días, en los tratamientos T7 (MS 20% + N 80%), T8 (MS 20% + S 80%), T9 (N 100%), T10 (S 100%) y T 11 (MS 20 + N 40% + S 40%), (4) protocormo con primordio foliar, a los 42 días, en los tratamientos T1 (MS 100%), T2 (MS 80% + N 20%), T3 (MS 80% + S 20%), T4 (MS 60% + N 20% + S 20%), T5 (MS 40% + N 60%), T6 (MS 40% + S 60%), T7 (MS 20% + N 80%), T8 (MS 20% + S 80%), (5) plántula con hoja, a los 63 días en los tratamientos T1 (MS 100%), T3 (MS 80% + S 20%), T4 (MS 80% + S 20%), T5 (MS 40% + N 60%), T6 (MS 40% + S 60%), T7 (MS 20% + N 80%), T8 (MS 20% + S 80%) y T11 (MS 20% + N 40% + S 40%) y (6) plántula con dos hojas y raíz, a los 84 días en los tratamientos T1 (MS 100%), T2 (MS 80% + N 20%), T3 (MS 80% + S 20%). El índice de desarrollo reflejó que más del 89% de las semillas, presentaron el estadio 3 o de protocormo los 63 días de cultivo. El menor valor del índice de desarrollo fue a los 21 días de cultivo donde el 74% de las semillas, presentaron embriones hinchados y verdes (estadio 2). El máximo estadio ontogénico alcanzado, al final del cultivo, fue el de plántula con dos hojas y raíz. Pasado los 126 días de cultivo, las plántulas se subcultivaron individualmente en los medios nutritivos T1 (MS 100%), T2 (MS 80% + N 20%), T3 (MS 80% + S 20%), T4 (MS 60% + N 20% + S 20%), T5 (N 100%) y T6 (S 100%), donde se evaluaron los siguientes parámetros: altura de la plántula (cm), número de hojas, número de raíces y longitud de la raíz más larga (cm) en un periodo de 80 días. La mayor altura fue para el T3 (MS 80% + S 20%) con 4 cm, el mayor número de hojas lo obtuvieron los tratamientos T1 (MS 100%) y T3 (MS 80% + S 20%) con 5 y 5 respectivamente. Para el número de raíces el tratamiento T1 (MS 100%) fue el que obtuvo el mayor número de raíces con 4. Finalmente, para la longitud de la raíz más larga se obtuvo con el tratamiento T6 (S 100%) con 2.82 cm. Se estableció así un protocolo de germinación y desarrolló *in vitro* para las semillas de *Epidendrum radicans*.

I. INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales países megadiversos del mundo: esto debido a su ubicación geográfica la cual está entrelazada sobre dos regiones biogeográficas la neártica y la neotropical, además de su compleja topografía, esto hace que tenga barreras geográficas, por ende hay una gran variedad de especies endémicas. Aunado, a esto México presenta serios problemas ambientales que ponen en peligro la gran biodiversidad con la que cuenta, en donde las orquídeas representan un grupo muy vulnerable para su extinción (Hágsater *et al.*, 2005).

La familia Orchidaceae es uno de los grupos de plantas más diversos con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial (Chase *et al.*, 2003; Dressler, 2005). México alberga una notable riqueza de orquídeas, han sido registrados en el país alrededor de 1 260 especies y 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007).

En los últimos años, se han extinguido en México varias especies de orquídeas al menos 22 (Hágsater *et al.*, 2005). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) ubica 260 especies de orquídeas mexicanas en la lista de especies en riesgo de extinción (Soto y Hágsater, 1990). De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, 188 especies están catalogadas en algún estado de conservación, 15 están en peligro de extinción, 62 amenazadas, 110 sujetas a protección especial y una se encuentra extinta en la naturaleza (NOM-059ECOL-2010). La colecta de flores y plantas en la naturaleza debe de desaparecer para mantener las poblaciones y preservar las plantas (Halbinger & Soto, 1997).

La mayor diversidad de orquídeas mexicanas se ubican en los ambientes más amenazados por las actividades humanas (Gernandt, 2007). Uno de los factores que más ha afectado a la diversidad es la deforestación, la cual ha degradado altamente los ecosistemas forestales. La explotación de los bosques, nicho que sustenta a la Orchidaceae, causan la pérdida de hábitat; así como, la sobre-colecta y saqueos en zonas bien definidas, han provocado que muchas especies de esta familia permanezcan en alto riesgo de supervivencia.

Es necesario impulsar la propagación y el *cultivo in vitro*, ya que las orquídeas son las más vulnerables a la transformación de su hábitat debido a la destrucción para un crecimiento urbano desordenado y si a esto se le añade el tráfico ilegal de especies dado a su suma importancia hortícola y comercial. En la actualidad se han obtenido datos de algunas especies que cuentan con un menor número de poblaciones, debido a la colecta inmoderada.

Las orquídeas presentan serios problemas para su propagación de forma natural, a causa de que la mayor parte de las semillas no se encuentran muy diferenciadas por lo que no se les distingue las radículas ni los cotiledones aparte de que carecen de endospermo (Pierik, 1990).

El tiempo que se requiere para la propagación, desarrollo y floración de las orquídeas es largo; sin embargo, con el uso de nuevas técnicas biotecnológicas de cultivo es posible disminuir este tiempo, suministrando los nutrimentos necesarios para su desarrollo y su crecimiento en condiciones óptimas (Francisco, 2008).

La presente investigación tuvo como finalidad determinar los beneficios de los extractos acuosos obtenidos a partir de dos plantas, nopal (*Opuntia auberi*) y sábila (*Aloe barbadensi* Mill), sobre la germinación y desarrollo *in vitro* de semillas *Epidendrum radicans*, como aditivos a las sales basales comerciales de tipo analítico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de las orquídeas

Una orquídea es una planta herbácea y perenne de hábito epifito, terrestre y litófilo que pertenece a una gran familia, representan el mayor grupo de plantas con flores, caracterizándose por su diversidad de formas, adaptaciones y distribución. Son apreciadas no sólo por su belleza de sus flores sino también por ser altamente adaptables en un amplio rango de condiciones de cultivo, lo que las hace muy deseables por coleccionistas y para ser cultivadas a nivel mundial. La mayor parte de las orquídeas están restringidas a desarrollarse en un hábitat húmedo por lo que los trópicos cuentan con gran abundancia, pero también existen especies en ambientes templados, desde el nivel del mar hasta grandes altitudes. (Jensen y Salisbury, 1994).

Presentan dos formas de crecimiento: monopodial, donde el tallo es vertical y simpodial donde el tallo tiene crecimiento horizontal (Fig.1), formando ápices dando como origen nuevos tallos con crecimiento vertical (Caneva, 1978; Fanfani y Rossi, 1989; Bellone, 2006; Lecoufle, 2006).

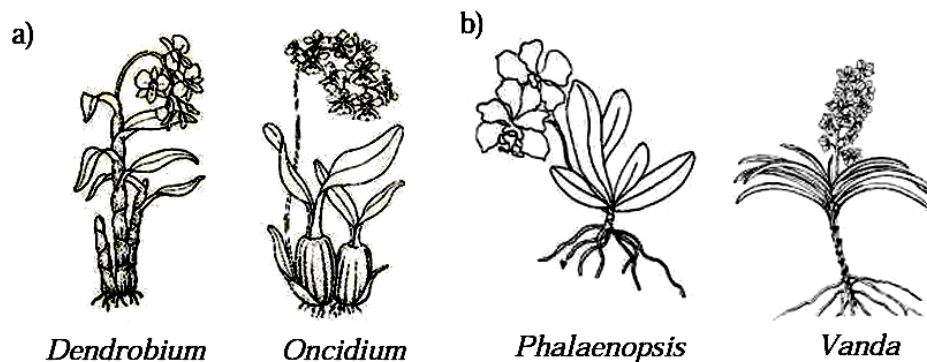


Figura 1. Tipos de crecimiento en orquídeas: a) Simpodial, b) Monopodial (Bell y Bryan 1991).

Las raíces de las orquídeas suelen ser carnosas y ramificadas y su diámetro va de 1 a 10 mm, dependiendo la especie. Por lo general son circulares con corte transversal (Hágsater *et al.*, 2005), tienen las funciones de absorber nutrientes, agua y de fijar la planta al suelo o en troncos. La porción más externa de la raíz es la epidermis, la cual suele formar un tejido esponjoso constituido por células que al madurar mueren y con esto se pierde el citoplasma, quedando solo las paredes parcialmente engrosadas, esta estructura de células muertas llamada velamen puede tener entre una y ocho células de grosor (tejido esponjoso con un aspecto blanquecino) característico de muchas orquídeas epifitas. Al contacto con el agua de lluvia, neblina y rocío, el velamen se embebe con rapidez y la humedad está disponible para la filtración hacia el interior de la raíz (Benzing *et al.*, 1983; Hágsater *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

Los tallos de orquídeas son parecidos a una caña, formados por nudos o segmentos, donde se insertan las hojas, vainas o escamas foliares (Bellone, 2006). Estos suelen ser caulescentes o acaules. Las orquídeas con tallos caulescentes presentan pseudobulbos que son tallos aéreos engrosados, presentes en las epifitas y en algunas terrestres. Tienen una gran variedad de formas según la especie (ovoide, esférica, alargada entre otros). Las orquídeas acaules tienen un tallo corto, como en muchas orquídeas terrestres que presentan tubérculos o cormos característicos en varios grupos de orquídeas epidendroides terrestres como *Bletia*, *Govenia*, *Liparis* y *Malaxis*. Su función

es almacenar agua y sustancias de reserva nutritiva, esto le permite a la planta subsistir en grandes periodos de sequía o utilizarlos para la producción de flores y frutos (Dressler, 1981; Hágsater *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

Las hojas son como en la mayoría de las monocotiledóneas, con nervaduras paralelas, alargadas, generalmente persistentes, lanceoladas, trianguladas, forma ovalada y de color generalmente verde (De la Cruz, 2006). Tienen la función de llevar a cabo el intercambio gaseoso, transpirar y de la producción de nutrientes a través de la fotosíntesis.

Las orquídeas poseen hojas muy gruesas que les sirven para el almacenamiento de agua y por lo tanto funcionan como tallos. Algunas especies que habitan en lugares con temperaturas muy altas e insoladas, tienen la característica de tener hojas cilíndricas para poder reducir la relación superficie volumen para poder así evitar el sobrecalentamiento y la deshidratación. Una estrategia que utilizan estas plantas es la producción de hojas delgadas relativamente poco costosas que sucumben y caen al finalizar cada temporada de crecimiento (Hágsater *et al.*, 2005).

2.2 La flor de la orquídea

Está constituida por tres sépalos generalmente coloreados al igual que los pétalos y estos pueden estar libres o más o menos unidos dando como forma un tubo. El sépalo dorsal casi siempre difiere en la forma de los laterales, los cuales suelen ser oblicuos y están libres uno del otro o adheridos por la base. Su estructura de tres pétalos, dos semejantes morfológicamente y el tercero llamado labelo esta modificado, para que el labelo quede en la posición que se observa en una flor abierta, previamente ha girado sobre su propio eje 180°, movimiento que recibe el nombre de resupinación (Hágsater *et al.*, 2005).

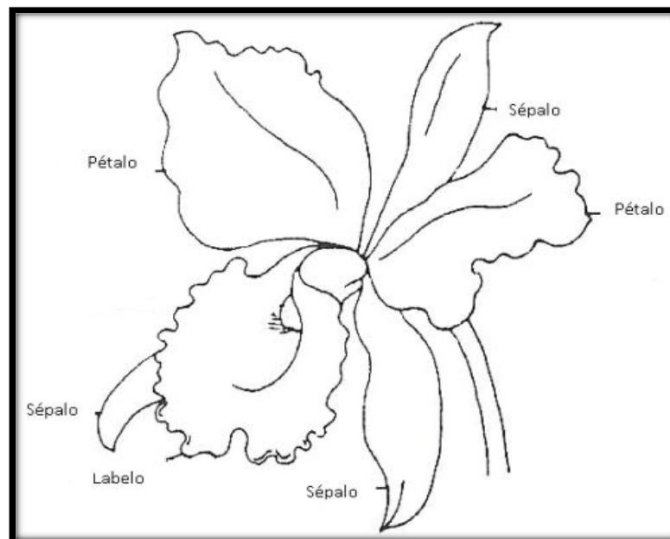


Figura 2. Morfología básica de una orquídea (Barba *et al.*, 2002)

El labelo cambia de color y de forma dependiendo del género, por lo que es un aspecto muy importante que se toma en cuenta para la creación de nuevos híbridos. Tanto los sépalos, como los pétalos sirven para atraer polinizadores a la planta, el labelo funciona como plataforma para los diferentes insectos, por lo cual difiere en tamaño, forma, color y fragancia de otros pétalos. Este pétalo modificado le da el estereotipo de la flor de la orquídea su forma y su simetría bilateral característica.

Las flores de las orquídeas son bisexuales y perfectas y por lo tanto cuentan con órganos sexuales masculinos (anteras y estambres) como femeninos (estilo, ovario y estigma) para constituir la estructura única llamada columna o ginostemio. (Hágsater *et al.*, 2005).

La columna es el órgano central en el cual se localizan los elementos para poder realizarse la reproducción. En el extremo inferior de estos, se ubica la parte receptiva del polen a la superficie estigmática, la antera con el polen está cerca del extremo superior, protegido por una capa o cubierta de la antera (Freuler, 2007).

Siendo una de la familias tan rica en diversidad en cuanto a tamaño, aspecto y hábitat. Al observar su flor no hay duda de que es una orquídea, sin importar si tiene pocos milímetros o si es sobredimensionada (Freuler, 2007).

El polen de las orquídeas puede aparecer en polvo o granular, pero la mayoría de las veces se presenta de forma compactada en cuerpos redondos o aplastados llamados polinios.

Los frutos de la familia Orchidaceae, son cápsulas que se desarrollan a partir del ovario después de que se llevó a cabo la polinización, estos tienen diversas formas dependiendo de la especie de la 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).

Una de las características más notables de las orquídeas es el tamaño y estructura de las semillas, estas miden entre 0.05 (*Anaectochilus imitans*) y 6.0 mm de largo (*Epidendrum secundum*) por 0.01 (tipo *Gastrodia*) a 0.93 mm de ancho (*Galeola nudifolia*) (Barba *et al.*, 2002). Debido a su peso las semillas se pueden dispersar por el viento. Un fruto llega a contener hasta cuatro millones de semillas.

La semilla contiene un embrión esférico o piriforme dentro de una testa membranosa, frecuentemente transparente o bien pigmentada. La mayoría de las especies tienen embriones relativamente indiferenciados, sin cotiledones ni endospermos, se les considera una característica de grupos avanzados evolutivamente.

Los embriones de orquídeas son pequeños cuerpos elipsoidales cuando maduran (están constituidos por 4 o 5 células) pueden medir entre 0.058 y 0.1 mm de ancho por 0.150 y 0.300 mm de largo, ocupan sólo una porción muy pequeña del espacio interno de la semilla el resto está ocupado por aire (Barba *et al.*, 2002).

Ante la carencia de endospermo, al suspensor se le atribuye el papel de la nutrición, y las sustancias de reservas nutritivas se localizan en las células del embrión (Arditti, 1967). Un número reducido de semillas encuentra las condiciones óptimas para germinar, debido a que necesitan la presencia de un hongo simbiote.

2.3 Germinación de las semillas de orquídeas

El proceso de germinación es similar para todas las especies de orquídeas (Arditti, 1992). Se define como los estadios secuenciales del desarrollo del embrión hasta llegar a la formación de una planta completa. Esta inicia con la absorción de agua a través de la testa dando como resultado un aumento en su volumen seguido por la división celular en la región anterior, provocando la ruptura de la testa, dando lugar a una estructura cónica o esférica llamada protocormo, en el cual se forma en la región apical una protuberancia con el primordio foliar. Enseguida de esto se da la formación

de rizoides alrededor de la parte inferior del protocormo. En el primordio foliar se desarrollan las hojas fotosintéticas y en la parte basal del protocormo se forman las raíces, formando así una planta completa (Barba *et al.*, 2002) (Fig. 3).

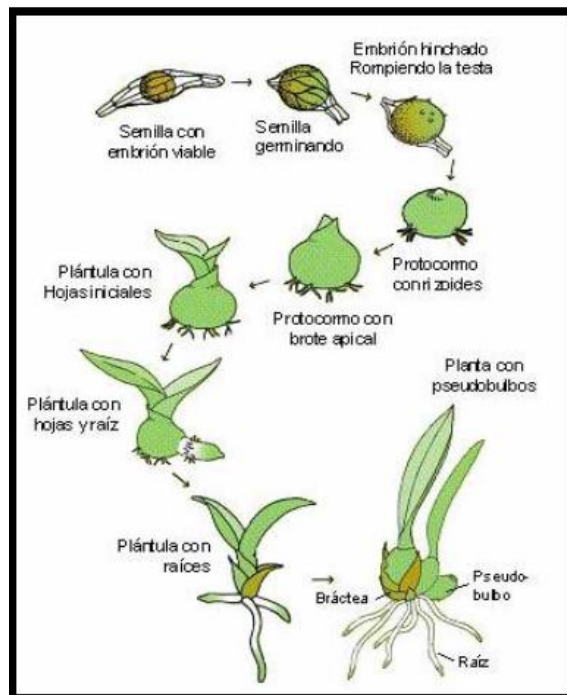


Figura 3. Estadios ontogénicos de *Laelia* sp. según Seaton Ramsay (2005).

2.4 Reproducción

Las orquídeas requieren para su germinación y desarrollo la asociación de hongos micorrizicos (Otero y Bayman, 2009). La micorriza orquídeoide tiene la cualidad de que la mayoría de los hongos que participan en una simbiosis pertenecen al género *Rhizoctonia*, la cual genera una asociación particular con las orquídeas, ya que la planta en su estado de semilla es dependiente de los nutrientes que le otorga el micosimbionte para obtener una exitosa germinación (Bernard, 1909; Arditti, 1992; Otero y Bayman, 2009). En las células corticales de las raíces del hongo se origina una estructura denominada pelotón que es un enrollamiento hifal (Hadley y Williamson, 1972).

Para el caso de las orquídeas terrestres, es de suma importancia la simbiosis orquídea-hongo (micorriza), el cual le sirve para absorber nutrientes durante los estadios tempranos del ciclo de vida de la planta. Caso contrario en los protocormos de orquídeas epifitas son comúnmente verdes, lo que les beneficia para producir parte de su alimento (McKendrick, 2000).

2.5 Cultivo *in vitro*

Se puede definir como cultivo *in vitro* “el cultivo de plantas, semillas, embriones, órganos, tejidos y células sobre un medio nutritivo en condiciones estériles” es decir sobre una superficie relativamente pequeña porque así se puede optimizar mejor las condiciones ambientales hormonales, nutritivas, de luz y temperatura (Estopa, 2005).

2.6 Cultivo *in vitro* de orquídeas

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

Existen diversos medios nutritivos que han sido desarrollados para el cultivo *in vitro* de orquídeas, estos han sido utilizados en varias especies de esta familia, los medios se han mejorado obteniendo grandes resultados para la propagación. La producción masiva de orquídeas se justifica con el uso de esta técnica ya que las orquídeas tienen un alto valor biológico, ecológico y comercial; ya que, mediante este proceso se puede lograr una producción anual continua, otra ventaja que presenta esta técnica es que están libres de patógenos, lo cual es muy útil si se piensa en exportación y en estudios de conservación.

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

Knudson desarrollo un método de cultivo *in vitro* asimbiótico para la germinación de semillas de orquídeas, este método fue fundamental y significativo para la propagación de orquídeas y de híbridos (Yoneo, 1991).

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

2.7 Germinación *in vitro*

Mediante el proceso de germinación *in vitro*, se colocan semillas en frascos de vidrio sobre un medio de cultivo agarizado el cual contiene azúcares minerales indispensables para que las semillas germinen y se desarrollen en plantas.

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

Se ha obtenido que el rango de germinación *in vitro* de las orquídeas está entre 7 y 235 días después de haberlas colocado en un medio de cultivo y la obtención de plántulas tarda entre los 50 y 724 días (Arditti, 1992). Los dos tipos básicos para la germinación *in vitro* son la simbiótica y asimbiótica (McKendrick, 2000).

2.8 Germinación simbiótica y asimbiótica

La luz es un elemento importante en la germinación para algunas orquídeas, esta puede actuar como inhibidor o estimulante dependiendo la especie y la intensidad lumínica.

En la germinación simbiótica *in vitro*, las semillas se cultivan con una pequeña proporción de una micorriza adecuada. El hongo crece en medio, coloniza a las semillas en el periodo de germinación llevando a cabo la relación simbiótica que se espera que alimente al protocormo hasta que obtenga hojas y se vuelva autotrófico. Esta técnica tiene la gran ventaja de usar un medio, uno de los más usados es avena en polvo con una pequeña proporción de extracto de levadura dando como resultado plantas micorrizadas que suelen ser más vigorosas y resistentes a infecciones en contraparte a las cultivadas asimbióticamente. Uno de los problemas que presenta este tipo de germinación es que se necesita seleccionar el tipo de micorriza adecuado para la orquídea para que se pueda originar la simbiosis y poder prevenir el parasitismo y la consecuente pérdida de la semilla (McKendrick, 2000).

La germinación está directamente relacionada con la simbiosis de la orquídea-micorriza, esta simbiosis entre el hongo micorrízico con las semillas de las orquídeas no ha sido estudiada completamente. Un estudio realizado en Costa Rica, en donde colocaron semillas de 24 especies de orquídeas epífitas y terrestres nativas, reporta que todos los individuos de las especies terrestres fueron micorrizados y que solo en algunos individuos de las plantas epífitas tenían micorriza (Rivas *et al*, 1998).

Yoder *et al.*, (2000) pusieron gran énfasis en la importancia de la micorriza, ya que esta es la encargada de transportar agua, además de realizar la función de nutrir al embrión.

2.9 Germinación asimbiótica *in vitro*

La germinación asimbiótica *in vitro* es de suma importancia ya que puede favorecer a la propagación de plantas de uso comercial o ecológico (Penningsfeld, 1985; Fay, 1992; Velázquez, 1997), ya que esta cuenta con nutrientes orgánicos, inorgánicos y con los azúcares que se encuentran disponibles en el medio de cultivo (Yoneo, 1991; Oblaidul *et al.*, 2000).

En 1922, Lewis Knudson formuló un método, completamente controlado y estandarizado, dando a conocer que varios azúcares intervienen en la germinación de las semillas de orquídeas.

Knudson comprobó que el hongo transformaba el almidón en azúcar y que las semillas utilizaban este azúcar para germinar, el sustituyó el hongo por el azúcar dando como resultado un crecimiento exitoso sin necesidad de la micorriza.

Knudson obtuvo el 100% de germinación asimbiótica del híbrido *Laelio cattleya* utilizando fructuosa y glucosa en el medio nutritivo además de agregarle las sales minerales y los extractos orgánicos (Arditti, y Ernst, 1984). Él practicó un estudio acerca de la germinación, de los géneros *Cattleya*, *Epidendrum* y *Laelia* en el medio de cultivo "Pfeffer" modificado, en los años siguientes se conocería como medio "Knudson B", posteriormente hace modificaciones de éste y le añade sacarosa como carbohidrato, así logra obtener el medio de cultivo "Knudson C" que es el que actualmente se utiliza en la germinación *in vitro* de orquídeas (Arditti, 1972).

Esta técnica de cultivo *in vitro* contribuyó a mejorar la germinación de las orquídeas, la metodología se ha utilizado principalmente para especies y híbridos de interés comercial. La gran ventaja de la germinación asimbiótica *in vitro*, es que se pueden reproducir miles de plantas en un medio artificial controlado, en el cual se le pueden realizar cambios de acuerdo a las necesidades de cada especie.

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

2.10 Medios de cultivo

El medio de cultivo básicamente consta de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Existen varios tipos de medios de cultivo disponibles; sin embargo, hay algunos que son específicos para ciertas especies, varios autores demostraron que no siempre es posible que una especie de orquídea logre germinar y se desarrolle en un medio de cultivo específico.

Por lo tanto, se han propuesto una serie de medios de cultivo para géneros de orquídeas específicos. Los medios más importantes son: Knudson B (1922); Knudson C (1946); Murashige y Skoog (1962), entre otros (Ballard, 1987; George *et al.*, 1987; Pierik, 1990; García *et al.*, 1993).

Para la germinación asimbiótica el medio de cultivo debe ser más complejo que el utilizado para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada, puesto que no existe la simbiosis con el hongo (McKendrick, 2000).

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

2.11 Medios nutritivos

Se han detallado un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro*. Merino (1987), determina que el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, así como el empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, asepsia. Utilizando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, se ha logrado establecer cultivos para casi toda la morfología de una planta.

2.12 Sales inorgánicas

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

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

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

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

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

Con el fin de perfeccionar las necesidades nutricionales de las diferentes especies de plantas se han realizado investigaciones dando como resultado la formulación de varias mezclas salinas; como es el caso de las fórmulas de Kao & Michayluk (1975) y Mitra *et al.*, (1976), que incluyen altas concentraciones de macronutrientes, como el nitrógeno en forma de NH_4 , NO_3 y KNO_3 ; a diferencia, de la fórmula de Knudson (1946) empleada principalmente para orquídeas.

2.13 Carbohidratos

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

Knudson (1946) observó que las semillas de *Cattleya mossiae* germinaron en un medio de cultivo con sacarosa, mientras que otras sin la presencia del azúcar, los embriones no se desarrollaron quedándose como protocormos. Esta misma respuesta también se logró observar con *Cypripedium acaule*, donde se obtuvieron protocormos con hojas y raíces en presencia de azúcares; sin embargo, cuando no se le agregaron estos azúcares al medio el resultado que se obtuvo fue solo el estadio de protocormo (Leroux *et al.*, 1995).

Las semillas de las diferentes especies de orquídeas cuentan con una capacidad de utilizar varios carbohidratos para su germinación, aunque también hay algunas que muestran alguna preferencia por algún carbohidrato en especial; diversos estudios han demostrado que hay especies que germinan *in vitro* únicamente si se presenta un determinado carbohidrato o cuando existe una mezcla entre alguno de ellos (Arditti, 1967).

En 1971 Arditti, Ernst y Healy observaron que para el proceso de germinación solo los azúcares como la glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, manosa, rafinosa, xilosa estaquirosa y otras, son factibles para la germinación *in vitro* de las orquídeas. Además, señalaron que la galactosa tiene un efecto inhibitorio ya que resulta tóxica 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).

Las semillas de orquídea pueden germinar y desarrollarse en un medio que contenga azúcares relativamente simples, ya que en la naturaleza las semillas son incapaces de utilizar largas moléculas sin la ayuda de un hongo que pueda romper estas moléculas y transformarlas en azúcares más simples, 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).

2.14 Suplementos naturales

La mayoría de las veces, con la idea de potenciar el desarrollo de las plantas, se acude a la adición de compuestos orgánicos en el medio de cultivo. Los complejos orgánicos son un grupo de suplementos indefinidos tales como el jugo de naranja, piña, tomate, uva, hidrolizado de caseína, agua de cocó (endospermo líquido de coco), savia de abedul, pulpa de plátano, homogenizado de papa, emulsión de pescado, extracto de germen de cebada, peptona etc., (Hicks, 2004; Beyl, 2005). Se han reportado varios estudios de orquídeas, con efectos benéficos por la adición de compuesto orgánicos en el medio de cultivo (Lu y Lee, 1990; Chen y Chen, 1998; Shiau *et al.*, 2002; Lo *et al.*, 2004).

De los compuestos orgánicos que más se ha utilizado, destacan el endospermo líquido de coco, hidrolizado de caseína y extractos vegetales como la papa.

El endospermo líquido de coco es una sustancia muy compleja ya que tiene una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos, es rico en fosfato y magnesio, cuenta con un alto contenido en azúcares indispensables para el desarrollo, además de vitaminas, aminoácidos, hormonas, enzimas, ácidos grasos y factores de crecimiento (Arditti y Ernst, 1993).

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 plátano maduro, tomate, papa, jugo de piña, entre otros (Withner y Krieger 1985; Devek 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 (Vacin y Went, 1949; Kano, 1965; Arditti, 1967).

Obaidul *et al.*, (2000) encontraron que la utilización de complejos orgánicos 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.

2.15 Complejos naturales

Además de los compuestos anteriores, se utilizan también suplementos orgánicos. El jugo de naranja contribuye con el ácido cítrico, así como con otros estimulantes del crecimiento, no identificados. La pulpa de plátano y la emulsión de pescado se usan principalmente en los medios para cultivo de orquídeas, mientras que el endospermo de coco, extracto de malta y extracto de levadura, jugo de tomate tienen un uso más general. La pulpa de plátano puede aumentar el

crecimiento de las plántulas de orquídeas. Dependiendo del medio, el homogenizado puede ser de frutos verdes, maduros o intermedios (Muñoz-Barrionuevo, 2011).

La caseína es la proteína más abundante de la leche, es un complejo de proteínas específicas que contienen grupos fosfóricos, esterificados en la serina y treonina. Cuentan con un carácter fuertemente ácido, debido a grupos carboxílicos libres y a los de ácido fosfórico. Se define, de forma simple, como la proteína precipitada por la acidificación de la leche desnatada a pH 4.6 y a 20°C. Se utiliza debido a que contiene un alto contenido de aminoácidos esenciales (alrededor de 20), además de asumir un papel importante en el transporte de minerales (Beyl, 2005).

La papa es un tubérculo formado principalmente por agua (80%), dentro de sus componentes también se encuentran los carbohidratos estos constituyen 16-20% entre los que destacan los almidones que representan el 75% de la materia seca de la papa. La concentración de azúcares sencillos es baja siendo los más importantes la glucosa, fructosa y la sacarosa. Las proteínas son el nutriente más representativo después de los carbohidratos constituyendo el 2% destacando las albuminas (49%) y globulinas (26%) como las fracciones proteicas más abundantes seguidas de prolaminas (4.3%) y glutelinas (8.3%). También destaca la presencia de una gran cantidad de enzimas y aminoácidos libres cuyas concentraciones varían dependiendo de la forma de cultivo y almacenamiento. Los lípidos no tienen gran importancia desde un punto de vista cuantitativo (0.1%). Hay una gran variedad de vitaminas hidrosolubles tales como la vitamina C y algunas del complejo B. La papa también es rica en minerales los cuales constituyen el 1% del total de la papa, destacando el potasio como elemento mayoritario y cantidades moderadas de fósforo, cloro, azufre, magnesio y hierro (Centro de Estudios Agropecuarios, 2001; Alonso, 2002).

Estos y otros compuestos orgánicos son a menudo usados en combinaciones con otros componentes definidos para promover el crecimiento y desarrollo deseados (Beyl, 2005) y como recomendación de algunos cultivadores (Hicks, 2004).

2.16 Sábila (*Aloe barbadensi* Mill)

Es una planta que pertenece a la familia de las *Liliáceas*. Se parece a un pequeño maguey. Es perenne, de rizoma largo. Se propaga por división de mata. Y tiene un hábito de crecimiento herbáceo. El análisis fitoquímico de la sábila refleja que tienen aceites esenciales, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, taninos, glucosa, proteínas y resinas. De la sábila se emplean la raíz, el tallo y las hojas. Es originaria del continente Africano, habiendo sido introducida al nuevo mundo por los Jesuitas españoles en el año de 1590. Aunque hay más de 200 especies de sábila, probablemente hay sólo tres o cuatro con propiedades medicinales. De estas, *Aloe vera Barbadenis* (Miller), la cual es conocida también como *Aloe vera* (L.), es la más potente. *Aloe vera Barbadenis* es más bien parecido a un cactus pero de hecho pertenece a la familia a la que pertenecen la cebolla, el ajo y los espárragos. Esta planta alcanza su madurez en cuatro años cuando sus hojas son cosechadas. Las hojas son fileteadas y su gel interno es preservado y embotellado para elaborar un producto (Aprocsal, 1994).

2.17 Obtención del extracto de *Aloe vera*

Según Conaza (1990) para obtener el extracto o acíbar de la sábila artesanalmente, se procede de la siguiente forma: Se escogen las hojas más grandes procurando al hacer el corte, de no lastimar las más jóvenes. Se deben cortar de 8 a 12 hojas de la planta en forma transversal y se cuelgan de manera que la parte seccionada quede hacia abajo, con el objeto de que escurra el acíbar por 24 horas, de esta manera se recibe el jugo en un recipiente de lámina galvanizada cubierta de resina epóxica, colocando sobre baños de agua fría, después de esto se envasa.

Según Vickery (1994) otro método de extracción consiste en moler las hojas por cualquier medio, centrifugar los residuos, filtrar el jugo y envasarlo.

La producción promedio de acíbar obtenido de esta forma es de 10 mL por cada hoja de tamaño medio. La extracción debe hacerse cuidadosamente para evitar que las proteínas se desnaturalicen y pierdan su actividad catalizadora, por esta razón debe evitarse que las hojas, una vez cortadas, sean expuestas al calor, a altas concentraciones salinas o pH extremos.

El manejo del acíbar en el transporte se hará a la menor temperatura y lo más rápido posible, y deberá refrigerarse una vez que ha sido extraído. El jugo contiene dos fracciones: una fase acuosa llamada gel de *Aloe* y otra liposoluble denominada aceite de *Aloe*, a partir de estas dos mezclas se obtienen productos entre los que destacan los fármacos, cosméticos, solventes y perfumes.

El proceso moderno para la elaboración del jugo, consiste en someter a las hojas de *Aloe* un tratamiento de corte y comprensión simultánea para extraer la mayor cantidad de jugo posible, después el extracto crudo pasa por las fases de desinfección, calentamiento, estabilización y envasado.

La sábila se ha ganado el sobrenombre de “planta milagrosa” por los numerosos beneficios que aportan los aproximadamente 200 elementos que la componen. El análisis fitoquímico de la sábila refleja que contiene proteínas en 0.013 %, polisacáridos 0.2 – 0.3 %, resinas 40 – 80 %, aloína 20 %, aceites esenciales, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, taninos, glucosa, agua y otros (Retamar, 1995). La sábila contiene 13 de los 17 minerales necesarios para la buena nutrición, aporta 20 de los 22 aminoácidos conocidos, ocho de estos son esenciales y deben ser proporcionados desde una fuente externa, ya que el cuerpo no los puede producir y está probado que consumir el jugo de sábila es una de las mejores fuentes para proporcionar al cuerpo estos aminoácidos. La sábila también contiene enzimas naturales y minerales necesarios para el organismo ya que las enzimas ayudan a realizar la reacción química de vitaminas, minerales y hormonas. (Yaron, 1995).

Entre los elementos químicos que conforman la sábila se mencionan:

- Aminoácidos: (aporta 20 de los 22 que requiere el organismo) lisina, valina, leucina, fenilalanina, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina y serina.
- Minerales: calcio, magnesio, potasio, cloro, hierro, zinc, cobre, cromo, azufre, aluminio, sodio y germanio.
- Oligoelementos: manganeso, calcio, potasio, sodio, aluminio, hierro, zinc, cobre, plata, cromo, fósforo y titanio.
- Vitaminas: A, B1, B2, B5, B12, C, ácido fólico y ácido nicotínico (niacina).
- Polisacáridos: celulosa.
- Carbohidratos: glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, acetilmanosa.
- Prostaglandinas y ácidos grasos: ácido ganmalinoleico.
- Aceites esenciales: trazas de aloesinas.
- Enzimas: oxidasa, catalasa, amilasa, lipasa, fosfatasa alcalina.
- Antraquinonas: aloin, barbaloin y ácido aloético.

Propiedades del *Aloe*:

- Nutritivo
- Estimulante del crecimiento celular

-
-
- Regenerador celular
 - Antioxidante
 - Antimicrobiano (bactericida y fungicida)
 - Aporte de elementos minerales esenciales.
 - Macro elementos: Potasio, calcio, magnesio, fósforo, azufre.
 - Micro elementos: Cloro, cobre, hierro, manganeso, zinc, boro.
 - Otros elementos esenciales: Germanio, sodio, aluminio, cobre, plata, cromo.

Estimulante del crecimiento.

En la composición química del gel de *Aloe*, se encuentra el fosfato de manosa, su principal función es que actúa como agente de crecimientos de los tejidos. El ácido ascórbico se considera benéfico para el crecimiento, ya que puede retrasar la formación de sustancias semejantes a la melanina, que inhiben el crecimiento.

Por su parte, el gel de *Aloe vera* (L.) N.L. Burm., ha demostrado su eficacia en la sustitución de reguladores sintéticos en medios de cultivos para el enraizamiento *in vitro* de plantas medicinales y frutales en condiciones de campo, también, potencialmente por sus características, podría ser utilizado para estos fines (Rodríguez, 2006).

Rodríguez, (2004) señala que se encontraron efectos estimulantes del crecimiento en los extractos líquidos de plantas medicinales estudiados, correspondiéndole al extracto del gel de *A. vera* el mejor comportamiento, particularmente con relación a la formación de raíces, superando incluso a los reguladores usados tradicionalmente como control, lo que demuestra la posible presencia de actividad auxínica en el mismo.

Jó María *et al.*, (2008) obtuvieron con diferentes concentraciones del medio Murashige & Skoog (MS), adicionando con 20 y 40 mL/L⁻¹ de extracto de *Aloe vera*, la micropropagación del plátano FIAH 18 con una respuesta fisiológica y enraizamiento excelente.

2.18 Nopal (*Opuntia auberi*)

El nopal pertenece a la familia de las cactáceas, que son plantas carnosas engrosadas y espinosas, y al género *Opuntia*, que se caracteriza por presentar tépalos extendidos con tallo articulado.

Arborescente, de 3 a 8 metros de alto y a veces más. Tronco cilíndrico, sin espinas, pero con glóquidas de color café; las ramas emergen del tronco más o menos en ángulo recto. Tallos articulados angostos, gruesos, de 30 cm de largo, azulados o verde grisáceos. Espinas 2 o 3 blancas, con la punta café, a veces faltan. Flores de color rosa oscuro, de 9 cm de largo. Fruto tuberculado (Bravo, H. 1978).

Distribución: centro y sur de México. Se le cultiva en varios lugares, es frecuente cerca de Mitla, Oaxaca; según Bravo (1978) también la ha colectado cerca de Totolapan, Oaxaca y en Cintapala, Chiapas.

Dentro de la composición química del nopal, primeramente encontramos un alto contenido de agua, que está en el orden de 90 – 92.5 %. Entre los minerales que contiene, los principales son el calcio y el potasio además de magnesio, sílice, sodio y pequeñas cantidades de hierro, aluminio, y magnesio, entre algunos otros. El nopal contiene también, en varias proporciones, diferentes glúcidos o carbohidratos y componentes nitrogenados.

Existen también procesos de deshidratación solar (Exposición directa del producto al sol, con o sin mallas sombra) y otros que lo deshidratan al emplear calor directo al nopal por diversos medios, entre los que están los hornos o métodos más artesanales).

El polvo de nopal se ha convertido en una de las formas principales para consumir nopal en muchos países del mundo y no sólo se utiliza en la industria de alimentos, sino también en la de cosméticos y en la de salud como insumo para la elaboración de derivados o subproducto.

2.19 Género *Epidendrum* L

El nombre *Epidendrum* proviene del griego *epi* (sobre) y *dendron* (árbol), en referencia al hábito epífita de las primeras especies descritas (Pridgeon *et al.*, 2006). *Epidendrum* es uno de los géneros que tienen mayor número de especies dentro de la familia Orchidaceae (Sánchez-Saldaña, 2007).

Con una distribución Neotropical el género (Fig.4) cuenta con 1 500 especies; distribuidas desde el Sureste de Estados Unidos (Carolina del Norte) hasta el Norte de Argentina (Pridgeon *et al.*, 2006).

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

En la República Mexicana este género se distribuye principalmente en los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Michoacán. En el norte se localiza en Durango, Sinaloa, San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas; en la zona centro se encuentra en Morelos, Puebla, Querétaro, Hidalgo, y Edo de México, al sur en Tabasco, y en la Península de Yucatán. Se estima que existen actualmente alrededor de 120 especies reportadas para México (Sánchez-Saldaña, 2007) (Fig.4).



Figura 4. Distribución del género *Epidendrum* L (Pridgeon *et al.*, 2006).

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

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

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

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

En contraste, algunas especies son encontradas en contrafuertes de madera en ambientes oscuros y húmedos del sotobosque. Estas especies son generalmente pequeñas, epífitas de corteza con tejidos para el almacenamiento de agua. Sus raíces tienen una fuerte orientación plagiotrópica, y su floración es lentamente sucesiva, usualmente con una flor en anthesis a la vez. El racimo cesa el desarrollo si la flor es polinizada, probablemente como respuesta para la maximización de recursos, como una adaptación a condiciones de oscuridad. (Pridgeon *et al*, 2006).

2.20 Descripción botánica de *Epidendrum radicans* Pav. ex. Lindl.



Figura 5. Flor de *Epidendrum radicans* Pav. ex. Lindl.
Foto tomada por: Luna-Rosales B.

Epidendrum radicans es una planta herbácea terrestre o litófita, llega a medir hasta 1.5 m de largo. Es de tallo cilíndrico, recto de 19 a 125 cm de largo y 3.5 a 8 mm de diámetro. Ramas erectas

a trepadoras. Hojas alternas, ovado-elípticas, cortamente mucronadas en el ápice, de 2 a 9 cm de largo y 1.2 a 2.5 cm de ancho, gruesas, coriáceas, base abrazadora, a veces algo purpúreas. Inflorescencia en racimos de hasta 60 cm de largo, a veces ramificados, sobre largos pedúnculos. Flores con brácteas pequeñas, triangulares, caducas en la base, grandes y vistosas. Pétalos de color rojo-anaranjado con la punta algo amarillenta (Fig. 5). Sépalos parecidos a los pétalos, el labelo modificado, con la parte basal angosta y unida a la columna, el ápice del labelo ensanchado abruptamente formando 3 lóbulos con el margen desgarrado la columna algo encorvada y dilatada hacia el ápice. Las cápsulas son elipsoides, acostilladas, de 4.2 a 4.4 cm de largo y 15 a 21 mm de diámetro. Las raíces son largas y carnosas, aéreas que salen de los tallos. (Fig. 6)

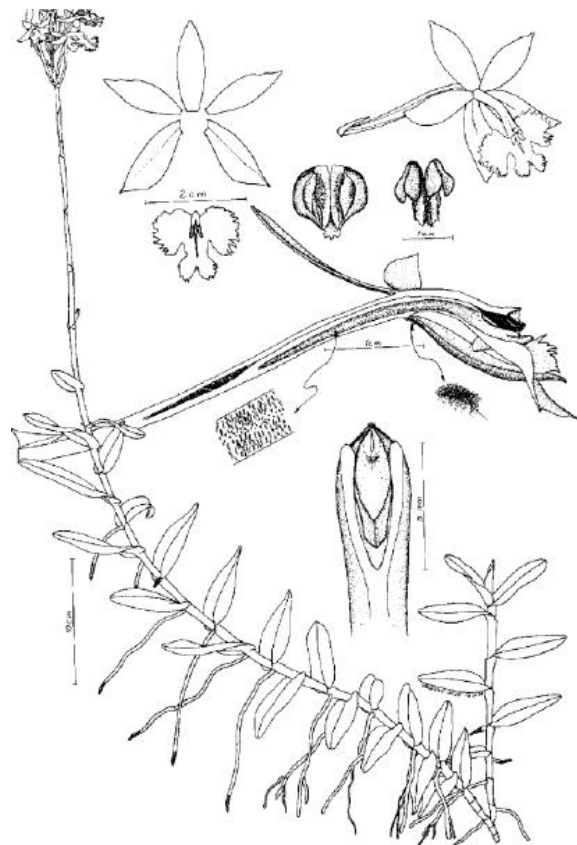


Figura 6. *Epidendrum radicans* (Pav. ex. Lindl.) (Hágsater y Salazar 1990).

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

2.21 Taxonomía

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Orchidales
Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae I
Subtribu: Laeliinae
Género: *Epidendrum*
Especie: *Epidendrum radicans* Pav. Ex Lindl
Sinónimos: *Epidendrum rhizophorum* Bateman
Epidendrum pratense Rchb. F.

2.22 Germinación asimbiótica *in vitro* del género *Epidendrum* L

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

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

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

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

Rodríguez (2013) realizó la germinación de semillas de *Epidendrum radicans* utilizando cuatro medios nutritivos, dos con las sales inorgánicas analíticas del medio Kao & Mychayluk (KM) y del medio Mitra (M), y dos con fertilizantes orgánicos comerciales, uno fue el Superthrive® (S) y el otro el XIBANI® un Ácido Húmico y Fúlvico (Iombrihumus), logrando el proceso de germinación a los 14 días en todos los tratamientos y culmina a los 56 días solamente en el medio con sales inorgánicas KM adicionado con Ca.

III. JUSTIFICACIÓN

La propagación *in vitro* de orquídeas con fines de ornato y repoblación ha sido uno de los retos más grandes para incrementar la producción mundial de estas plantas ya que requieren de un largo periodo de cultivo. En cuanto a este proceso de propagación se pretende establecer un protocolo para disminuir las sales basales ya que tienen un costo elevado, es por eso que por medio de los complejos orgánicos se pretende tener una mejor germinación y desarrollo *in vitro* ya que estos juegan un papel muy importante en los medios de cultivo ya que le brindan una mayor cantidad de nutrientes a la planta y esto llevaría a tener varias generaciones de orquídeas en un corto tiempo.

IV. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de *Aloe vera* y de *Opuntia auberi* contienen efectos estimulantes para el crecimiento y desarrollo en la micropropagación del plátano, superando a los reguladores químicos del crecimiento vegetal; por lo que, se espera que al utilizarlos en el cultivo *in vitro* de *Epidendrum radicans* estos promoverán su germinación y desarrollo.

V. OBJETIVO GENERAL

- Comparar el efecto de dos complejos orgánicos nopal y sábila sobre la germinación de semillas y desarrollo *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de las concentraciones de infusión de sábila y nopal como complejos orgánicos, adicionando al medio de cultivo para inducir la germinación *in vitro* de semillas de *Epidendrum radicans*.
- Comparar el efecto de las concentraciones de los dos complejos orgánicos naturales para estimular el desarrollo durante la germinación de esta especie.
- Describir la ontogenia del embrión de las semillas durante la germinación de las semillas de *Epidendrum radicans*.
- Establecer el efecto de los complejos orgánicos sobre plántulas de *Epidendrum radicans* para promover su desarrollo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se utilizó una cápsula madura y cerrada de *Epidendrum radicans*, la cual se obtuvo de la colección de orquídeas de la Unidad de Investigación en Biología Vegetal de la FES Zaragoza. UNAM

7.2 Medios Nutritivos

Se emplearon como medios nutritivos, sales basales del medio Murashige & Skoog (MS), con vitaminas mio-inositol, sacarosa y agar-gel como constituyentes orgánicos; y los extractos acuosos, en forma de infusión, se obtuvieron de dos complejos orgánicos uno de nopal (*Opuntia auberi*) (N) y otro con extracto de sábila (Aloe vera) (S), ambos adicionados con sacarosa y agar gel como constituyentes orgánicos (Anexo 1).

7.3 Complejos orgánicos

Para la preparación de los extractos de los complejos orgánicos se utilizaron 2 Kg de cladodios de nopal y 2 Kg de pencas de sábila; para la cual, se deshidrataron.

Los cladodios y pencas se lavaron con jabón y agua y se enjuagaron. Se cortaron en segmentos de 2 cm² y se colocaron en la mufla (Felisa) a 58°C hasta que se deshidrataron y se procedió a la pulverización con una licuadora y finalmente el polvo se almacenó en un frasco previamente lavado y se colocó en un refrigerador.

Para obtener los extractos de los activos del nopal y de la sábila se pesaron 2 gramos del polvo y cada uno se introdujo en un sobre de gasa esterilizada. Se disolvió cada uno por separado en un vaso de precipitado con 100 ml de agua destilada.

Los vasos de precipitados fueron colocados en una parrilla de calentamiento y una vez que las soluciones de cada uno de los complejos orgánicos estuvieron en punto de ebullición se dejó durante 5 minutos para concentrar los activos de cada compuesto orgánico.

7.4 Diseño experimental

7.4.1 Germinación

Para comparar el efecto de los dos complejos orgánicos sobre la inducción de la germinación *in vitro* de las semillas de *Epidendrum radicans* se utilizaron 11 tratamientos como medios de cultivo. Se emplearon diferentes concentraciones tanto del medio nutritivo MS, como de cada uno de los complejos naturales, nopal y sábila. Las concentraciones fueron (100%, 80%, 60% 40% y 20%), realizando cinco repeticiones para cada tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos empleados en la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

| Tratamientos | Medios de Cultivo |
|---------------------|------------------------------------|
| 1 | MS al 100% |
| 2 | MS al 80% + 20% nopal |
| 3 | MS al 80% + 20% sábila |
| 4 | MS al 60% + 20% nopal + 20% sábila |
| 5 | MS al 40% + 60% nopal |
| 6 | MS al 40% + 60% sábila |
| 7 | MS al 20% + 80% nopal |
| 8 | MS al 20% + 80% sábila |
| 9 | 100% nopal |
| 10 | 100% sábila |
| 11 | MS al 20% +40% nopal + 40% sábila |

A los tratamientos empleados (Anexo 2), se les agregó Agar-gel (5 g L^{-1}) y se ajustó el pH a 5.7 con HCl o Na OH según se requirió y finalmente se vaciaron 25 ml a frascos de vidrio tipo Gerber ® o 10 ml a tubo de ensaye. Los recipientes con medio de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 1.5 atmosferas (atm) de presión y 120°C , durante 15 min.

7.4.2 Desinfestación y siembra de semillas *in vitro*

Las semillas se obtuvieron de la cápsula madura bajo condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar, previo a esto se lavó la cápsula cepillándola con jabón y se enjuagó al chorro de agua corriente, posteriormente se colocó dentro de un vaso de precipitados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% de cloro disponible adicionándole una gota de jabón líquido, esta se colocó dentro de la campana de flujo laminar. Se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos, posteriormente se decantó la solución de cloro y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos de la solución, se sumergió en etanol al 70% y con ayuda de una pinza de disección se retiró y se incendió hasta consumirse el etanol, posteriormente, se colocó sobre una caja Petri estéril para realizar un corte longitudinal con ayuda de un bisturí previamente esterilizado, quedando dos secciones de la capsula con las semillas expuestas. Cada una de las secciones se tomó con ayuda de unas pinzas de disección estériles para distribuir las semillas del interior de la cápsula dentro de los frascos con medio de cultivo de cada uno de los tratamientos, para cada repetición se colocaron aproximadamente 100 semillas.

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

7.4.3 Evaluación de la germinación

Se estableció como criterio de germinación de la semilla de *Epidendrum radicans* cuando observó el estadio de embrión hinchado y verde.

Para evaluar la germinación de *Epidendrum radicans* se registró cada 21 días, durante 126 días y en cada una de las repeticiones por tratamiento, el estadio en el que se encontraba y se

tomaron registros fotográficos de semillas en sus diferentes etapas y se comparó que tratamiento fue más eficiente para inducirla.

Se registraron los diferentes estadios durante la germinación desde el embrión hinchado hasta la formación de la plántula.

7.4.4 Evaluación del índice de desarrollo

Los cambios ontogénicos del embrión de *Epidendrum radicans*, durante el proceso de germinación, fueron registrados en cada una de las repeticiones por tratamiento cada 21 días durante cuatro meses para establecer la ontogenia del embrión durante su germinación; así como, para calcular el índice de desarrollo (I.D.) considerando seis estadios ontogénicos.

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

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

Dónde:

x = valor del estadio ontogénico

e_x = Número de individuos registrados en ese estadio ontogénico

e = total de individuos en la muestra

La evaluación del desarrollo del embrión a plántula se hizo en un periodo de 126 días y cada 21 días se hizo nuevamente un registro para observar en que estadio se encuentran.

7.4.5 Desarrollo de plántulas *in vitro*

Se utilizaron plántulas completas de *Epidendrum radicans*, de un rango de 1 a 3 cm de altura, obtenidas durante el proceso de germinación *in vitro*.

7.4.6 Medios de cultivo

Para comparar el efecto de los dos complejos orgánicos sobre el desarrollo *in vitro* de las plantas de *Epidendrum radicans*, se utilizaron el medio MS y los complejos naturales N y S en diferentes concentraciones (100%, 80%, 60% y 20%) (Anexo 3). Resultando seis tratamientos, incluido el testigo (Cuadro 2), con 20 repeticiones cada uno.

Cuadro 2. Tratamientos empleados para el desarrollo *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

| Tratamientos | Medios de cultivo |
|--------------|------------------------------------|
| 1 | MS al 100% |
| 2 | MS al 80% + 20% nopal |
| 3 | MS al 80% + 20% sábila |
| 4 | MS al 60% + 20% nopal + 20% sábila |
| 5 | Nopal al 100% |
| 6 | Sábila al 100% |

A los medios de cultivo, se les adicionó Agar-gel (5 gL^{-1}), carbón activado (2 gL^{-1}) y se ajustó el pH a 5.7 con HCl o NaOH según se requirió y se vaciaron 15 ml en tubos de ensaye.

Los recipientes con medio de cultivo se esterilizaron en la autoclave a 1.5 atmosferas (atm) de presión y 120°C , durante 15 minutos.

La campana de flujo laminar se limpió de la misma manera que en el cultivo *in vitro* de semillas, cada tubo de ensaye con medio de cultivo y resto del material con una solución de etanol al 70% antes de ser introducido.

Las plántulas que se utilizaron se manejaron con mucho cuidado para evitar dañar algún tejido, ya que se encontraron en una etapa muy sensible. Si la planta contenía alguna parte muerta se retiró para evitar cualquier contaminación, se introdujeron a los tubos de ensaye con los tratamientos, las plántulas completas (1-3) cm de altura y con varias raíces, para que estas logaran mayor probabilidad de sobrevivir. Se procuró que cada tratamiento con sus repeticiones contenga un solo ejemplar.

Al finalizar el subcultivo de las plantas en los tubos se colocaron en condiciones de incubación bajo una intensidad luminosa de 2 focos (322.9 lux focos Phillips F96T8 de 59 watts) con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

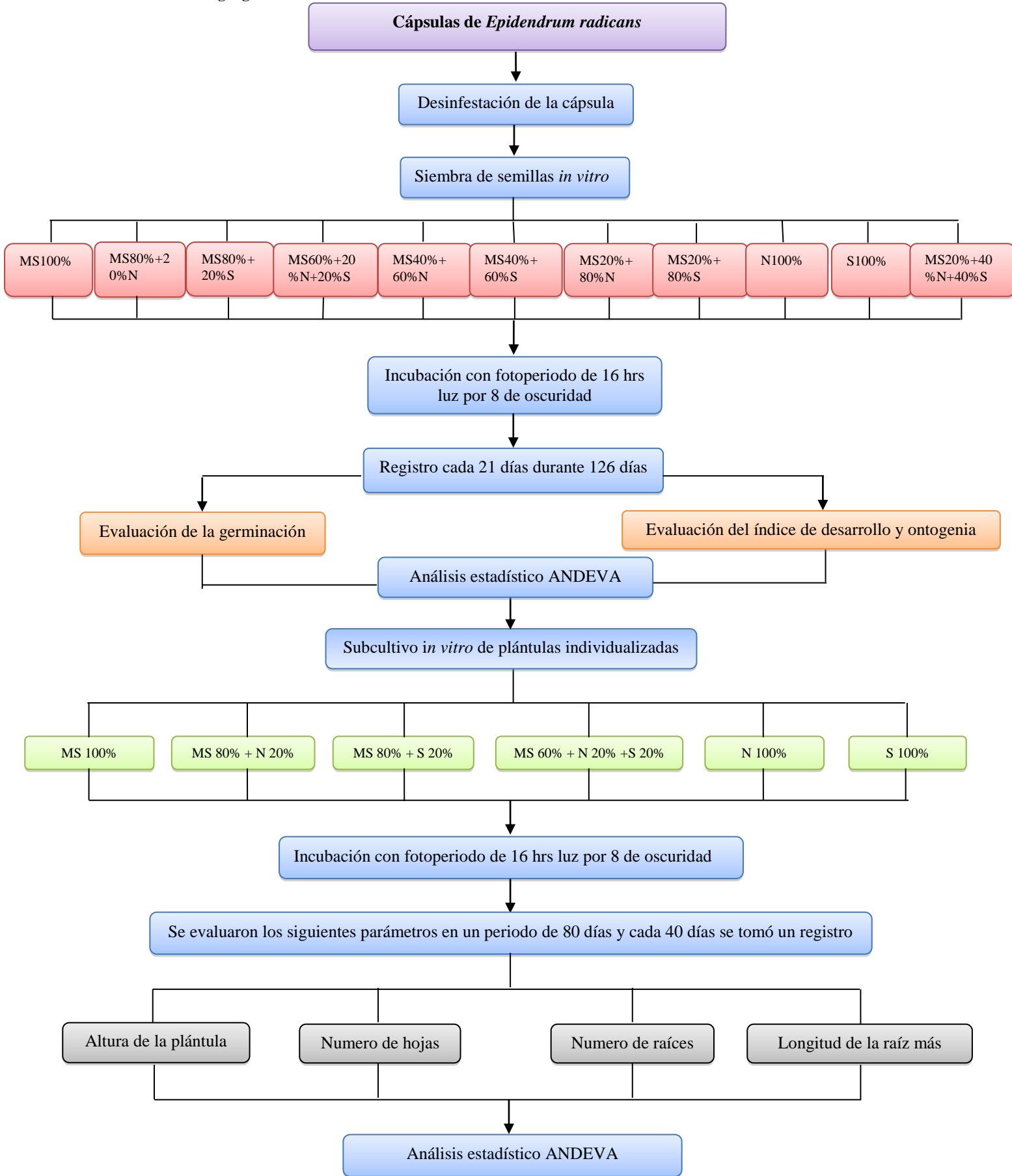
7.4.7 Evaluación del desarrollo de las plántulas *in vitro*

La evaluación de las plántulas individualizadas se realizó en un periodo de 80 días y cada 40 días se tomó un registro tomando en cuenta los siguientes parámetros altura de la plántula (cm), número de hojas, número de raíces y longitud de la raíz más larga (cm).

7.4.8 Diseño estadístico

A los datos obtenidos en el desarrollo de plántulas se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0, para conocer si existieron diferencias significativas entre los tratamientos empleados durante el tiempo de cultivo.

Cuadro 3. Metodología general



VIII. RESULTADOS

8.1 Germinación de semillas

La germinación de las semillas de *Epidendrum radicans* fue del 100% en todos los tratamientos con un tiempo medio de 21 días después de la siembra, correspondiendo al estadio 2 del desarrollo.

8.2 Desarrollo ontogénico

Se establecieron seis estadios ontogénicos durante el proceso de germinación *in vitro* de semillas de *Epidendrum radicans* (Cuadro 4).

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

| Valor del estadio | Índice de desarrollo | Estadio Ontogénico |
|-------------------|----------------------|---------------------------------|
| 1 | 100 | Semilla sin germinar |
| 2 | 200 | Embrión hinchado y verde |
| 3 | 300 | Protocormo |
| 4 | 400 | Protocormo con primordio foliar |
| 5 | 500 | Plántula con una hoja |
| 6 | 600 | Plántula con dos hojas y raíz |

Las semillas de *Epidendrum radicans* sin germinar (estadio 1) se caracteriza principalmente por presentar un embrión que se encuentra suspendido dentro de un retículo o testa transparente constituida por una sola capa de células (Fig. 7). La semilla carece de cotiledón y endospermo, pero el embrión contiene reservas energéticas en cantidades limitadas.



Figura 7. Semilla sin germinar de *Epidendrum radicans*

Después de 21 días de cultivo, se observaron los embriones hinchados (estadio 2) y de color verde dentro de la testa de las semillas (fig. 8), en todos los tratamientos empleados para inducir la germinación. El embrión, al incrementar su volumen, ocupó un mayor espacio en el interior de la testa hasta provocar que ésta se desgarrara y permitiera la salida del embrión para iniciar así el proceso de germinación.

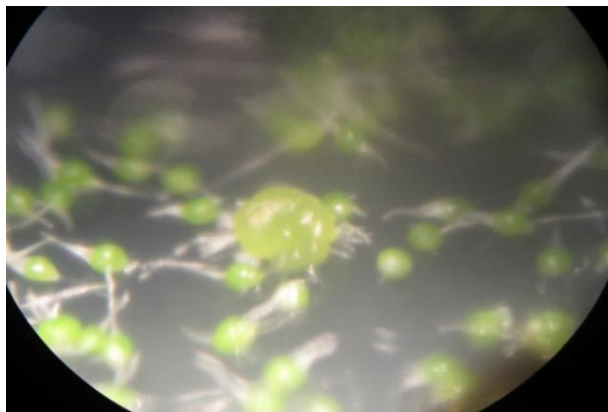


Figura 8. Embrión hinchado y verde de *Epidendrum radicans*

Los protocormos o estadio 3 (Fig. 9) se observaron inicialmente a los 42 días en cinco de los 11 tratamientos empleados T7 MS 20% + N 80%, T8 MS 20% + S 80%, T9 N 100%, T10 S 100% y T11 MS 20% + N 40% + S 40%. Estos presentaron un tamaño mayor que el de los embriones hinchados y adquirieron un color verde más oscuro en uno de los polos y la presencia de la protuberancia, indicando con esto la ubicación del polo apical y evidenciando posteriormente la zona meristemática vegetativa.

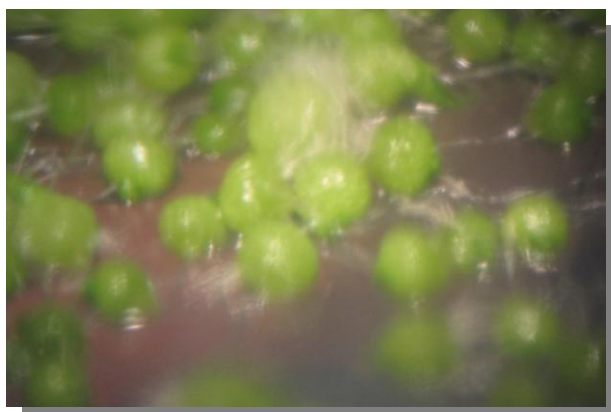


Figura 9. Protocormo de *Epidendrum radicans*

Posteriormente, el protocormo presentó la formación del primordio foliar estadio 4 (fig. 10), el cual es un precursor de las hojas verdaderas. Inicialmente se observó, este estadio, en los tratamientos T1 (MS 100%), T2 (MS 80% + N 20%), T3 MS (80% + S 20%), T4 (MS 60% + N 20% + S 20%), T5 (MS 40% + N 60%), T6 (MS 40% + S 60%) y T8 (MS 20% + S 80%) a partir de los 42 días de haber realizado la siembra; ya que, después de 21 días más (a los 63 días) se observó en los tratamientos T7 (MS 20% + N 80%) y T11 MS (20% + N 40% + S 40%). En los tratamientos T9 (N 100%) y T10 (S 100%) permanecieron en (estadio 3) hasta los 126 días de haber sido cultivados.

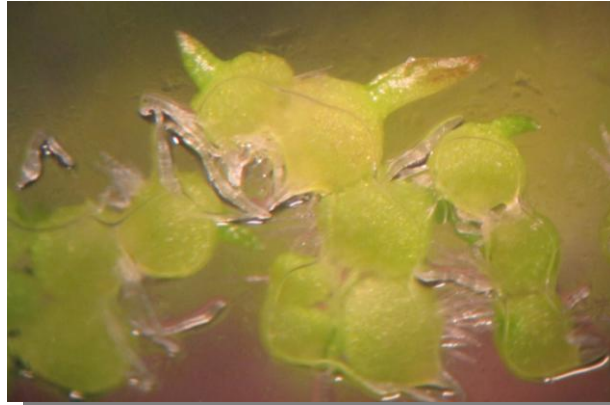


Figura 10. Protocormo con primordio foliar de *Epidendrum radicans*

A los 63 días de cultivo se observó por primera vez el estadio 5 o plántulas con hojas (fig. 11) en los tratamientos T1 (MS 100%), T3 (MS 80% + S 20%), T4 (MS 80% + S 20%), T5 (MS 40% + N 60%), T6 (MS 40% + S 60%), T7 (MS 20% + N 80%), T8 (MS 20% + S 80%) y T11 (MS 20% + N 40% + S 40%); posteriormente se observó a los 84 días de cultivo en el tratamiento T2 (MS 80% + N 20%).



Figura 11. Plántula con una hoja de *Epidendrum radicans*

Las primeras plántulas completas, con dos hojas y raíz (estadio 6) (Fig. 12) se observaron a los 84 días de cultivo en los tratamientos T1 (MS 100%), T2 (MS 80% + N 20%), T3 (MS 80% + S 20%), a los 105 días en los tratamientos T4 (MS 80% + S 20%), T5 (MS 40% + N 60%), T6 (MS 40% + S 60%), T8 (MS 20% + S 80%) y T11 (MS 20% + N 40% + S 40%).



Figura 12. Plántula con dos hojas y raíz de *Epidendrum radicans*

8.3 Índice de desarrollo

El análisis estadístico del índice de desarrollo (I.D.) obtenido durante la germinación de las semillas de *Epidendrum radicans*, mostro que existieron diferencias significativas en el tiempo de cultivo y en los tratamientos, puesto que sus valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el I.D. con un 95.0% de nivel de confianza; sin embargo, no existieron diferencias significativas (p-valor 0.9652) entre sus interacciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza del índice de desarrollo durante la germinación *in vitro* de las semillas de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 394822. | 5 | 78964.4 | 3.20 | 0.0081 |
| B:Tratamientos | 1.93829E6 | 10 | 193829. | 7.84 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 805151. | 50 | 16103.0 | 0.65 | 0.9652 |
| RESIDUOS | 6.49838E6 | 263 | 24708.7 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 9.63317E6 | 328 | | | |

Al comparar las medias de los índices de desarrollo obtenidos en cada uno de los tratamientos, independientemente del tiempo de cultivo, se observa que en los tratamientos 1 (MS 100%) y 3 (MS 80%+S 20%) los valores del I.D., de 401 y 377 respectivamente, fueron los más altos y diferentes al resto de los tratamientos, estos valores indican que los embriones cambiaron su morfología de un estadio de embrión a protocormo con una hoja y protocormo con primordio foliar respectivamente; mientras que, los tratamientos 2 (MS 80%+N 20%), 4 (MS 60%+N 20%+S 20%) y 5 (MS 40%+N 60%) alcanzaron un valor entre los 240 y 260 lo que indica que la mayoría de las semillas permanecieron en el estadio de protocormo, seguidos por los tratamientos 6 (MS 40%+S 60%), 7 (MS 20%+N 20%), 9 (N 100%), 10 (S 100%) y 11 (MS 20%+N 40%+S 40%), con un I.D. de aproximadamente 180 a 200 lo que demuestra que las semillas permanecieron hinchadas y verdes. Finalmente, en el tratamiento 8 (MS 20%+S 80%) se obtuvo el menor I.D., con un valor de 149 resultando ser diferente al resto de los tratamientos (Fig. 13).

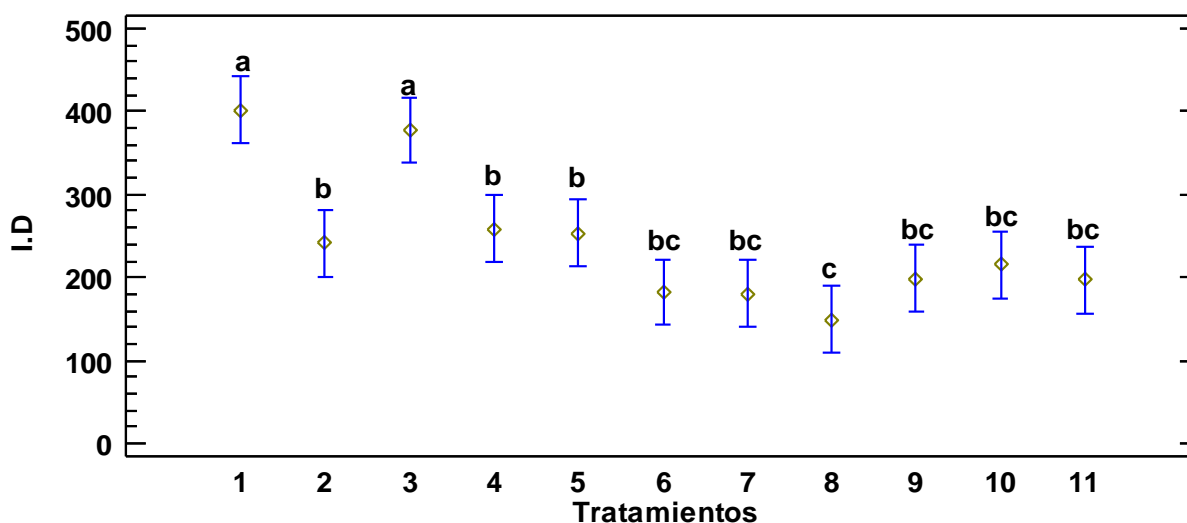


Figura 13.- Desarrollo durante la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* en los tratamientos empleados, independientemente del tiempo de cultivo. (1= MS 100%, 2= MS 80% + N 20%, 3= MS 80% + S 20%, 4= MS 60% + N 20% + S 20% 5= MS 40% + N 60%, 6= MS 40% + S 60%, 7= MS 20% + N 80%, 8= MS 20% + S 80%, 9= N 100%, 10= S 100%, 11= MS 20% + N 40% + S 40%)

Al comparar las medias de los índices de desarrollo obtenidos para cada tiempo de cultivo, independientemente a los tratamientos, se observó que a los 63 días de cultivo se obtuvo el mayor I.D, el cual fue diferente al resto de los tiempos de cultivo, y en donde los embriones tenían un valor de 289 de los cuales el 89% presentaron el estadio 3 o de protocormo. En el resto de los tiempos de cultivo los valores del I.D resultaron iguales estadísticamente entre sí. El menor valor de los índices fue de 174, a los 21 días de cultivo que indica que el 74% de las semillas, presentaron embriones hinchados y verdes (Estadio 2). En el resto, el valor promedio del I.D fue 251, este valor reflejo que solo el 51% de las semillas se encontraba en estadio de protocormo (estadio 3) (Fig. 14).

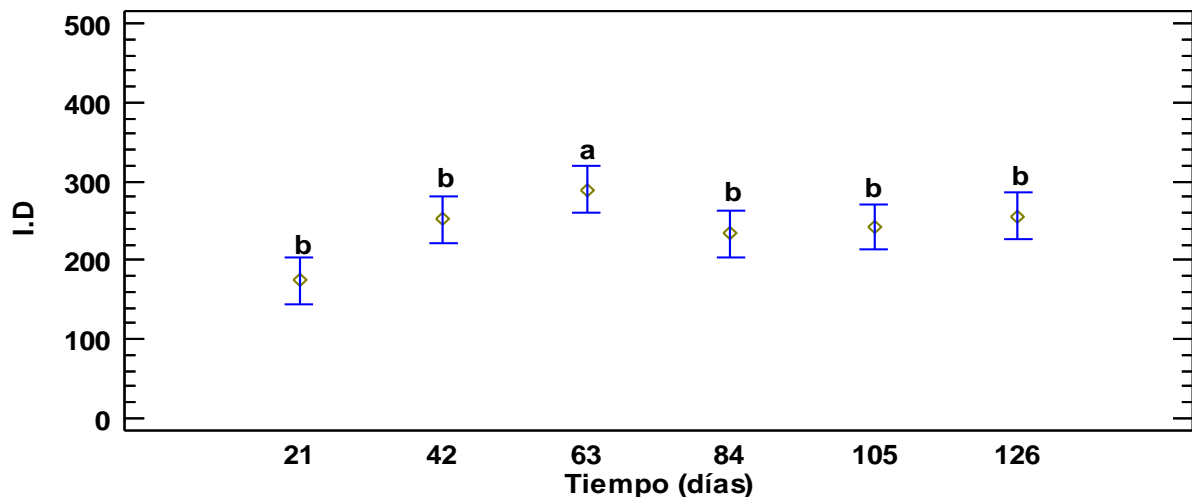


Figura 14.- Desarrollo durante la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* a través del tiempo de cultivo, independiente a los tratamientos utilizados.

En la figura 15 se aprecia que el valor promedio obtenido del índice de desarrollo en los tratamientos T1 (MS 100%), T9 (N 100%), T10 (S 100%) y T11 (MS 20% + N 40% + S 40%) a los 21 días de cultivo el valor fue de 200, esto indica que todos los embriones de las semillas presentaban hinchamiento o estadio 2.

A los 42 días de cultivo en los tratamientos 1 (MS 100%) y 3 (MS 80% +S 20%), los embriones alcanzaron un mayor índice de desarrollo con un valor de 392 y 388 respectivamente donde el 92 y 88% alcanzaron el estadio de protocormo con primordio foliar (estadio 4).

A los 63 días de cultivo, en los tratamientos 1 (MS 100%) y 3 (MS 80%+S 20%), los embriones rebasaron el estadio 4 o de protocormo con primordio foliar y el 14 y 9% de los protocormos, de cada tratamiento respectivamente, alcanzaron el estadio 5 o de protocormo con una hoja. En este tiempo, en los tratamientos 4 (MS 60%+ N 20%+S 20%) y 7 (MS 20%+N 80%), los embriones incrementaron el índice de desarrollo a 324 y 325 respectivamente, donde el 24 y 25% se desarrollaron en protocormo con primordio foliar (estadio 4). Mientras que en el resto de los tratamientos 2 (MS 80%+N 20%), 5 (MS 40%+N 60%), 6 (MS 40%+S 60%), 8 (MS 20%+S 80%), 9 (N 100%), 10 (S 100%) y 11 (MS 20%+N 40%+S 40%) el máximo índice desarrollo fue de 250.

En los tratamientos 1 (MS 100%) y 3 (MS 80%+S 20%) a partir de los 84 días hasta los 126 días los protocormos continuaron desarrollando una hoja o estadio 5; sin embargo, al final del cultivo solo en el tratamiento 1 (MS 100%) se desarrollaron el 2% de los protocormos con dos hojas o estadio 6, obteniendo un valor del I.D. de 502.

En el resto de los tratamientos se perdieron repeticiones debido a que se contaminaron por lo cual el tratamiento T8 (MS 20% + S 80%) obtuvo un descenso en su índice de desarrollo.

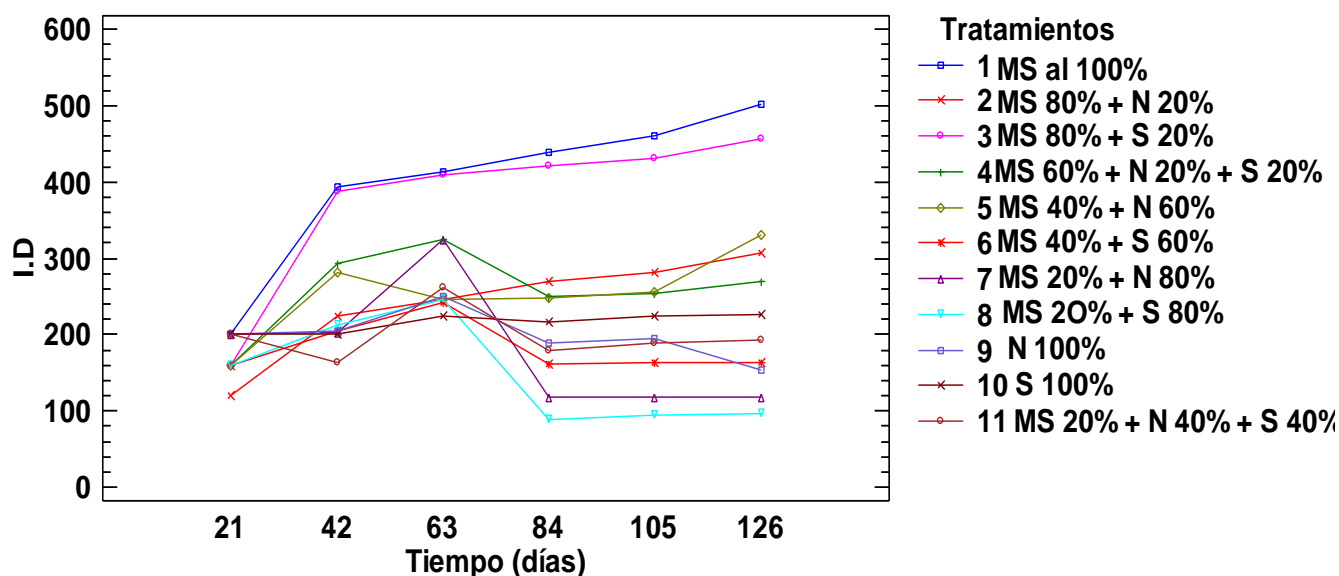


Figura 15.- Desarrollo de las semillas de *Epidendrum radicans* en los once tratamientos durante su germinación *in vitro*.

8.4 Estadios de desarrollo presentes en cada tratamiento a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*

8.4.1 Protocormos o estadio 3

Para este estadio el análisis estadístico se aplicó en tres de los once tratamientos, estos fueron el T7 (MS 20%+N 80%), T9 (N 100%) y T10 (S 100%), en los cuales únicamente se mantuvo la presencia de protocormos, donde resultó que el valor-P es menor que 0.05, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los tres Tratamientos, con un nivel del 95.0% de confianza (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza del porcentaje de protocormos o estadio 3 presentes en tres tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 1653.33 | 2 | 826.667 | 24.80 | 0.0388 |
| Intra grupos | 66.6667 | 2 | 33.3333 | | |
| Total (Corr.) | 1720.0 | 4 | | | |

En la figura 16 se observa que en el tratamiento 7 (MS 20%+ N 80%) se presentó el mayor porcentaje de protocormos o estadio tres, a los 126 días de cultivo con un 96%, resultando diferente estadísticamente a los tratamientos 9 (N 100%) y 10 (S 100%) donde el porcentaje de protocormos fue de 40% y 56.6% respectivamente.

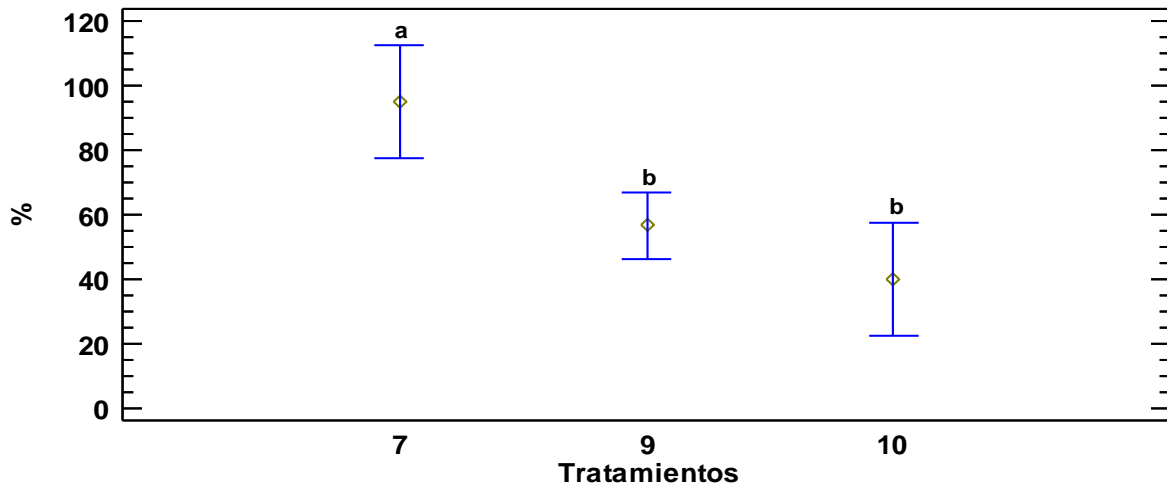


Figura 16.- Protocormos o estadio 3 en tres de los once tratamientos durante la germinación in vitro de *Epidendrum radicans* a los 126 días de cultivo T7 (MS 20%+ N 80%), T9 (N 100%) y T10 (S 100%)

8.4.2 Protocormos con primordio foliar o estadio 4

Para este estadio el análisis estadístico se aplicó en cinco de los once tratamientos, el T1 (MS 100%), T3 (MS 80%+S 20%), T4 (MS 60%+N 20%+S 20%), T5 (MS 40%+N 60%) y T11 (MS 20%+N 40%+S 40%), en los cuales únicamente se mantuvo la presencia de protocormos con primordio foliar, mostrando que el valor-P es mayor que 0.05, lo que indica que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre estos cinco tratamientos, con un nivel del 95.0% de confianza (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza del porcentaje de protocormos con primordio foliar o estadio 4 presentes en cinco tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 2067.98 | 4 | 516.995 | 0.87 | 0.5215 |
| Intra grupos | 4751.25 | 8 | 593.906 | | |
| Total (Corr.) | 6819.23 | 12 | | | |

A pesar de que no existieron diferencias estadísticamente significativas, se muestra en la figura 17 que los tratamientos T3 (MS 80%+ S20%) T4 (MS 60% + N 20% + S 20%) y T5 (MS 40% + N 60%) presentaron el mayor porcentaje promedio de protocormos con primordio foliar o estadio 4 con 58.75%, 60% y 62.5% respectivamente; mientras que en los T1 (MS 100%) y T11 (MS 20%+ N 40%+ S 40%) el porcentaje fue de 34% y 40% respectivamente (Fig. 17).

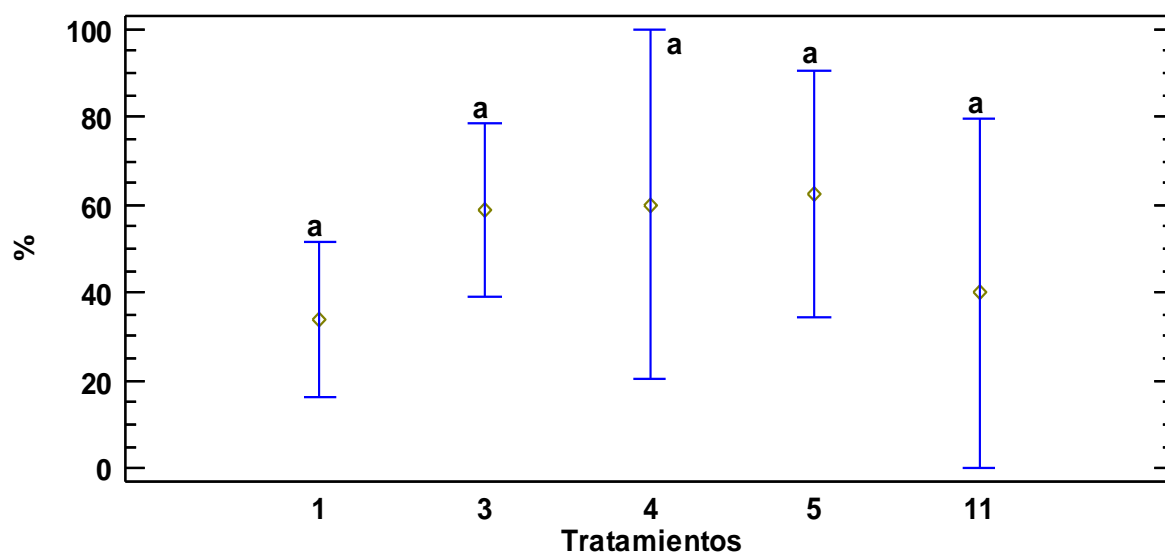


Figura 17.- Porcentaje de protocormos con primordio foliar o estadio 4 en cinco de los once tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* a los 126 días de cultivo. T1 (MS 100%), T3 (MS 80%+ S 20%), T4 (MS 60%+S 20%+ N 20%), T5 (MS 40%+ N 60%) y T11 (MS 20%+ N 40%+ S 40%).

8.4.3 Protocormo con una hoja o estadio 5

Para este estadio el análisis estadístico se aplicó en siete de los once tratamientos, el T1 (MS 100%), T2 (MS 80%+N 20%), T3 (MS 80%+S 20%), T4 (MS 60%+N 20%+S 20%), T5 (MS 40%+N 60%), T6 (MS 40%+S 60%) y T11 (MS 20%+N 40%+S 40%), en los cuales únicamente se mantuvo la presencia de protocormo con una hoja, mostrando que el valor-P es mayor que 0.05, lo que muestra que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre estos siete tratamientos, con un nivel del 95.0% de confianza (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza de los porcentajes protocormos con una hoja o estadio 5 presentes en los siete tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 2145.44 | 6 | 357.574 | 1.58 | 0.2480 |
| Intra grupos | 2257.5 | 10 | 225.75 | | |
| Total (Corr.) | 4402.94 | 16 | | | |

Se observa en la figura 18 que el mayor porcentaje de protocormos con una hoja o estadio 5 fue de 34% para el tratamiento T1 (MS 100%) y de 40% para los tratamientos T2 (MS 80 + N20%) y T11 (MS 20%+ N40% + S40%). Los porcentajes de 27.5%, 12.5% y 25% obtenidos en los tratamientos T3 (MS 80% + S20%), T4 (MS 60% + N20% + S20%) y T5 (MS 40% + N60%) respectivamente, resultaron estadísticamente iguales a los dos tratamientos anteriores, pero diferentes al porcentaje del tratamiento T6 (MS40%+S60%) con 3% de protocormos con una hoja.

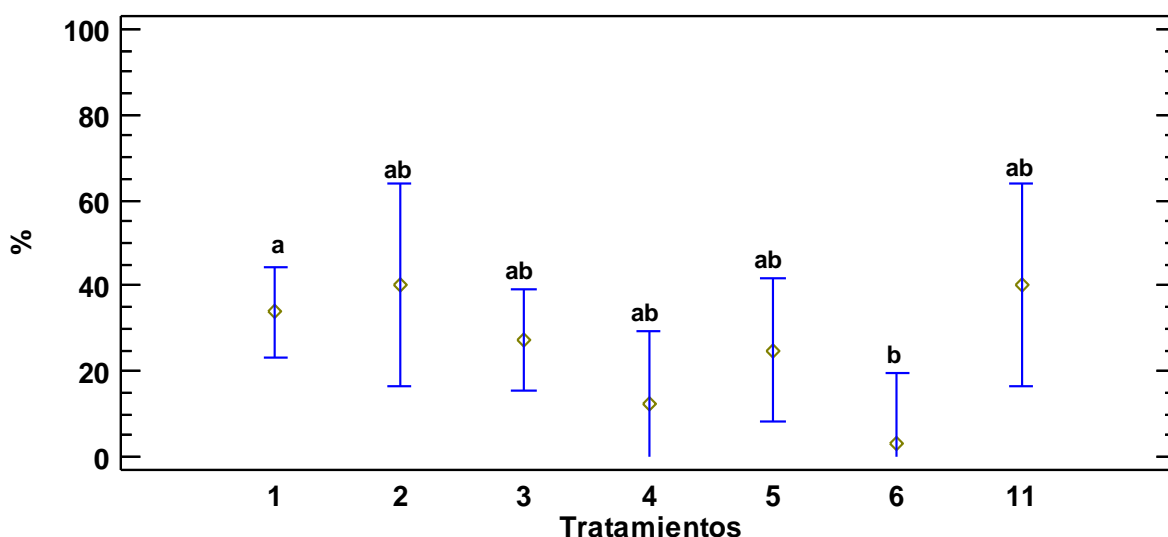


Figura 18.- Protocormos con hoja o estadio 5 en siete de los once tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* a los 126 días de cultivo T1 (MS 100%), T2 (MS 80%+ N 20%), T3 (MS 80%+ S 20%), T4 (MS 60%+S 20%+ N 20%), T5 (MS 40%+ N 60%), T6 (MS 40%+ N 60%) y T11 (MS 20%+ N 40%+ S 40%).

8.4.4 Protocormo con dos hojas o estadio 6

Para este estadio el análisis estadístico se aplicó en ocho de los once tratamientos, T1 (MS 100%), T2 (MS 80%+N 20%), T3 (MS 80%+S 20%) T4 (MS 60%+N 20%+S 20%), T5 (MS 40%+N 60%), T6 (MS 40%+S 60%), T8 (MS 20% +S 80%) y T11 (MS 20%+N 40%+S 40%) en los cuales únicamente se mantuvo la presencia de protocormo con dos hojas, mostrando que el valor-P es menor que 0.05, resultando diferencias estadísticamente significativas entre estos tratamientos, con un nivel del 95.0% de confianza (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza de los porcentajes de protocormos con dos hojas o estadio 6 presentes en ocho tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 2665.66 | 7 | 380.808 | 2.96 | 0.0370 |
| Intra grupos | 1932.08 | 15 | 128.806 | | |
| Total (Corr.) | 4597.74 | 22 | | | |

En la figura 19 se observa que el mayor porcentaje de protocormos con dos hojas o estadio 6 fue de 32% y 38.3% para los tratamiento T1 (MS 100%) y T2 (MS 80% + N 20%) respectivamente, estos porcentajes fueron estadísticamente iguales entre ellos, pero diferentes estadísticamente a los tratamientos T3 (MS 80% + S 20%) con 18.7%, el T4 (MS 60% + N 20% + S 20%) con 16.6%, el T8 (MS 20% + S 80%) y el T11 (MS 20% + N 40% + S 40%) ambos con 20%, estos últimos cuatro tratamientos resultaron iguales estadísticamente entre ellos pero iguales a los tratamientos T5 (MS 40% + N 60%) y T6 (MS 40% + S 60%) con 10% y 2% de protocormos en estadio 6. Los tratamientos T8 (MS 20% + S 80%) y el T11 (MS 20% + N 40% + S 40%) ambos con 20%, resultaron estadísticamente iguales a los demás tratamientos.

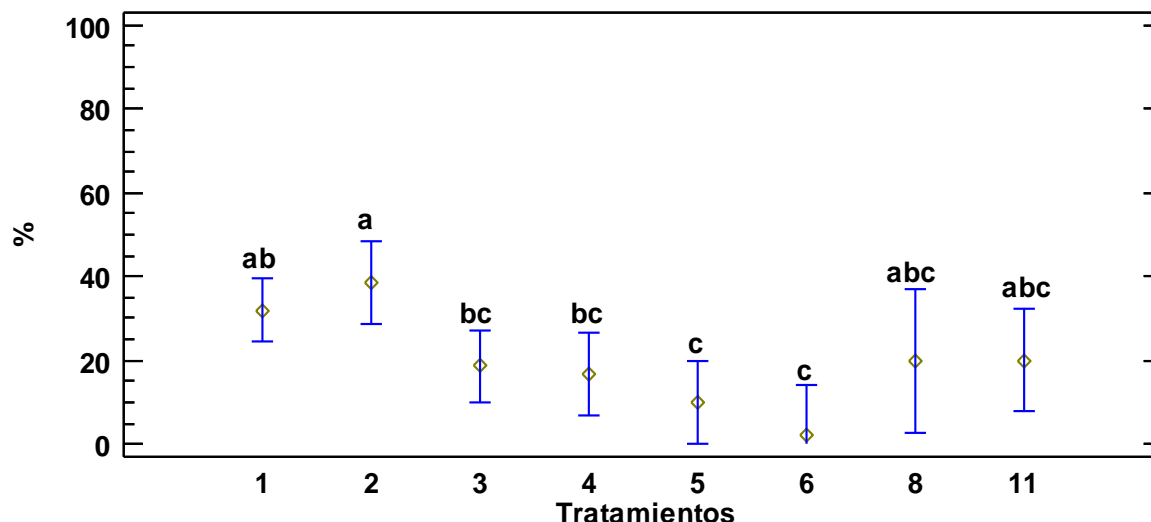


Figura 19.- Protocormo con dos hojas o estadio 6 en ocho de los once tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* a los 126 días de cultivo T1 (MS 100%), T2 (MS 80%+ N 20%) T3 (MS 80%+ S 20%), T4 (MS 60%+S 20%+ N 20%), T5 (MS 40%+ N 60%), T6 (MS 40%+ N 60%), T8 (MS 20%+ S 80%) y T11 (MS 20%+ N 40%+ S 40%).

8.5 Desarrollo de Plántulas

8.5.1 Altura de las plántulas

El análisis estadístico de la altura de las plántulas de *Epidendrum radicans*, mostro que existieron diferencias significativas en el tiempo de cultivo en los tratamientos y entre sus interacciones, puesto que sus valores-P son menores que 0.05. Estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la altura de la plántula con un 95.0% de nivel de confianza (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza para la Altura (cm) de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 466.056 | 2 | 233.028 | 173.68 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 76.9159 | 5 | 15.3832 | 11.47 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 28.4713 | 10 | 2.84713 | 2.12 | 0.0223 |
| RESIDUOS | 458.866 | 342 | 1.34171 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 1030.31 | 359 | | | |

En la figura 20 se observa que las plántulas de *Epidendrum radicans* alcanzaron la mayor altura (4.87 cm) a los 80 días de cultivo y fue diferente estadísticamente a los tiempos de cultivo anteriores (inicial y de 40 días), los valores indican que las plántulas incrementaron la talla promedio en 2.86 cm, desde el tiempo cero hasta los 80 días.

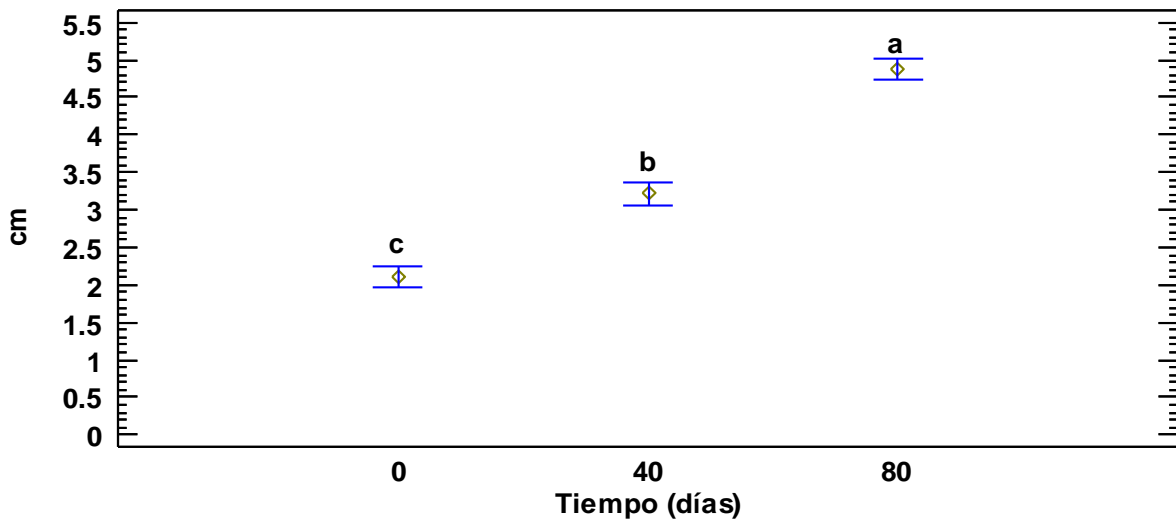


Figura 20.- Altura de las plántulas de *Epidendrum radicans* a través del tiempo de cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

La altura obtenida para las plántulas en cada uno de los tratamientos, independientemente del tiempo de cultivo, se observa en la figura 20. La mayor altura con 4 cm, se alcanzó en el tratamiento 3 (MS 80%+ S20%+C), resultando diferente estadísticamente al resto de los tratamientos. Las alturas de las plántulas 3.57 cm, 3.58 cm y 3.55 cm obtenidos en los tratamientos T1 (MS100%+C), T2 (MS80%+N20%+C) y T4 (MS60%+N20+S20%+C) respectivamente, resultaron estadísticamente iguales entre ellos pero diferentes estadísticamente a la altura de las plántulas de los tratamientos T5 (N 100%+C) con 2.53 cm y T6 (S 100%+C) con 3.11 cm (Fig. 21).

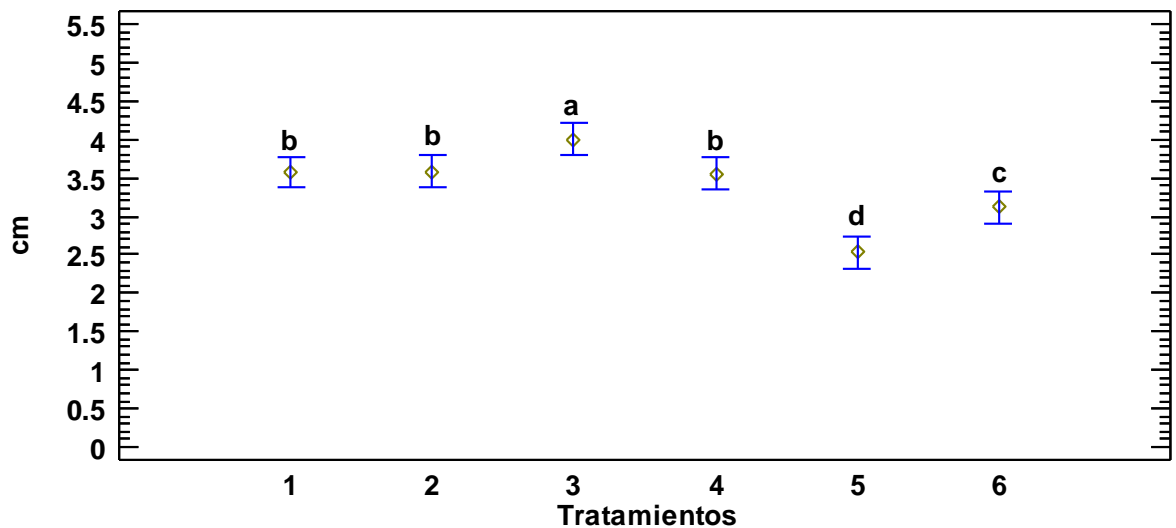


Figura 21.- Altura de las plántulas de *Epidendrum radicans* en los tratamientos, independiente del tiempo de cultivo T1= MS 100%, T2= MS 80% + N 20%, T3= MS 80% + S 20%, T4= MS 60% + N 20% + S 20%, T5= N 100% y T6= S 100%.

En la figura 22 se observan los tiempos de evaluación de la altura de las plántulas de *Epidendrum radicans* en los diferentes tratamientos, para el tiempo inicial se tomaron plántulas con un rango de altura entre 1.85 y 2.42 cm (altura promedio de 2.13 cm) A los 40 días se incrementó la talla de las plántulas 1.48 cm, obteniendo plántulas de 3.90 cm en el tratamiento T3 (MS 80% + S 20%). En los tratamientos T2 (MS 80% + N 20%), T1 (MS 100%) y T4 (MS 60% + S 20% + N 20%), las plántulas alcanzaron menor altura que resultado de 3.6 cm, 3.38 cm y 3.24 cm

respectivamente. Seguido por el tratamiento T6 (S 100%) con 2.82 cm y la menor altura de las plántulas se registró en el tratamiento T5 con 2.32 cm. A los 80 días las plántulas alcanzaron una altura de 5.68 cm en el tratamiento T3 (MS 80%+ S 20%), superando a los tratamientos T2 (MS 80%+ S 20%) con 5.3 cm, T4 (MS 60% + S 20%+ N 20%) con 5.22 cm, T1 (MS 100%) con 5.1 cm y T6 (S 100%) con 4.56 cm. Las plántulas de *Epidendrum radicans* en el tratamiento T5 (N 100%); aun cuando, la altura se incrementó 1.43 cm fueron las que menor altura alcanzaron, con 3.35 cm.

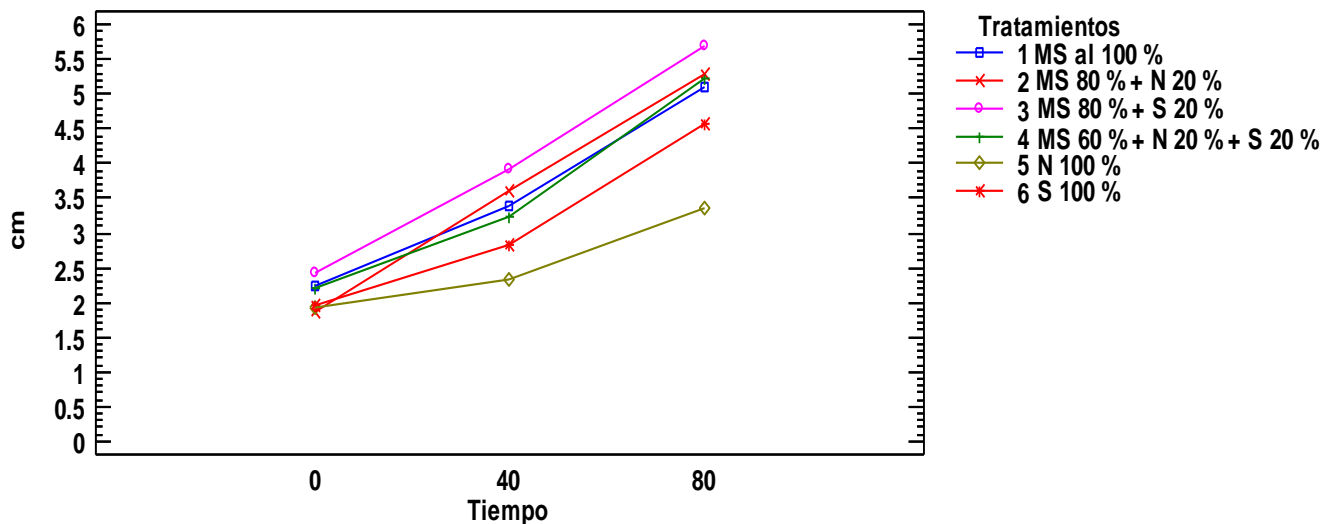


Figura 22.– Efecto de los tratamientos sobre la altura de plántulas de *Epidendrum radicans* a través del tiempo de cultivo *in vitro*.

8.5.2 Número de hojas

El análisis estadístico para el número de hojas de *Epidendrum radicans* mostró diferencias significativas en el tiempo de cultivo, en los tratamientos y entre sus interacciones puesto que sus valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el número de hojas con un 95.0% de nivel de confianza (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de varianza para incremento en el número de hojas de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 206.022 | 2 | 103.011 | 67.35 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 167.822 | 5 | 33.5644 | 21.94 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 36.2111 | 10 | 3.62111 | 2.37 | 0.0102 |
| RESIDUOS | 523.1 | 342 | 1.52953 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 933.156 | 359 | | | |

En la figura 23 se observa que el mayor número de hojas en promedio (5.18) y diferente estadísticamente a los tiempos de cultivo anteriores (inicial y a los 40 días) se alcanzó en las plántulas de *Epidendrum radicans* a los 80 días de cultivo independientemente de los tratamientos los valores indican que las plántulas incrementaron el número de hojas con un promedio 1.83, desde el tiempo cero hasta los 80 días.

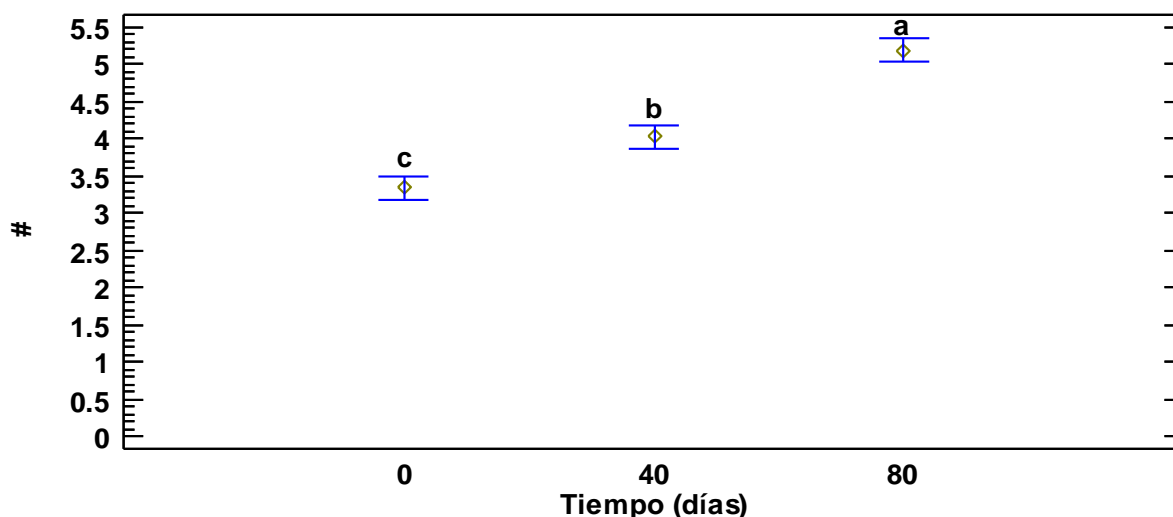


Figura 23.- Generación de hojas en plántulas de *Epidendrum radicans* a través del tiempo de cultivo *in vitro*, independientemente de los tratamientos empleados.

En el caso del efecto de los tratamientos sobre el número de hojas en plántulas de *Epidendrum radicans*, independientemente del tiempo de cultivo, se observa en la figura 18 que el mayor número de hojas fue de 4.9, y 4.8 para los tratamientos T1 (MS 100%), y T3 (MS 80% + S 20%) respectivamente y resultaron estadísticamente iguales entre sí y con el tratamiento T2 (MS 80% + N 20%) con 4.5 hojas. En el tratamiento T4 (MS 60% + N 20% + S 20%) el número de hojas fue 4.2 y resultando diferente estadísticamente a los tratamientos T5 (N 100%) y T6 (S 100%) con 3.1 y 3.4 hojas, estos últimos dos tratamientos resultaron iguales estadísticamente entre sí (Fig. 24).

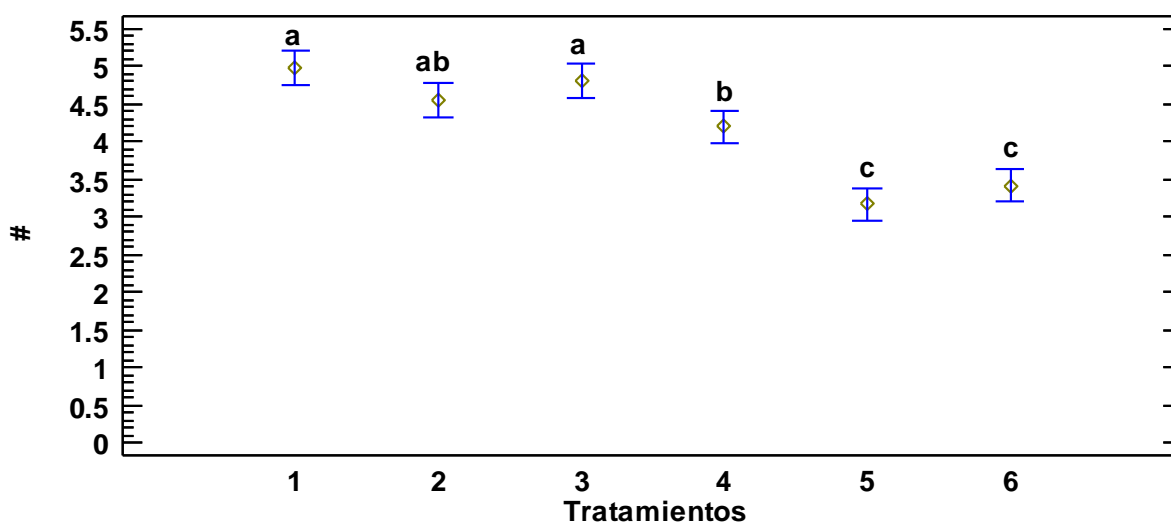


Figura 24.- Generación de hojas de *Epidendrum radicans* en los tratamientos, independientemente del tiempo de cultivo T1= MS 100%, T2= MS 80% + N 20%, T3= MS 80% + S 20%, T4= MS 60% + N 20% + S 20%, T5= N 100% y T6= S 100%.

En la figura 25 se observan los tiempos de evaluación del número de hojas de *Epidendrum radicans*, para cada tratamiento. En el tiempo inicial se eligieron plántulas con número de hojas promedio de 3.2 para cada tratamiento. A los 40 días de cultivo el mayor número de hojas con 5.15

fue para el tratamiento T1 (MS 100%), en los tratamiento T3 (MS 80%+ S 20%) con 4.6 seguido por el tratamiento T2 (MS 80%+ N 20%) con 4.4 y T4 (MS 60%+ S 20%+ N 20%) con 3.9 hojas, para los tratamientos T5 (N 100%) con 2.9 y T6 (S 100%) con 3.2, fueron los tratamientos con el menor número de hojas.

Finalmente, a los 80 días el mayor número de hojas con un promedio de 6.2 fue para el tratamiento T3 (MS 80% + S 20%), seguido por el tratamiento T1 (MS 100%) con 6.1, T2 (MS 80%+ N 20%) con 5.6 y T4 (MS 60%+ S 20%+ N 20%) con 5.4, el menor número de hojas se desarrollaron en los tratamientos T5 (N 100%) y T6 (S 100%) con 3.9 y 3.8 respectivamente (Fig. 25).

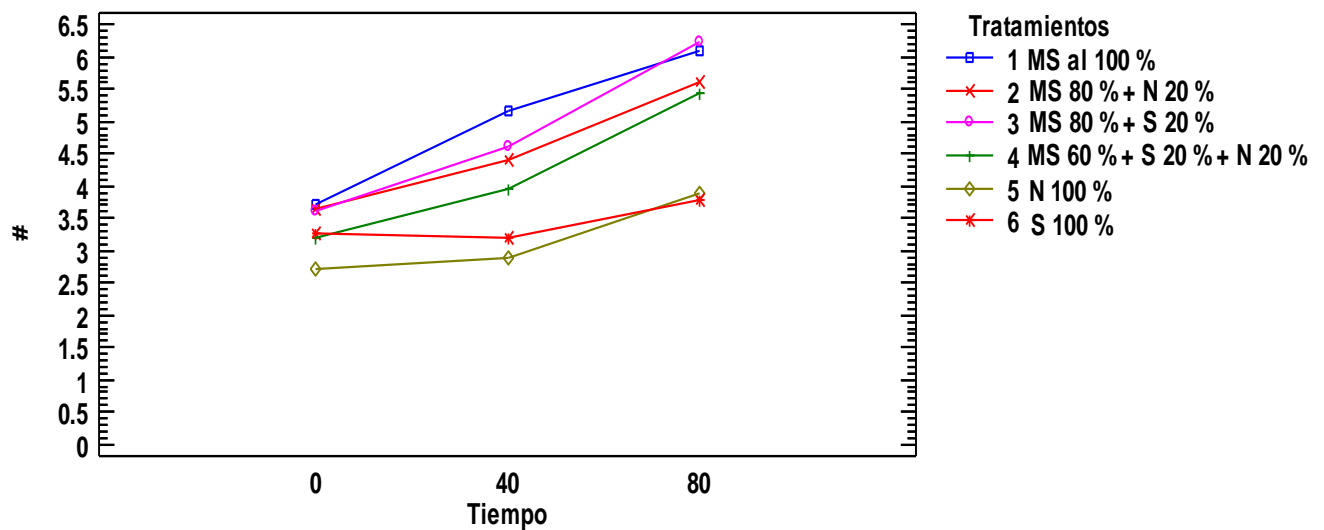


Figura 25.- Comportamiento del número de hojas de *Epidendrum radicans* a través del tiempo en los seis tratamientos empleados.

8.5.3 Número de raíces

El análisis estadístico para el número de raíces de *Epidendrum radicans*, mostró que existieron diferencias significativas en el tiempo de cultivo y en los tratamientos, puesto que sus valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el número de raíces con un 95.0% de nivel de confianza (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza para el número de raíces de las plántulas *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 321.217 | 2 | 160.608 | 101.19 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 38.6667 | 5 | 7.73333 | 4.87 | 0.0003 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 15.7167 | 10 | 1.57167 | 0.99 | 0.4515 |
| RESIDUOS | 542.8 | 342 | 1.58713 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 918.4 | 359 | | | |

En la figura 26 se observa que las plántulas de *Epidendrum radicans* desarrollaron el mayor número de raíces (4.34) a los 80 días de cultivo, independientemente de los tratamientos, y resultó ser diferente significativamente a los tiempos anteriores de cultivo (inicial y 40 días). Los valores indican que las plántulas incrementaron en promedio de 2.31 raíces desde el tiempo cero hasta los 80 días de cultivo.

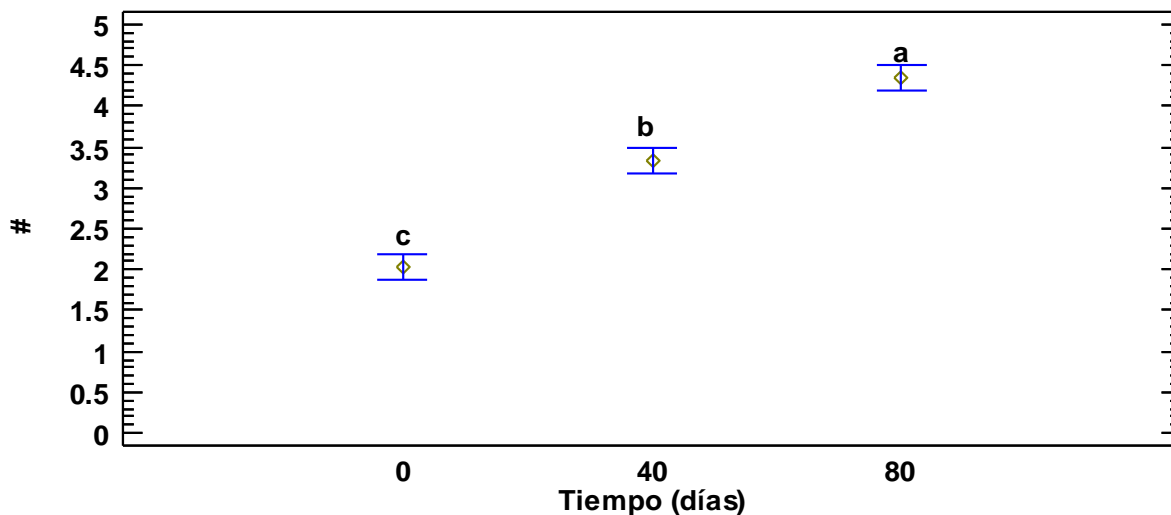


Figura 26.- Generación de raíces de *Epidendrum radicans* a través del tiempo de cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

Las plántulas con el mayor número de raíces con 3.6, independientemente del tiempo de cultivo, se indujo en el tratamiento T1 (MS 100%) que resultó estadísticamente igual a los tratamientos T2 (MS80%+N20%) con 3.4 raíces, T3 (MS80%+S20%) con 3.4 raíces y T4 (MS60%+N20+S20%) con 3.2 raíces. Mientras que el número de raíces en el tratamiento T6 (S100%) con 3.0 raíces resultó significativamente igual a los tres tratamientos anteriores. Las plántulas con menor número de raíces, con 2.6, y diferente estadísticamente fue en el tratamiento T5 (N 100%) (Fig. 27).

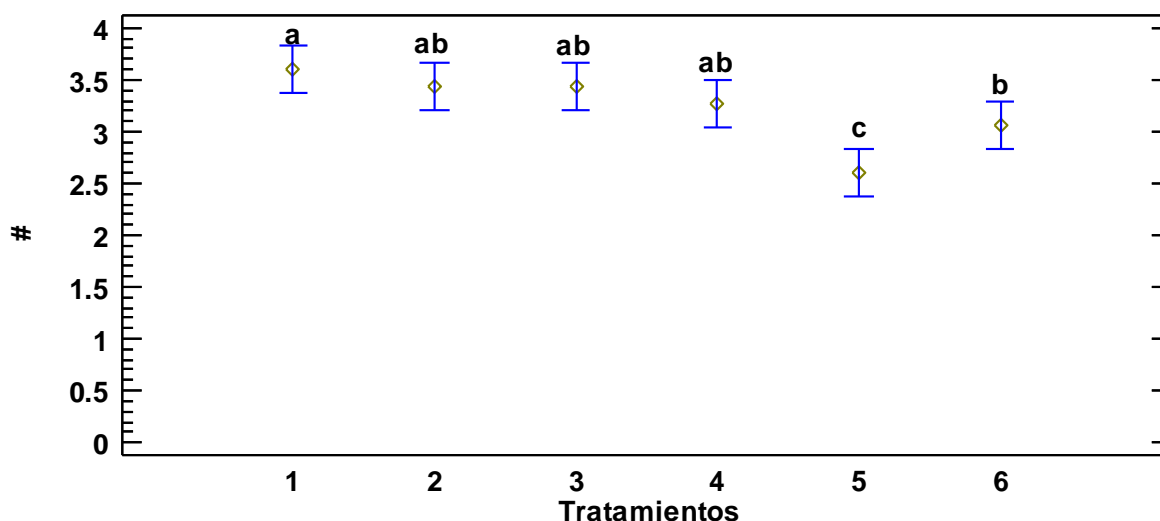


Figura 27.- Generación de raíces de *Epidendrum radicans* en los tratamientos, independientemente del tiempo de cultivo T1= MS 100%, T2= MS 80% + N 20%, T3= MS 80% + S 20%, T4= MS 60% + N 20% + S 20%, T5= N 100% y T6= S 100%.

En la figura 28 se muestra el número promedio de raíces desarrolladas en las plántulas de *Epidendrum radicans*, a través del tiempo y en cada uno de los tratamientos empleados. Las plántulas seleccionadas para iniciar el cultivo presentaron un número de raíces entre 1.65 a 2.45 para todos los tratamientos (resultando el número promedio de raíces de 2.0). Después de 40 días de cultivo este número se incrementó a 3.5 en todos los tratamientos excepto en el tratamiento T5 (N 100%) con 2.8 raíces. Finalmente, a los 80 días el mayor número de raíces fue de 5.0, en el tratamiento T1 (MS 100%) seguido por los tratamientos T4 (MS 60% + S 20% + N 20%) con 4.7 raíces, T3 (MS 80%+S 20%) con 4.55 raíces y T2 (MS 80%+ N 20%) con 4.5 raíces. En donde se indujo el menor número de raíces con 3.8 y 3.5 fue para los tratamientos T6 (S 100%) y T5 (N 100%) respectivamente.

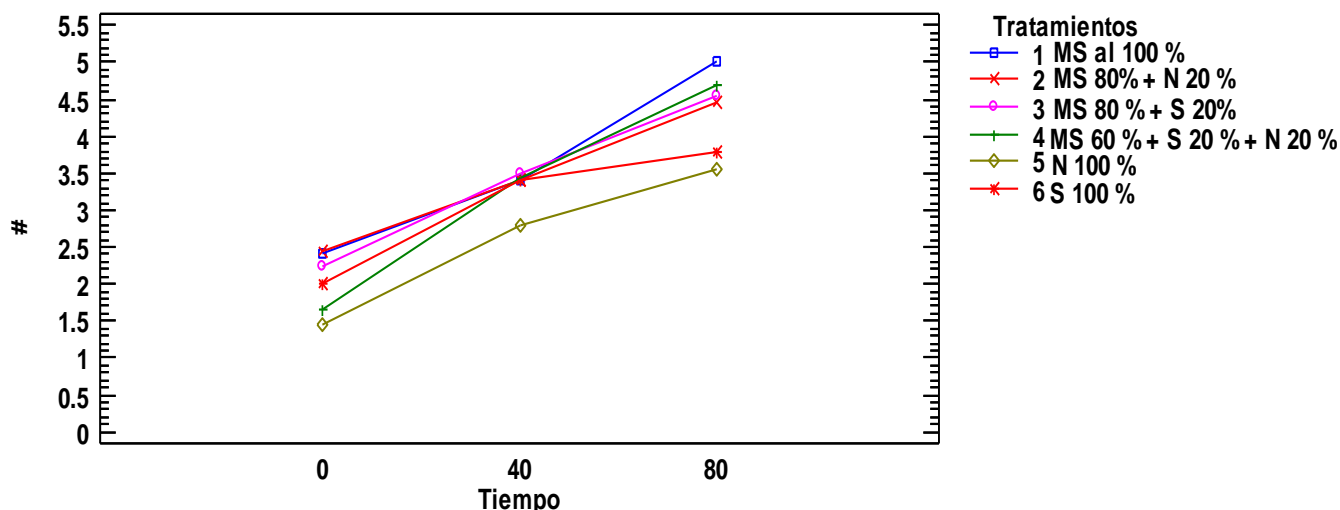


Figura 28.- Comportamiento del número de raíces de *Epidendrum radicans* a través del tiempo en los seis tratamientos empleados.-

8.5.4 Longitud de la raíz

El análisis estadístico para la longitud de raíces de *Epidendrum radicans* mostró que existieron diferencias significativas en el tiempo de cultivo, en los tratamientos y entre sus interacciones, puesto que sus valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la longitud de raíz verde de 95.0% de nivel de confianza (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de varianza para la longitud de la raíz más larga de las plántulas *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 303.657 | 2 | 151.829 | 192.75 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 30.6516 | 5 | 6.13032 | 7.78 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 27.7225 | 10 | 2.77225 | 3.52 | 0.0002 |
| RESIDUOS | 269.398 | 342 | 0.787715 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 631.43 | 359 | | | |

En la figura 29 se observa que las raíces de las plántulas de *Epidendrum radicans* desarrollaron la mayor longitud de raíz (3.27) a los 80 días de cultivo, independientemente de los tratamientos, y resultado diferente estadísticamente a los tiempos de cultivo anteriores (inicial y de 40 días). Los valores indican que las plántulas incrementaron la longitud de la raíz con un promedio 2.19 desde el tiempo cero hasta los 80 días de cultivo.

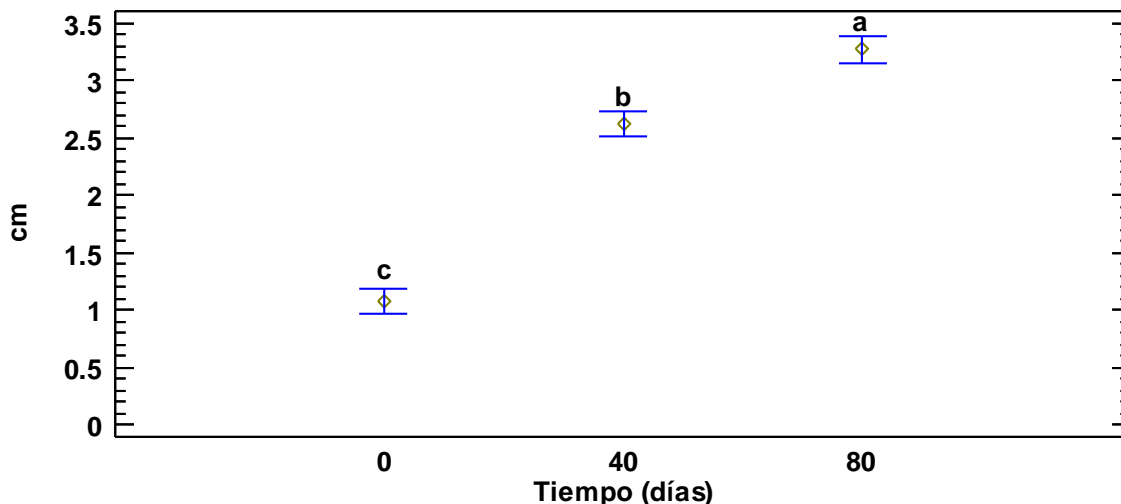


Figura 29.- Longitud de la raíz de las plántulas de *Epidendrum radicans* a través del tiempo de cultivo independientemente de los tratamientos empleados.

Las plántulas de *Epidendrum radicans* con mayor longitud de raíces, 2.82 cm independientemente del tiempo de cultivo, se indujo en el tratamiento T6 (S 100%), este valor resulto estadísticamente igual al obtenido en el tratamiento T5 (N 100%) con 2.51 cm. La longitud promedio de las raíces en el T5 también resulto estadísticamente igual a las obtenidas en el tratamiento T4 (MS 60% + S 20% + N 20%) con 2.43 cm. Mientras que las obtenidas en los tratamientos T1 (MS100%), T2 (MS 80% + N 20%) y T3 (MS 80% + S 20%), resultaron estadísticamente iguales entre sí y con una longitud menor como son 2.09 cm, 1.98 cm y 2.10 cm respectivamente (Fig. 30).

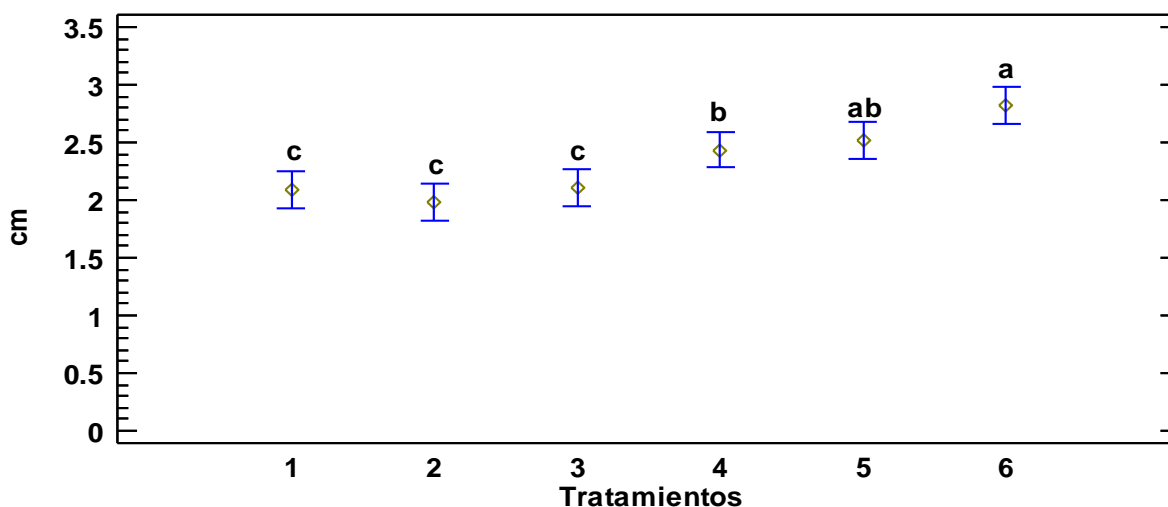


Figura 30.- Longitud de la raíz de las plántulas *Epidendrum radicans*, en los tratamientos, independientemente del tiempo de cultivo T1= MS 100%, T2= MS 80% + N 20%, T3= MS 80% + S 20%, T4= MS 60% + N 20% + S 20%, T5= N 100% y T6= S 100%.

En la figura 31 se observa el crecimiento de las raíces de *Epidendrum radicans* a través del tiempo de cultivo para cada uno de los tratamientos empleados. Las plántulas seleccionadas para iniciar el cultivo presentaron una longitud de raíces 0.74 cm a 1.29 cm para todos los tratamientos resultando la (longitud promedio de raíces de 1.0 cm). Después de 40 días de cultivo, esta longitud se incrementó 3.53 cm, el tratamiento T6 (S 100%), seguido por los tratamientos T5 (N 100%) con raíces de 2.99 cm de longitud y T4 (MS 60%+ S 20% + N 20%) con 2.85 cm. La menor longitud de las raíces se registró en el tratamiento T2 (MS 80%+N 20%) con 2.01 cm incrementándose mínimamente en los tratamientos T1 (MS 100%) con 2.17 cm y T3 (MS 80%+ S 20%) con 2.19 cm. Finalmente a los 80 días, la mayor longitud de raíces fue de 3.8 cm para el tratamiento T5 (N 100%), seguido del tratamiento T6 (S 100%) con 3.66 cm, el tratamiento T4 (MS 60%+ S 20%+ N 20%) con 3.47 cm. Mientras que las raíces con una longitud menor en los tratamientos T3 (MS 80%+ S 20%) con 3.0 cm, T2 (MS 80%+ N 20%) con 2.82 y T1 (MS 100%) con 2.82 en ambos.

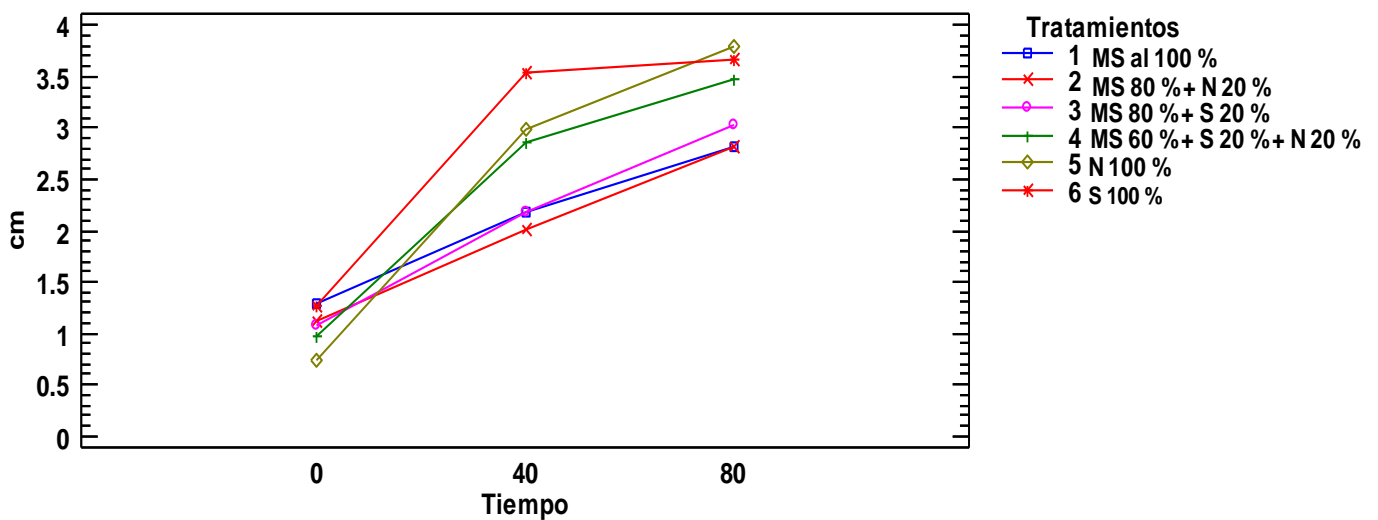


Figura 31.- Comportamiento de la longitud de la raíz de *Epidendrum radicans* a través del tiempo en los seis tratamientos empleados.

IX. DISCUSION.

En la germinación de las semillas de orquídeas, se ha comprobado que no siempre es factible elaborar un medio en el que una determinada especie de orquídea pueda germinar y desarrollarse, por lo que se han descrito muchos medios nutritivos, para géneros y especies diferentes Arditti y Ernst (1993).

El tiempo de germinación de las semillas de *Epidendrum radicans* fue a los 21 días, desde la siembra hasta el primer inicio de la misma, consistió en el hinchamiento del embrión y su cambio a color verde, contrastando con lo descrito por Suárez-Quijada *et al.*, (2007) quienes estudiaron y reportaron la germinación de semillas de *Euchile mariae* procedentes de cápsulas inmaduras a los 15 días después de la siembra y también con lo publicado por Flores *et al.*, (2008) que reportaron la germinación *Oncidium stramineum* a los 17 días de haber sido sembradas en el medio de cultivo; Ruíz *et al.*, (2008), obtuvieron la germinación de semillas de *Encyclia adenocaula* a los 27 días y Rodríguez (2013) obtuvo la germinación de *Epidendrum radicans* a los 14 días de haber sido cultivadas, lo reportado por estos autores, muestra que la germinación de *Epidendrum radicans* está dentro de un rango entre 15 y 27 días después de haber sido sembradas.

Al adicionar las sales basales del medio MS con reguladores del crecimiento vegetal o algún otro componente se incrementa el porcentaje de germinación en algunas especies de orquídeas. Ávila-Díaz *et al.* (2009) reportaron la germinación de semillas de *Laelia speciosa*, 90 días posterior a su siembra en medio MS 100% adicionado con citocininas y en condiciones de luz.

A los 21 días de haber sido sembradas las semillas de *Epidendrum radicans* se obtuvo el 100% de germinación en todos los tratamientos empleados tanto en MS 100% y con infusiones de sábila y nopal, esto concuerda con lo obtenido por Ávila-Díaz y Salgado (2006) quienes reportaron 100 % de germinación a los 30 y 45 días en medio MS adicionado con 0.05 gL⁻¹ de N6-benciladenina (BA) en diferentes especies de orquídeas. Muñoz-Barrionuevo (2011), reportó para *Epidendrum jamaisonic*, el 99% de germinación a los 90 días de cultivo en el medio MS (Murashige & Skoog) adicionado con 8 gL⁻¹ de carbón activado, en contraste con lo publicado por Schneiders *et al.*, (2012) reportaron 45% de germinación para *Cattleya forbesii* en el medio MS y 90% para *Cattleya harrisoniana* en MS adicionado con 2.5 gL⁻¹ de carbón activado, a los 30 días de cultivo. Rodríguez (2013), reporta que para semillas de *Epidendrum radicans* el máximo porcentaje de germinación fue de 96% en el medio Superthrive® a los 35 días de cultivo. En el presente trabajo se obtuvo la germinación del 100% de *Epidendrum radicans* en menor tiempo de acuerdo con lo que reportaron los anteriores autores.

Santos *et al.*, (2005), concluyeron que para *Laelia albida* su porcentaje de germinación estuvo entre 75 y 85% al utilizar el medio KC (knudson C), suplementado con extracto de papa, a los 24 días después de la siembra.

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

Se ha reportado que la adición de varias vitaminas al medio de cultivo promueve la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas de *Cymbidium elegans* y *Coelogyne*

punctulata (Sharma *et al.*, 1991). Hossain (2008) reportó el máximo porcentaje de germinación de las semillas de *Epidendrum ibaguense* en el medio Mitra enriquecido con diferentes vitaminas; lo que concuerda para *Epidendrum radicans* que, al emplear el medio MS, suplementado con vitaminas, hizo que se promoviera el inicio de la germinación por la adición de tiamina, niacina y piridoxina.

Los embriones de *Epidendrum radicans*, mostraron a los 21 días después de la siembra una coloración verde debido a la presencia de clorofila, en los 11 tratamientos empleados. Contrario a lo que reporta Rodríguez (2013), para *Epidendrum radicans* que a los 7 días después de la siembra, obtuvo la coloración verde, en los 12 tratamientos empleados, excepto en los tratamientos con Superthrive®, Superthrive® adicionado con carbón activado y Humus. Potisek *et al.*, (1994), reportan que para *Epidendrum stamfordianum*, obtuvieron la coloración de verde a los 27 días después de la siembra, en el medio de cultivo MS. Oblaidul *et al.*, (2000) señalan que los embriones de semillas cultivadas *in vitro* de un híbrido de *Cattleya walkeriana* adquirieron un color verde a los 20 días. De la Cruz-Rodríguez (2006), reporta que los embriones de *Prosthechea vitellina* evidenciaron la presencia de clorofilas a los 10 días de haber iniciado el cultivo *in vitro*.

El periodo de embrión hinchado a protocormo en *Epidendrum radicans* sucedió a los 42 días de haber iniciado el cultivo en los tratamientos MS al 20% adicionado con nopal y sábila y en los medios nopal al 100% y sábila al 100% difiriendo de los resultados obtenidos por Santos *et al.*, (2005); quienes reportan que a los 46 días de haber realizado la siembra de semillas de *Laelia albida*, obtuvieron el estadio de protocormos (E3), en el medio KC suplementado con extracto de papa: en contraste con lo publicado por Rodríguez (2013), quien observo este cambio a los 14 días de haber iniciado el cultivo, en los medios de cultivo Mitra y KM adicionados con carbón activado y KM adicionado con peptona.

El cambio de fase de protocormo a protocormo con primordio foliar (E4) en *Epidendrum radicans* se obtuvo a partir de los 42 días de haber realizado la siembra en los tratamientos que contenían el mayor porcentaje de sales basales, adicionado con los extractos de nopal y sábila, esto concuerda con lo publicado por López-Roberts *et al.*, (2007) obtuvieron en *Epidendrum sp.*, después de 42 días de cultivo, el estadio de protocormo con primordio foliar (E4) en los medios de cultivo MS y KC adicionado con 15% de leche de coco, contrastando con los resultados de Potisek *et al.*, (1994) obtuvieron este estadio en *Epidendrum stamfordianum* a los 57 días de cultivo en el medio MS. Rodríguez (2013) reporta que obtuvo este estadio a los 28 días de iniciada la siembra, en los medios de cultivo KM adicionados con carbón activado y KM adicionado con peptona.

Rodríguez (2013) observó en *Epidendrum radicans* que la primera hoja verdadera se desarrolló a los 42 días de cultivo en el medio KM adicionado con carbón activado, contrastando con los resultados obtenidos para *Epidendrum radicans*, ya que, dicho estadio se obtuvo a los 63 días de cultivo en los tratamientos que contenían MS a diferentes concentraciones adicionados con los extractos de nopal y sábila. De la Cruz-Rodríguez (2006), observó la aparición de la primera hoja verdadera (E5) en *Prosthechea vitellina* hasta los 150 días, a diferencia de *Encyclia tampensis* en la que se reporta la aparición de la primera hoja a los 90 días (Zettler *et al.*, 1999)

Rodríguez (2013), reporta que el estadio de planta completa (E6) en *Epidendrum radicans* lo obtuvo a los 56 días de cultivo en el medio KM suplementado con carbón activado, difiriendo con los resultados obtenidos en este estudio ya que en *Epidendrum radicans* se logró a los 84 días de cultivo en los tratamientos MS al 100% y MS 80% adicionado con nopal y sábila, por otra parte Potisek *et al.*, (1994) reportaron para *Epidendrum stamfordianum* la planta completa (E6) a los 130 días de cultivo en el medio MS.

La velocidad de cambio en la morfogénesis de manera general de un estadio al siguiente en *Epidendrum radicans* fue progresivo y rápido, siendo semillas hinchadas a los 21 días, embriones rompiendo la testa (estadio en el cuál se consideró el inicio de la germinación) a los 21 días; el cambio de un estadio al otro en general duró en promedio de 21 días. El proceso completo desde germinación de semillas hasta la plántula completa comprendió un desarrollo de morfogénesis desde los 21 a los 84 días variando el tratamiento. Con relación a esto, Harrison (1973), efectuó un estudio de la germinación de 55 especies de orquídeas encontró que el inicio de la germinación estuvo entre los 10 y 211 días y que la formación de plántulas abarcó de 61 a 724 días, lo que nos muestra que el tiempo de germinación es muy variable en cada especie.

Si bien, los tratamientos que favorecieron el desarrollo de *Epidendrum radicans* fueron con los medios de cultivo MS con mayor concentración de sales basales, 100% o 80% y esta última concentración adicionado con 20% extracto de nopal o de sábila: ya que, a los 126 días de cultivo, el mayor estadio encontrado fue el de plántula con dos hojas (E6). En los tratamientos donde los medios de cultivo fueron nopal 100% o sábila 100% ocurrió lo contrario ya que los protocormos presentaron una coloración verde claro, seguido de un color amarillento, deteniendo o retrasando así su desarrollo, y solo incrementaron su volumen por lo que el mayor estadio alcanzado en estos dos últimos tratamientos fue el de protocormo (E3). La adición de estos extractos al medio MS favorecen el desarrollo de los protocormos, a diferencia de los otros dos tratamientos sin sales basales; esto se debió a que las semillas necesitan macronutrientes y micronutrientes adicionado de vitaminas necesarios para el desarrollo; quizá estos extractos sean útiles para el desarrollo de plántulas adultas, pero en este estudio no fueron efectivos para el desarrollo de los protocormos.

Aparentemente, la necesidad elevada de nutrimentos en el cultivo *in vitro* responde al hecho de que la plántula no es capaz de asimilar eficientemente los nutrimentos disponibles en el medio de cultivo (Romero-Tirado, 2008), ya que necesita una micorriza para su adecuada asimilación de nutrientes.

En el medio de cultivo MS al 80%, adicionado con sábila al 20% se encontraron las plántulas con mayor talla para *Epidendrum radicans*, la menor altura se registró en el medio de sábila al 100% lo que se puede deducir que la sábila por sí sola no ayuda al incremento de las plántulas por su parte Rodríguez (2013), reporta que para *Epidendrum radicans* obtuvo plántulas con mayor talla en el medio de cultivo KM. Moreno y Menchaca (2007), estudiaron los efectos de compuestos orgánicos (MS adicionado con 100 gL⁻¹ de pulpa de plátano, MS adicionado con 120 mL⁻¹ de agua de coco y MS con 100 gL⁻¹ de homogenizado de plátano más 120 mL⁻¹ de agua de coco) sobre la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* y encontraron que el tratamiento sin compuestos orgánicos mostro el porcentaje más bajo, en cuanto a la altura de las plántulas. Carmona (2016) reporta que en las plántulas de *Oncidium unguiculatum* el medio MS con 60 gL⁻¹ de sacarosa mostraron un incremento notable en su altura. Rodríguez-Flores (2000), en *Paphiopedilum caudatum* obtuvieron en el medio MS agregando agua de coco y un 12% de pulpa de plátano, un incremento en la altura de las plántulas.

La hoja es una parte fundamental en las plantas ya que en esta estructura se lleva a cabo la fotosíntesis. En el presente estudio el medio de cultivo MS al 100% fue el que presento el mayor número de hojas, lo que concuerda con Hernández (2010), que obtuvo el mayor número de hojas para *Epidendrum anisatum* en el medio Murashige y Skoog suplementado con 0.5 gL⁻¹ de carbón. Rodríguez (2013), menciona que para *Epidendrum radicans*, el medio de cultivo KM fue donde se obtuvo el mayor número de hojas.

Hernández (2010) reporta que el mayor número de raíces por planta de *Epidendrum anisatum* fue en el medio Murashige y Skoog más 0.5 gL⁻¹ de carbón; concordando con los resultados obtenidos en este estudio para *Epidendrum radicans*, ya que dicho medio fue el que obtuvo el mayor número de raíces. En el caso de *Oncidium stramineum* el uso de carbón activado adicionado al medio para el desarrollo de plántulas en el medio MS, con 30 gL⁻¹ de sacarosa, 2.0 gL⁻¹ de peptona, 2.0 gL⁻¹ de extractos de manzana, plátano y jitomate, presentó un efecto positivo en el número de raíces comparado con el medio de cultivo MS con 30 g L⁻¹ de sacarosa (Flores-Escobar *et al.*, 2008).

En los medios de cultivo que no presentaron sales basales analíticas, fueron los que obtuvieron la mayor longitud de la raíz: en contraste con J6 María *et al.*, (2008) obtuvieron con diferentes concentraciones del medio Murashige & Skoog (MS), adicionando con 20 y 40 mL de extracto de *Aloe vera*, la micropropagación del plátano FIAH 18 con una respuesta fisiológica y enraizamiento excelente. Hernández (2010), señala que en *Epidendrum anisatum* obtuvo la mayor longitud de la raíz en el medio MS al 50% con la adición de 1 g L⁻¹ de carbón activado.

Massaro, *et al* (2012) reportaron que el medio de cultivo MS con la mitad de la concentración de macronutrientes fue el más apropiado para el desarrollo de plántulas de *Epidendrum secundum*.

Romero-Tirado (2007), reportan que en *Laelia anceps* que en el medio MS al 100 % y MS al 50 % favorece el desarrollo de plántulas vigorosas.

La adición de carbón activado al medio de cultivo es un método que ha sido empleado por una gran cantidad de autores (Thompson, 1989; Singh, 1993; George, 1996; Tisserat y Jones, 1999; Yang *et al*, 1999; Mckendrick, 2000) y se ha demostrado que influye positivamente en el crecimiento de las orquídeas. Como se observó con *Epidendrum radicans*, a los 80 días de haber sido individualizada, en todos medios adicionados con carbón activado. El carbón activado adicionado a los medios de cultivo es un agente químico que ejerce un control positivo de la oxidación tanto en el medio de cultivo como en el tejido vegetal, reduciendo considerablemente la pérdida de material vegetal por necrosis consecuente a la oxidación (Pedroza, 2009).

Rodríguez (2013), menciona que en el medio de cultivo Humus suplementado con carbón activado y peptona se encontraron plántulas con hojas y raíz, siendo el máximo estadio, a diferencia de los demás tratamientos con Humus, esto quizá fue en respuesta a la peptona, cabe señalar, que las plántulas obtenidas en este medio son las de menor talla y grosor por lo que se puede deducir que la combinación de estos tres elementos (fertilizante humus, carbón activado y peptona) ayudan al desarrollo de hojas y raíces pero no al crecimiento en talla de *Epidendrum radicans*.

X. CONCLUSIONES

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

El proceso de germinación de las semillas de *Epidendrum radicans* inicia a los 21 días en todos los tratamientos.

El desarrollo ontogénico de *Epidendrum radicans* comprendió seis estadios: semilla sin germinar embrión hinchado y verde, protocormo, protocormo con primordio foliar, plántula con hojas y plántula con hojas y raíz.

Los seis estadios ontogénicos se desarrollan en la mayoría de los tratamientos, en algunos más tardíamente. Excepto en los tratamientos T7 (MS 20% + N 80%), T9 (N 100%) y T10 (S 100%).

El máximo desarrollo de las semillas de *Epidendrum radicans* se dio en los tratamientos 1 (MS 100%) y 3 (MS 80% + S 20%).

Se estableció que el medio nutritivo con extractos de sábila (MS 80 + S 20%), es adecuado para la germinación asimbiótica de semillas *in vitro* de *Epidendrum radicans* ya que promovió el crecimiento de protocormos y desarrollo de las plántulas.

La adición de los extractos de sábila y nopal en el resto de los tratamientos obtuvieron resultados favorables en la germinación, pero en el desarrollo de las plántulas fue más lento comparado con los tratamientos 1 (MS 100%) y 3 (MS 80% + S 20%).

El extracto de sábila al 20% adicionado al medio MS al 80% promueve una mayor altura a las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Los medios de cultivo MS al 80%, complementado con los extractos de sábila y nopal al 20% inducen una mayor generación de hojas de *Epidendrum radicans* que el resto de los tratamientos.

El mayor número de raíces se induce en el medio de cultivo MS al 100%.

El medio de cultivo sábila al 100% indujo la mayor longitud de raíces de *Epidendrum radicans*.

Los resultados obtenidos sirven de base para orientar futuras investigaciones acerca de nuevos protocolos para los medios de cultivo con extractos de sábila y nopal para la germinación y desarrollo *in vitro* de otras especies.

XI. BIBLIOGRAFÍA

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

Alonso, A. F. (2002). El cultivo de la patata. Segunda edición. Editores Mundi Prensa, Madrid. pp. 17-36.

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

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

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

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

Arditti, J. y Ernst, R. (1984). Physiology of germinating orchid seeds. In; J. Arditti (ed.). Orchid biology: Reviews and perspectives. Vol III. Cornell University Press, Ithaca, N. Y.

Arditti, J. y Ernst, R. (1993). Micropropagation of orchids. Wiley Interscience. New York. 682 p.

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

Aprocsal (1994). De comunidad a comunidad. Boletín No. 7 Asociación de promotores.

Ávila-Díaz, I. y G. R. Salgado. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Biológicas 8:138-149.

Ávila-Díaz, I., K. Oyama, A. C. Gómez y G. R. Salgado. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 99:335-343.

Barba, A. A., Luna, R. S. y Romero, A. J. (2002). Orquídeología Básica. Biotemas U.I.B.V FES-Zaragoza, UNAM, México: 18.

Bellone, Roger., (2006). Orquídeas. Guía del aficionado. Ediciones Omega. 17-100, 197-200, 305-333.

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

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.

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

Beyl, C. A. (2005). Getting started with tissue cultura: media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. En trigiano, R, N. y Gray, D. J (editores). 2005. *Plant development and Biotechnology*. CRC Press. Florida. pp. 19-37.

Bravo, H. H. (1978). Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma De México. UNAM. pp 347-348.

Carmona B. J. (2016). GERMINACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE *Oncidium unguiculatum* (ORCHIDACEAE), CON FINES DE CONSERVACIÓN ex situ. Tesis de licenciatura Fes Iztacala, UNAM. 49 pp.

Caneva, S. (1978). Orquídeas. Principales Géneros y Especies de Cultivo. Buenos Aires. p 5-41, 220-226, 230.

Centro de Estudios Agropecuarios. (2001). Cultivo de papa. Grupo Editorial Iberoamérica. 81 p.

Conaza (1990). Sábila (*Aloe vera* Burn). Apuntes (Mimeografiado). Saltillo Coah. México.

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

Chase, M. W., J. V. Freudenstein, K. M. Cameron YR. L. Barrett. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. Pp.69-89 en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett y P. J.Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.

Chen, F. C. y Chen, T. C. (1998). Effect of salt strength and organic additives on the *in vitro* growth of protocorm-like bodies and plantlets of *Oncidium grower* Ramsey. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 44:403-412.

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

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

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. (2005). How many orchid species? *Selbyana* **26**: 155-158.
- 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.
- Ertola, R., Yantorno, O. y Mignone, C. (1994). Crecimiento microbiano. En *Microbiología Industrial*. (ed. OEA. Prog. Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico), Washington, DC, USA 43-54 pp.
- Estopa B. (2005). El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Revista Extra*. pp. 50-57. Universidad de la Rioja España.
- Fanfani, A. and Rossi, W. (1989). *Guide to orchids*. Simon and Schuster,s. New York. p 256.
- Fay, M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28 p 1-4.
- Flores-Escobar, G., S. J. P. Legaria, V. I. Gil y L. M. T. Colinas. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Chapingo, Serie Horticultura* 14:347-353.
- Freuler Julia María, (2007). *Orquídeas*. 1 ed. Buenos Aires.
- García-Cruz, J. y Sánchez, L. (1999). *Orchidaceae II. Epidendrum*. Flora de Veracruz. Fascículo 112. Instituto de Ecología, A. C. México.
- George, E. F. y Sherrington, P. (1984). *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics.ITD. Basingstoke. 709 pp.
- George, E. F. (1996). *Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd. Edington, Wilts.2nd ed. England. pp. 575-1361
- Gernandt, D. (2007). Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México.
- Gravel, H. (1989). Étude de la germination et des premières étapes de la morphogenese du *Cypripedium reginae* Walt. (Orchidaceae). *Memoire de maitrise*, Université de Montréal, Montréal.
- Hadley, G. y Williamson, B. (1972). Features of mycorrhizal infection in some Malayan Orchids. *New Phytol.* 71:1111-1118.
- Hágsater, E. y Salazar Chávez G. (1990) *Icones Orchidacearum*, Fascículo 1, Orquídeas de México parte 1. Herbario AMO México D. F. lamina 40.
- Hágsater, E.; M. A. Soto Arenas; G. A. Salazar Chávez; R. Jiménez Machorro; M. A. López Rosas; R. L. Dressler. (2005). *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoin, México, 304 pp
- Halbinger, F. and M. Soto. (1997). *Laelias of México*. *Orquídea (México)* XV. México.

-
- Harrison, C. R. (1973). Physiology and ultrastructure of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae) germination. These de doctorat. University of California.
- Harrison, C. and Arditti J. (1978). Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanic Gazette*. 139:180-189.
- Hernández M. F. (2010). MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE *Epidendrum anisatum* (ORCHIDACEAE). Tesis Ingeniero agrónomo, UMSNH. 59 pp.
- Hicks, A. J. (2004). Asymbiotic techniques of orchid seed germination. The Orchid Seedbank Project. U.S.A. p. 134.
- Hossain, M. (2008). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (orchidaceae). *African Journal of Biotechnology* 7(20): 3614-3619.
- Jó García María, Hdez. G. René Estévez L. Maylin Bustios D. Santos, Echeverría Yusbel. (2008). Utilización del Aloe vera L. en la composición de medios de cultivo para la fase de enraizamiento de la variedad comercial de plátano FHIA 18. *Avances* Vol. 10 No 4.
- Jensen, E.A y Salisbury, F.B. (1994). Botánica. Ed McGraw-Hill. México.
- Kano, K. (1965). Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Agr. Kagawa University*. 20 p 30-74.
- Kao K.N., and Michailuk M.R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cell and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*. 126:105-110.
- Knudson, C. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Kubota C. y Toyoki K. (1991). Effects of initial amount of sugar in the médium on the growth of *Cymbidium* PLB *in vitro*. *Hortscience*, 26 (69).
- Lecoufle. M. (2006). Orquídeas. Barcelona España. Ediciones Omega. p 7-75.
- 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.
- Lo, S. F.; Nalawade, S. M.; Kuo, C. L; Chen, C. L. y Tsay, H. S. (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino- a medicinally important orchid. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40: 528-535.
- López-Roberts, C., Villegas-Alvarado, G., Mamani-Sánchez, B., Bermejo Franco, J., Aguilar-Llanos, M., and Quezada-Portugal, J. (2007). Orchids' micropropagation for to the sustainable management of native species from Parque Nacional y Área Natural de manejo integrado Cotapata (PN-ANMI COTAPATA), La Paz Bolivia. Universidad de Costa Rica. *Lankesteriana* 7:1-2

-
- Lee, J. y Lee H. (1991). Micropropagación de orquídeas a partir de semillas. Boletín informativo de FIRA XXIV 2:15-30.
- Lu, I. L y Lee, N. (1990). *In vitro germination of Cybidium dayanum* J.Chinese. Soc. Hort. Sci: 3: 198-209.
- Luna, R. B. y A. Barba. (1993). Estudio morfogénico de la semilla de *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR durante su germinación asimbiótica *in vitro*. En V encuentro Latinoamericano de Orquideología. Octubre, 19-25; 24-25 pp.
- Manning, J.C., and Van Standen, J, (1987). The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. Australian Journal Botanical. 35: 343353.
- Massaro, R., Cordeiro, G., Souza-Leal, T., Pedroso-de-Morales, C. (2012). Desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. em meios de cultivo simplificados. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*. 5(2):337-3351.
- Mayo Mosqueda A., Cázares C.J.G., De la Cruz L. E., Flores H. A. (2008). Conservación y Propagación de Orquídeas de Tabasco. SAGARPA-CONACYT.
- McKendrick, S., (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation
- Merino, M.E. (1987). Medio de Cultivo. En: Cultivo de Tejidos Vegetales. D. Hurtado M. y M.E. Merino M. ed. Trillas: 87-95.
- Mitra, G.C, Prasad RN, and Roychowdary A. (1976). Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed-callus of an orchid and correlated changes in its free amino acid content. *Indian Journal of Experimental Biology*. 14:350351.
- Moreno, M. D y Menchaca R. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de Stanhopea Tigrina Bateman (Orchidaceae). Foresta Veracruzana, vol 9, núm 2, pp 27-32.
- Muñoz-Barrionuevo, M. (2011). Evaluación de medios de cultivo para la germinación “*in vitro*” de las orquídeas *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rchb. F. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.
- Murdad R., Latip M., Abdul Z. y Ripin R. (2010). Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah’s Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*. Vol. 18 (1): 199-202
- NOM-059-ECOL-2010. Norma oficial mexicana. (2010). Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres en categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio.
- 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. orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*. 58(4):270-276.
- Otero, J. T. y Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de

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

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

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

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

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

Retamar, J. A. (1995). Dos especies del género aloe: Aloe arborescens Mill y Barbadosensis Mill. En Essenze derivati agrumari, No 2.

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

Rodríguez-Flores. (2000). Germinación y desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum*, especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias. UNAM. pp. 56.

Rodríguez H, Echeverría I. (2004). Efectos estimuladores del crecimiento de extractos acuosos de plantas medicinales y gel de *Aloe vera* (L.) Burm. Rev. Cubana Plant Med. pág. 9.

Rodríguez H. Echevarría I. (2006). Gel de Aloe vera L N.L. Burm y harina de sagú como soporte sólido de medios de cultivo para plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales pág.11 (1).

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

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

Ruíz, B. C., C. A. Laguna, A. L. G. Iglesias, A. Damon, H. T. N. J. Marín, R. H. S. Azpíroz y M. J. L. Moreno. (2008). *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae). Phytion 77:203-215.

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

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

Shiau, Y. J.; Sagare, A. P.; Chen, U. C; Yang. S. R. y Tsay, H. S. (2002). Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial crosspollination and in vitro cultura of seeds. Bot. Bull. Acad. Sin 43: 123-130.

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

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

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

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

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

Suárez-Quijada, I., M. Hernández-Altamirano, V. M. Chávez-Ávila, E. Sandoval-Zapotitla y A. Martínez-Palacios. (2007). Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). Lankesteriana 7:388-393.

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

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

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

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.

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.

Vickery, A.R. (1994). "Aloe" En: G. Davidse, M. Sousa y A Chater Ed. Flora mesoamericana. Vol.VI. UNAM, Missouri Botanical Garden, the Natural History Museum. México. pág. 31.

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

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

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

Yaron, A. (1995). Characterization of Aloe Vera gel before and after auto degradation, and stabilization of the natural fresh gel. *Phototherapy Research*, 7: Special Tissue, pág. 11- 513.

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

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

XII. Anexo 1. MEDIOS NUTRITIVOS UTILIZADOS PARA LA GERMINACION DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE *Epidendrum radicans*

| SALES BASALES COMPONENTES | MS mgL ⁻¹ | SABILA 100% mg/l | NOPAL 100% mg/l |
|---|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| CONSTITUYENTES INORGANICAS | | | |
| Macronutrimientos | | | |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370.0 | - | - |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.0 | - | - |
| KH ₂ PO ₄ | 170.0 | - | - |
| KNO ₃ | 1900.0 | - | - |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440.0 | - | - |
| Micronutrientes | | | |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.6 | - | - |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 | - | - |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 | - | - |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 22.3 | - | - |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 | - | - |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.25 | - | - |
| KI | 0.83 | - | - |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | - | - |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27.8 | - | - |
| COMPLEJOS ORGANICOS | | | |
| | ml/l | ml/l | ml/l |
| Infusión sábila | - | 100 | - |
| Infusión nopal | - | - | 100 |
| CONSTITUYENTES ORGANICOS | | | |
| | mg/l | mg/l | mg/l |
| Vitaminas | | | |
| Tiamina HCl (B ₁) | 0.4 | - | - |
| Niacina | 0.5 | - | - |
| Piridoxina HCl (B ₆) | 0.1 | - | - |
| Hexitol o azúcar alcohol | | | |
| Myo-Inositol | 100.0 | - | - |
| Carbohidrato | | | |
| Sacarosa | 30,000.0 | 30,000.0 | 30,000.0 |
| Agente gelificante | | | |
| Agar-gel (Sigma) | 5,000.0 | 5,000.0 | 5,000.0 |

Anexo 2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE *Epidendrum radicans*.

| Tratamientos Componentes | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
|---|------------|--------------------------|---------------------------|---|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|----------------|---|
| | MS 100% | MS 80% + Nopal 20% | MS 80% + Sábila 20% | MS 60% + Nopal 20% + Sábila 20% | MS 40% + Nopal 60% | MS 40% + Sábila 60% | MS 20% + Nopal 80% | MS 20% + Sábila 80% | Nopal 100% | Sábila 100% | MS 20% + Nopal 40% + Sábila 40% |
| Constituyentes inorgánicas | | | | | | | | | | | |
| Macronutrientes | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370.0 | 296.0 | 296.0 | 222.0 | 148.0 | 148.0 | 74.0 | 74.0 | - | - | 74.0 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.0 | 1320.0 | 1320.0 | 990.0 | 660.0 | 660.0 | 330.0 | 330.0 | - | - | 330.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.0 | 136.0 | 136.0 | 102.0 | 68.0 | 68.0 | 34.0 | 34.0 | - | - | 34.0 |
| KNO ₃ | 1900.0 | 1520.0 | 1520.0 | 1140.0 | 760.0 | 760.0 | 380.0 | 380.0 | - | - | 380.0 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440.0 | 352.0 | 352.0 | 264.0 | 176.0 | 176.0 | 88.0 | 88.0 | - | - | 88.0 |
| Micronutrientes | | | | | | | | | | | |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.6 | 6.88 | 6.88 | 5.16 | 3.44 | 3.44 | 1.72 | 1.72 | - | - | 1.72 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 | 0.02 | 0.02 | 0.015 | 0.01 | 0.01 | 0.005 | 0.005 | - | - | 0.005 |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 | 4.96 | 4.96 | 3.72 | 2.48 | 2.48 | 1.24 | 1.24 | - | - | 1.24 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 22.3 | 17.84 | 17.84 | 13.80 | 8.92 | 8.92 | 4.46 | 4.46 | - | - | 4.46 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 | 0.02 | 0.02 | 0.015 | 0.01 | 0.01 | 0.005 | 0.005 | - | - | 0.005 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.25 | 0.2 | 0.2 | 0.15 | 0.1 | 0.1 | 0.05 | 0.05 | - | - | 0.05 |
| KI | 0.83 | 0.664 | 0.664 | 0.498 | 0.332 | 0.332 | 0.166 | 0.166 | - | - | 0.166 |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | 29.84 | 29.84 | 22.38 | 14.92 | 14.92 | 7.46 | 7.46 | - | - | 7.46 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27.8 | 22.24 | 22.24 | 16.68 | 11.12 | 11.12 | 5.56 | 5.56 | - | - | 5.56 |
| | | | | | | | | | | | |
| Complejos Orgánicos | ml/l | m/l | m/l | m/l | m/l | m/l | m/l | m/l | m/l | m/l | m/l |
| Infusión sábila | - | - | 10 | 10 | - | 10 | - | 10 | - | 100 | 10 |
| Infusión nopal | - | 10 | - | 10 | 10 | - | 10 | - | 100 | - | 10 |
| | | | | | | | | | | | |
| Constituyentes orgánicos | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l |
| Vitaminas | | | | | | | | | | | |
| Tiamina HCl (B ₁) | 0.4 | 0.32 | 0.32 | 0.24 | 0.16 | 0.16 | 0.08 | 0.08 | - | - | 0.08 |
| Niacina | 0.5 | 0.4 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | - | - | 0.1 |
| Piridoxina HCl (B ₆) | 0.1 | 0.08 | 0.08 | 0.06 | 0.04 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | - | - | 0.02 |
| Hexitol o azúcar alcohol | | | | | | | | | | | |
| Myo-Inositol | 100.0 | 80.0 | 80.0 | 60.0 | 40.0 | 40.0 | 20.0 | 20.0 | - | - | 20.0 |
| Carbohidrato | | | | | | | | | | | |
| Sacarosa | 30,000.0 | 24,000.0 | 24,000.0 | 18,000.0 | 12,000.0 | 12,000.0 | 6,000.0 | 6,000.0 | 30,000.0 | 30,000.0 | 6,000.0 |

Anexo 3. Medios de cultivo utilizados para el desarrollo *in vitro* de *Epidendrum radicans*.

| Tratamientos Componentes | T1 MS 100% | T2 MS 80% + Nopal 20% | T3 MS 80% + Sábila 20% | T4 MS 60% + Nopal 20% + Sábila 20% | T5 Nopal 100% | T6 Sábila 100% |
|---|------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|------------------|----------------------|
| Constituyentes inorgánicas | | | | | | |
| Macronutrientes | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370.0 | 296.0 | 296.0 | 222.0 | - | - |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.0 | 1320.0 | 1320.0 | 990.0 | - | - |
| KH ₂ PO ₄ | 170.0 | 136.0 | 136.0 | 102.0 | - | - |
| KNO ₃ | 1900.0 | 1520.0 | 1520.0 | 1140.0 | - | - |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440.0 | 352.0 | 352.0 | 264.0 | - | - |
| Micronutrientes | | | | | | |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.6 | 6.88 | 6.88 | 5.16 | - | - |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 | 0.02 | 0.02 | 0.015 | - | - |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 | 4.96 | 4.96 | 3.72 | - | - |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 22.3 | 17.84 | 17.84 | 13.80 | - | - |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 | 0.02 | 0.02 | 0.015 | - | - |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.25 | 0.2 | 0.2 | 0.15 | - | - |
| KI | 0.83 | 0.664 | 0.664 | 0.498 | - | - |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | 29.84 | 29.84 | 22.38 | - | - |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27.8 | 22.24 | 22.24 | 16.68 | - | - |
| | | | | | | |
| Complejos Orgánicos | ml/l | m/l | m/l | m/l | m/l | m/l |
| Infusión sábila | - | - | 10 | 10 | - | 100 |
| Infusión nopal | - | 10 | - | 10 | 100 | - |
| | | | | | | |
| Constituyentes orgánicos | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l |
| Vitaminas | | | | | | |
| Tiamina HCl (B ₁) | 0.4 | 0.32 | 0.32 | 0.24 | - | - |
| Niacina | 0.5 | 0.4 | 0.4 | 0.3 | - | - |
| Piridoxina HCl (B ₆) | 0.1 | 0.08 | 0.08 | 0.06 | - | - |
| Hexitol o azúcar alcohol | | | | | | |
| Myo-Inositol | 100.0 | 80.0 | 80.0 | 60.0 | - | - |
| Carbohidrato | | | | | | |
| Sacarosa | 30,000.0 | 24,000.0 | 24,000.0 | 18,000.0 | 30,000.0 | 30,000.0 |

Anexo 4. Resultados

Cuadro 1. Análisis de varianza para el índice de desarrollo durante la germinación de las semillas de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 394822. | 5 | 78964.4 | 3.20 | 0.0081 |
| B:Tratamientos | 1.93829E6 | 10 | 193829. | 7.84 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 805151. | 50 | 16103.0 | 0.65 | 0.9652 |
| RESIDUOS | 6.49838E6 | 263 | 24708.7 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 9.63317E6 | 328 | | | |

Cuadro 2. Análisis de varianza para el índice de desarrollo durante la germinación de las semillas de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 394822. | 5 | 78964.4 | 3.20 | 0.0081 |
| B:Tratamientos | 1.93829E6 | 10 | 193829. | 7.84 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 805151. | 50 | 16103.0 | 0.65 | 0.9652 |
| RESIDUOS | 6.49838E6 | 263 | 24708.7 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 9.63317E6 | 328 | | | |

Cuadro 3. Pruebas de múltiple rangos por tiempo para el índice de desarrollo durante la germinación de las semillas de *Epidendrum radicans*.

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|----------|-------------------|
| 21 | 55 | 174.545 | 21.1955 | X |
| 84 | 55 | 234.309 | 21.1955 | X |
| 105 | 55 | 242.255 | 21.1955 | X |
| 42 | 55 | 251.436 | 21.1955 | X |
| 126 | 54 | 255.914 | 21.435 | X |
| 63 | 55 | 289.891 | 21.1955 | X |

Cuadro 3. Pruebas de Múltiple Rangos por Tratamientos para el índice de desarrollo durante la germinación de las semillas de *Epidendrum radicans*.

| Tratamientos | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 8 | 30 | 149.333 | 28.6988 | X |
| 7 | 30 | 180.5 | 28.6988 | XX |
| 6 | 30 | 182.233 | 28.6988 | XX |
| 11 | 30 | 197.233 | 28.6988 | XX |
| 9 | 30 | 198.633 | 28.6988 | XX |
| 10 | 30 | 215.367 | 28.6988 | XX |
| 2 | 30 | 241.367 | 28.6988 | X |
| 5 | 29 | 253.642 | 29.2906 | X |
| 4 | 30 | 258.4 | 28.6988 | X |
| 3 | 30 | 377.367 | 28.6988 | X |
| 1 | 30 | 401.233 | 28.6988 | X |

Cuadro 4. Análisis de varianza de los protocormos o estadio 3 presentes en tres tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 1653.33 | 2 | 826.667 | 24.80 | 0.0388 |
| Intra grupos | 66.6667 | 2 | 33.3333 | | |
| Total (Corr.) | 1720.0 | 4 | | | |

Cuadro 5. Pruebas de múltiple rangos para los protocormos o estadio 3 presentes en tres tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| <i>Tratamientos</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| 10 | 1 | 40.0 | × |
| 9 | 3 | 56.6667 | × |
| 7 | 1 | 95.0 | × |

Cuadro 6. Análisis de varianza de los protocormos con primordio foliar o estadio 4 presentes en cinco tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 2067.98 | 4 | 516.995 | 0.87 | 0.5215 |
| Intra grupos | 4751.25 | 8 | 593.906 | | |
| Total (Corr.) | 6819.23 | 12 | | | |

Cuadro 7. Pruebas de múltiple rangos para los protocormos con primordio foliar o estadio 4 presentes en cinco tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| <i>Tratamientos</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| 1 | 5 | 34.0 | × |
| 11 | 1 | 40.0 | × |
| 3 | 4 | 58.75 | × |
| 4 | 1 | 60.0 | × |
| 5 | 2 | 62.5 | × |

Cuadro 8. Análisis de varianza de los protocormos con una hoja o estadio 5 presentes en los siete tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 2145.44 | 6 | 357.574 | 1.58 | 0.2480 |
| Intra grupos | 2257.5 | 10 | 225.75 | | |
| Total (Corr.) | 4402.94 | 16 | | | |

Cuadro 9. Pruebas de múltiple rangos para los protocormos con una hoja o estadio 5 presentes en los siete tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|-------|-------------------|
| 6 | 2 | 3.0 | X |
| 4 | 2 | 12.5 | XX |
| 5 | 2 | 25.0 | XX |
| 3 | 4 | 27.5 | XX |
| 1 | 5 | 34.0 | X |
| 11 | 1 | 40.0 | XX |
| 2 | 1 | 40.0 | XX |

Cuadro 10. Análisis de varianza de los protocormos con dos hojas o estadio 6 presentes en ocho tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 2665.66 | 7 | 380.808 | 2.96 | 0.0370 |
| Intra grupos | 1932.08 | 15 | 128.806 | | |
| Total (Corr.) | 4597.74 | 22 | | | |

Cuadro 11. Pruebas de múltiple rangos para los protocormos con dos hojas o estadio 6 presentes en ocho tratamientos a los 126 días de cultivo de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 6 | 2 | 2.0 | X |
| 5 | 3 | 10.0 | X |
| 4 | 3 | 16.6667 | XX |
| 3 | 4 | 18.75 | XX |
| 8 | 1 | 20.0 | XXX |
| 11 | 2 | 20.0 | XXX |
| 1 | 5 | 32.0 | XX |
| 2 | 3 | 38.3333 | X |

Cuadro 12. Análisis de varianza para la altura (cm) de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 466.056 | 2 | 233.028 | 173.68 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 76.9159 | 5 | 15.3832 | 11.47 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 28.4713 | 10 | 2.84713 | 2.12 | 0.0223 |
| RESIDUOS | 458.866 | 342 | 1.34171 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 1030.31 | 359 | | | |

Cuadro 13. Pruebas de múltiple rangos para la altura (cm) por tiempo (Días) de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tiempo (Días) | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 0 | 120 | 2.10083 | 0.10574 | X |
| 40 | 120 | 3.2125 | 0.10574 | X |
| 80 | 120 | 4.87 | 0.10574 | X |

Cuadro 14. Pruebas de múltiple rangos para Altura (cm) por tratamientos de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tratamientos | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 5 | 60 | 2.53333 | 0.149539 | × |
| 6 | 60 | 3.11667 | 0.149539 | × |
| 4 | 60 | 3.55833 | 0.149539 | × |
| 1 | 60 | 3.57333 | 0.149539 | × |
| 2 | 60 | 3.58333 | 0.149539 | × |
| 3 | 60 | 4.00167 | 0.149539 | × |

Cuadro 15. Análisis de varianza para el número de hojas de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 206.022 | 2 | 103.011 | 67.35 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 167.822 | 5 | 33.5644 | 21.94 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 36.2111 | 10 | 3.62111 | 2.37 | 0.0102 |
| RESIDUOS | 523.1 | 342 | 1.52953 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 933.156 | 359 | | | |

Cuadro 16. Pruebas de múltiple rangos para el número de hojas por tiempo (Días) de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tiempo (Días) | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 0 | 120 | 3.35 | 0.112899 | × |
| 40 | 120 | 4.03333 | 0.112899 | × |
| 80 | 120 | 5.18333 | 0.112899 | × |

Cuadro 17. Pruebas de múltiple rangos para el número de hojas por tratamientos de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tratamientos | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 5 | 60 | 3.16667 | 0.159663 | × |
| 6 | 60 | 3.41667 | 0.159663 | × |
| 4 | 60 | 4.2 | 0.159663 | × |
| 2 | 60 | 4.55 | 0.159663 | XX |
| 3 | 60 | 4.81667 | 0.159663 | × |
| 1 | 60 | 4.98333 | 0.159663 | × |

Cuadro 18. Análisis de varianza para el número de raíces de las plántulas *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 321.217 | 2 | 160.608 | 101.19 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 38.6667 | 5 | 7.73333 | 4.87 | 0.0003 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 15.7167 | 10 | 1.57167 | 0.99 | 0.4515 |
| RESIDUOS | 542.8 | 342 | 1.58713 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 918.4 | 359 | | | |

Cuadro 19. Pruebas de múltiple rangos para el número de raíces por tiempo (Días) de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tiempo (Días) | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 0 | 120 | 2.03333 | 0.115005 | X |
| 40 | 120 | 3.325 | 0.115005 | X |
| 80 | 120 | 4.34167 | 0.115005 | X |

Cuadro 20. Pruebas de múltiple rangos para el número de raíces por tratamientos de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tratamientos | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 5 | 60 | 2.6 | 0.162641 | X |
| 6 | 60 | 3.06667 | 0.162641 | X |
| 4 | 60 | 3.26667 | 0.162641 | XX |
| 3 | 60 | 3.43333 | 0.162641 | XX |
| 2 | 60 | 3.43333 | 0.162641 | XX |
| 1 | 60 | 3.6 | 0.162641 | X |

Cuadro 21. Análisis de varianza para la longitud de la raíz más larga de las plántulas *Epidendrum radicans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo (Días) | 303.657 | 2 | 151.829 | 192.75 | 0.0000 |
| B:Tratamientos | 30.6516 | 5 | 6.13032 | 7.78 | 0.0000 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 27.7225 | 10 | 2.77225 | 3.52 | 0.0002 |
| RESIDUOS | 269.398 | 342 | 0.787715 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 631.43 | 359 | | | |

Cuadro 22. Pruebas de múltiple rangos para longitud de la raíz más larga por tiempo (Días) de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tiempo (Días) | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------|-------|----------|-----------|-------------------|
| 0 | 120 | 1.08167 | 0.0810203 | X |
| 40 | 120 | 2.625 | 0.0810203 | X |
| 80 | 120 | 3.27083 | 0.0810203 | X |

Cuadro 23. Pruebas de múltiple Rangos para longitud de la raíz más larga por tratamientos de las plántulas de *Epidendrum radicans*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tratamientos | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 2 | 60 | 1.985 | 0.11458 | X |
| 1 | 60 | 2.09667 | 0.11458 | X |
| 3 | 60 | 2.10333 | 0.11458 | X |
| 4 | 60 | 2.43667 | 0.11458 | X |
| 5 | 60 | 2.51167 | 0.11458 | XX |
| 6 | 60 | 2.82167 | 0.11458 | X |

Anexo 5. Ontogenia de *Epidendrum radicans*

