

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a blue and yellow outfit riding a white horse, holding a staff. Above him is a golden crown with a cross on top. To the left is a golden castle and to the right is a golden lion. The background is a light blue sky with a white cloud. The seal is surrounded by a grey border containing the Latin text "CETERAS OBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

**EVALUACIÓN DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO INICIAL DE PLANTAS DE *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.**

**JOEL ROBERTO TOLEDO OLMEDO**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2016**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES**

**EVALUACIÓN DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE  
SEMILLAS Y DOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO INICIAL DE  
PLANTAS DE *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.**

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**POR:**

**JOEL ROBERTO TOLEDO OLMEDO**

**EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EN**

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**EN EL GRADO ACADÉMICO DE**

**LICENCIADO**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2016**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES**

**RECTOR MAGNÍFICO**

**Dr. Carlos Guillermo Alvarado Cerezo**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA**

<b>DECANO</b>	<b>Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López</b>
<b>VOCAL PRIMERO</b>	<b>Dr. Tomas Antonio Padilla Cambara</b>
<b>VOCAL SEGUNDO</b>	<b>Ing. Agr. M.A. César Linneo García Contreras</b>
<b>VOCAL TERCERO</b>	<b>Ing. Agr. M.Sc. Erberto Raúl Alfaro Ortiz</b>
<b>VOCAL CUARTO</b>	<b>B. Industrial Milton Juan José Caná Aguilar</b>
<b>VOCAL QUINTO</b>	<b>P. Agr. Cristian Alexander Méndez López</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón</b>

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2016**

Guatemala, octubre de 2016

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de graduación titulado:

EVALUACION DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO INICIAL DE PLANTAS DE *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.

Presentándolo como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Recursos Naturales Renovables, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme.

Atentamente,

Joel Roberto Toledo Olmedo

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

## **ACTO QUE DEDICO**

**A:**

**DIOS**

Por ser lámpara a mis pies y lumbrera a mi camino, por cuidarme en mi vida y llenar de bendiciones a mi familia y a mí.

**MI PADRE**

Roberto Toledo por ser mi ejemplo de lucha, esfuerzo, responsabilidad y dedicación durante mi vida, por darme el apoyo incondicional el cual he utilizado para enorgullecerte el día de hoy y principalmente por enseñarme que el temor a Dios es el principio de la sabiduría.

**MI MADRE**

Veraliz de Toledo por sus consejos, sacrificio, esfuerzo y comprensión, por enseñarme a realizar todo con amor y dedicación, por motivarme a seguir adelante y formar la persona que ahora soy.

**MI HERMANA**

Veraliz Toledo por ser mi ejemplo, admiración la cual me motiva a seguir adelante y dar lo mejor de mí, te quiero.

**MI NOVIA**

Mariajose Barrera por demostrarme su amor, cariño y paciencia en todo momento, que estés en mi vida es una bendición, te quiero.

**MIS ABUELOS**

Elena de Olmedo (+), Miguel Olmedo (+), Carmen Solórzano por sus consejos y muestras de cariño.

**MIS TIOS**

Principalmente a Tío Wili y Tía Karen, por su amor, cariño y consejos durante mi vida, a Tío Mauricio, Tía Walesca, Tía Gladys por el amor que me tienen.

**MIS PRIMOS**

Carlos Mansilla por sus consejos y apoyo, Jaime Mansilla, José Olmedo, Karen Olmedo y Wili Juan Diego por su amor y cariño hacia mi persona.

**MIS AMIGOS**

Por sus muestras de cariño y buenos tiempos juntos, principalmente a Jorge Vida, Dany Vidal, Edware Vidal, Jorge Montufar, Alberto Mansilla, Andrea Valdez, Bernabe Godinez, Claudia Saput, Eduardo Cabrera, Omar Cabrera, Verónica Joachin, Ceci Joachin, Cesar Garcia y Hissel Garcia.

## **TESIS QUE DEDICO**

**A:**

**GUATEMALA**

El país que me vio nacer, por ser centro de origen de la biodiversidad de flora y fauna, por sentirme orgulloso de ser guatemalteco.

**USAC**

Mi casa de estudios que me ofreció conocimientos y herramientas para aportar un grano de arena en el desarrollo de este bello país.

**FAUSAC**

Por permitirme ser egresado de esta gloriosa facultad, formándome profesionalmente a través de la transferencia de conocimientos por excelentes docentes.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A:**

### **MIS SUPERVISORES**

Ing. Agr. Cesar Linneo, por su apoyo durante la ejecución del Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía. Lic. Ingrid Polanco supervisora del programa EPSUM por su muestra de cariño y amistad.

### **MIS ASESORES**

Ing. Agr. Edgar Franco por sus consejos, tiempo invertido y apoyo en la búsqueda de la excelencia de mi trabajo de investigación, por ser un gran docente y profesional de tan prestigiosa facultad. Ing. Agr. Estuardo Archila por su tiempo, apoyo y amistad brindada durante la elaboración de mi trabajo de investigación.

### **MANCOMUNIDAD DE MUNICIPIOS DE DESARROLLO INTEGRAL DE LA CUENCA COPANCH'ORTI'**

Por permitirme realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado, especialmente a la comunidad Ch'orti' por permitirme desenvolverme como profesional.

**EVALUACIÓN DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO INICIAL DE PLANTAS DE *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.**

**EVALUATION OF FOUR CULTURE MEDIA FOR SEED GERMINATION AND TWO CULTURE MEDIA FOR INITIAL GROWTH OF PLANTS *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.**

**RESUMEN**

En la amplia diversidad florística que existe en Guatemala, las orquídeas son consideradas de importancia económica debido a sus hermosos diseños y color de las flores, sin embargo en su hábitat sufren perturbaciones debido a la deforestación, variación climática, extracción directa del bosque para uso comercial y de uso ornamental, por ello especies de la familia Orchidaceae se encuentran en peligro de extinción y al no buscar soluciones ante tal problemática, se corre el riesgo de la extinción de la especie *Lycaste lasioglossa* Rchb.f .

En la actualidad la propagación de las orquídeas con métodos convencionales permite la germinación de cinco a seis plantas por cada cápsula de *L. lasioglossa* obteniéndose un mínimo porcentaje de germinación (0.0001%). Sin embargo la propagación *in vitro* de orquídeas constituye una herramienta por medio de la cual, al definir los medios de cultivo y las condiciones de cultivo, se incrementa significativamente la germinación de semillas de orquídea y el crecimiento de las plantas.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala se evaluaron cuatro medio de cultivo para la germinación de semillas y dos medios para el crecimiento inicial de la orquídea *L. lasioglossa*. Los medios de cultivo evaluados para la germinación de semillas fueron: medio de cultivo Murashige y

Skoog, medio de cultivo Knudson "C" Modificado, medio de cultivo Archila y medio Morel 1965.

Los medios de cultivo Archila y Knudson "C" modificado mostraron los mejores resultados en porcentaje de germinación con 61.05 % y 58.9 % respectivamente, estadísticamente no existió diferencia entre ellos. Los medios de cultivo MS y Morel 1965 mostraron un menor porcentaje de germinación siendo 24.7 % y 18.18 % respectivamente.

En el crecimiento inicial de plantas de *L. lasioglossa* el medio de cultivo en el cual se observó la mayor altura fue el medio Archila con 5.7 mm, le siguió el medio de cultivo Knudson "C" modificado, en el cual se observó una altura de 4.2 mm en las plantas. Al realizar análisis combinado de medios para la germinación de semillas y medios de cultivo para el crecimiento inicial, estadísticamente el medio de cultivo Archila fue más efectivo. Cuando se germinan semillas en el medio Archila y se trasladan las semillas germinadas al mismo medio se produce mayor crecimiento, en comparación con el medio de cultivo Knudson "C" Modificado. Se recomienda el uso del medio de cultivo Archila, el cual además es simple y existe mayor facilidad de adquirir los componentes para su elaboración.

La investigación realizada es una contribución para la conservación de la variabilidad genética de la biodiversidad de Guatemala, debido a que se han evaluado y obtenido resultados que incrementan la eficiencia para la propagación *in vitro* de *L. lasioglossa*.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 Marco conceptual .....	3
2.1.1 Generalidades de las orquídeas .....	3
2.1.2 Características generales del género <i>Lycaste</i> .....	4
2.1.3 <i>Lycaste lasioglossa</i> Rchb.f. ....	5
2.1.4 Amenaza de extinción de las orquídeas .....	6
2.1.5 Cultivo de tejidos vegetales .....	7
2.1.6 Medios de cultivos para orquídeas .....	8
2.1.7 Germinación de semillas orquídeas <i>in vitro</i> .....	10
2.1.8 Fundamentos para mantener condiciones de esterilización .....	10
2.2 Marco referencial .....	11
2.2.1 Descripción de <i>Lycaste lasioglossa</i> Rchb.f. ....	11
2.2.2 Cultivo de tejidos en <i>L. lasioglossa</i> .....	11
2.2.3 Medios de cultivo .....	11
2.2.4 Lugar en donde se realizó la investigación .....	16
3. OBJETIVOS .....	17
4. HIPÓTESIS .....	18
5. METODOLOGÍA .....	19
5.1 Metodología experimental .....	19
5.1.1 Evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	19
5.1.2 Evaluación de medios de cultivo para el crecimiento inicial de plantas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	22
5.2 Manejo del experimento .....	25
5.2.1 Desinfección y esterilización de materiales, cristalería y equipo .....	25
5.2.2 Medios de cultivo y su preparación .....	25
5.2.3 Esterilización y trasvasado de los medios de cultivo para la germinación de semilla .....	32
5.2.4 Desinfección de las semillas de orquídea con capsula abierta .....	33
5.2.5 Cuantificación de semillas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	33
5.3 Manejo general de los experimentos .....	35
5.3.1 Determinación de la especie .....	35
5.3.2 Evaluación de medios de cultivo para la germinación de semilla de <i>L. lasioglossa</i> . ....	35
5.3.3 Evaluación de medios de cultivo para el crecimiento inicial de planta de <i>L. lasioglossa</i> .....	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38

6.1	Numero de semillas en suspensión por mililitro de agua.....	38
6.2	Efecto de medios de cultivo en la germinación de semilla de <i>L. lasioglossa</i> .....	38
6.3	Efecto de medios de cultivo en el crecimiento de planta de <i>L. lasioglossa</i> .....	39
6.4	Efecto de medios de cultivo en la germinación de semilla y crecimiento inicial de <i>L. lasioglossa</i> .....	40
7.	CONCLUSIONES .....	44
8.	RECOMENDACIONES .....	45
9.	BIBLIOGRAFÍAS.....	46
10.	ANEXOS.....	50

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Taxonomía de <i>Lycaste lasioglossa</i> Rchb.f.....	6
Cuadro 2 Medios de cultivo evaluados para la germinación se semillas de <i>L. lasioglossa</i> y el código asignado a cada uno. ....	19
Cuadro 3 Medios de cultivo evaluados para el crecimiento inicial de plantas de <i>L. lasioglossa</i> y el código asignado a cada uno. ....	22
Cuadro 4A Componentes, concentración de soluciones y cantidad de solución concentrada utilizada para preparar un litro de medio de cultivo Murashige y Skoog.....	50
Cuadro 5A Componentes, concentración de soluciones y cantidad de solución concentrada utilizada para preparar un litro de medio de cultivo Knudson "C" Modificado.....	51
Cuadro 6A Componentes y cantidad utilizada por litro de medio de cultivo Archila .....	52
Cuadro 7A Componentes, concentración de soluciones y cantidad de solución concentrada utilizada para preparar un litro de medio de cultivo Morel 1965. ....	53
Cuadro 8A Comparación de los componentes de los Medios de Cultivo Archila y Knudson "C" Modificado.....	54
Cuadro 9A Resumen del análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación de semillas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	55
Cuadro 10A Resumen de la prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey para la germinación de semillas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	56
Cuadro 11A Resumen de análisis de varianza para la variable altura de planta en los medios de cultivo de germinación de semilla y crecimiento inicial de planta de <i>L. lasioglossa</i> .....	57
Cuadro 12 Resumen de la prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey para la altura de planta en los medios de cultivo para la germinación de semillas a medios de cultivo para crecimiento de plantas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	58
Cuadro 13A Datos del porcentaje de semillas germinadas de orquídea <i>L. lasioglossa</i> . ....	59
Cuadro 14A Datos de la altura de planta de <i>L. lasioglossa</i> en milímetros. ....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Flor de <i>Lycaste lasioglossa</i> Rchb.f. ....	6
Figura 2 Distribución de los tratamientos y repeticiones para la evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	21
Figura 3 Distribución de tratamiento, factores y repeticiones para evaluar el crecimiento inicial de <i>L. lasioglossa</i> . ....	24
Figura 4 Cajas de Petri conteniendo medio para la germinación de semillas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	32
Figura 5 Semillas de <i>L. lasioglossa</i> en el hematocitómetro a 100x. ....	34
Figura 6 Cajas de Petri distribuidas en diseño completamente al azar en la evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de <i>L. lasioglossa</i> . ....	36
Figura 7 Efecto de medios de cultivo en la germinación de semillas de la orquídea <i>Lycaste lasioglossa</i> Rchb.f. ....	38
Figura 8 Efecto de los medios Archila y Knudson "C" Modificado en el crecimiento inicial de <i>L. lasioglossa</i> . ....	40
Figura 9 Altura de plantas en centímetros de los efectos entre los medios de cultivo de germinación de semilla y medios de cultivo de crecimiento de <i>L. lasioglossa</i> . ....	42

## 1 INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país considerado como centro de origen y con alta diversidad florística, se han reportado aproximadamente 800 géneros y unas 35 000 especies de orquídeas, pero se encuentran amenazadas debido a factores como extracción directa de la naturaleza para venta como ornamento, incendios forestales, pérdida de cobertura forestal y la variación climática que se ha observado.

El Consejo Nacional de Áreas Protegidas ha dado a conocer un listado de especies amenazadas en Guatemala (CONAP, 2009); la especie *Lycaste lasioglossa* Rchb.f no se encuentra en ese listado, sin embargo, debido a su utilización con fines ornamentales, puede en el futuro ser parte de este listado en caso no se regule su aprovechamiento.

En la actualidad se obtiene de cinco a seis semillas germinadas por cápsula de *L. lasioglossa*, cuando se propaga por semilla utilizando métodos convencionales, obteniéndose un aproximado de 0.0001% de germinación (Lucas, 2015)

El cultivo de tejidos vegetales es una de las herramientas de la biotecnología por medio de la cual se realiza la propagación *in vitro* y está basada en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células vegetales tienen la capacidad de regenerar una planta completa (Pierik RLM, 1988). En la constante búsqueda de información y actualización de tecnologías asociadas al cultivo de tejidos vegetales, se han realizado estudios para la micro propagación de orquídeas (Busso, 2008).

En este documento se presenta el informe de la evaluación de dos medios de cultivo para la germinación de semillas y dos medios de cultivo para el crecimiento inicial de las plantas de *L. lasioglossa*

El medio de cultivo Archila mostró los más altos porcentajes para la germinación de semillas de la especie *L. lasioglossa* (61.05 % de germinación), seguido del medio de

cultivo Knudson "C" Modificado con 58.92% de germinación, aunque sin presentar diferencia significativa, luego el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con el 24.75% de germinación y el medio de cultivo con menos respuesta en el porcentaje de germinación fue el medio de cultivo Morel 1965 con 18.18% de germinación.

El medio de cultivo Archila mostró los mejores resultados en el crecimiento inicial de las plantas de *L. lasioglossa*, en este medio la altura de plantas a los 128 días después del traslado de la semilla germinada fue de 5.7 mm, mientras que la altura de plantas en el medio Knudson "C" Modificado fue de 4.2 mm.

Esta investigación contribuye a la protección genética de la biodiversidad en Guatemala, con fines de conservación del germoplasma de la especie *L. lasioglossa*, dando un aporte a la germinación de semillas y crecimiento inicial de plantas de orquídeas en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, con fines de reproducción.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual se localiza en el Edificio T-8 tercer nivel, en el campus central de la Ciudad Universitaria Zona 12 de la Ciudad de Guatemala, en un periodo de 204 días, de mayo a diciembre 2015.

## **2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Marco conceptual**

#### **2.1.1 Generalidades de las orquídeas**

La palabra “orquídea” (de Latín **orchis**, que a su vez deriva del Griego) apareció por primera vez mencionada en un manuscrito del filósofo griego Theophrastus (371 a 285 A.C.) El nombre significa “testículo” y hace alusión a los pseudobulbos de algunas especies y al uso medicinal que se le asignaba a esta flor como afrodisíaca y potenciadora de la fertilidad. Con el tiempo, la palabra Orchis derivó en Orchidaceae, término con el que se designó a la familia más numerosa del reino vegetal con aproximadamente 25 000 a 35 000 especies (Freuler, 2008).

Las orquídeas forman parte de las monocotiledóneas (uno de los grandes grupos de plantas con flor). Su diversidad es evidente, dado que por ser un grupo en evolución, presenta gran facilidad para producir híbridos exitosos, no solamente entre especies sino también entre géneros (se estima que hay aproximadamente 30 000 híbridos registrados) (Ajú, 2009).

Guatemala es un país privilegiado por la gran variedad de climas, las regiones frías de gran altura y áreas calurosas favorecen que la flora nacional sea muy rica y variada. Esta diversidad climática del país favorece la existencia de un alto número de regiones con determinadas concentraciones de especies de orquídeas, las cuales se pueden encontrar principalmente en los departamentos siguientes: Alta Verapaz, Izabal, Chimaltenango, Chiquimula, Zacapa, Guatemala, Huehuetenango, Petén, Quetzaltenango, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez (Ajú, 2009).

### 2.1.2 Características generales del género *Lycaste*

El género *Lycaste* deriva del griego Ninfa, dedicado a la hija de Priamo último rey de Troya, estas orquídeas crecen en ambiente natural de climas y condiciones muy diferentes, se les encuentra en las costas con temperaturas tropicales y climas fríos en regiones montañosas (Generalidades de las Orquídeas, 2014).

Su floración es en invierno, mayo y junio. Las inflorescencias se originan de la base de los pseudobulbos, son erguidas y de larga duración. Cada una de ellas lleva una flor con olor, de aspecto ceroso que puede durar varias semanas. A la vez que florece, comienzan a formarse los nuevos brotes (Generalidades de las Orquídeas, 2014).

La especie *Lycaste skinneri*, la forma blanca, se encuentra muy raramente, aproximadamente una entre dos mil plantas. Las especies, dentro del género *Lycaste*, presentan una gran variación en las combinaciones de colores rosados y morados de sus sépalos y pétalos. Se produce principalmente de los bosques lluviosos de las montañas de las Verapaces (Generalidades de las Orquídeas, 2014).

Las especies dentro del género *Lycaste* se dividen en dos grandes grupos: las plantas que pierden sus hojas, es decir, dehiscentes y las que no lo son. En el primer grupo están las especies que tienen espinas en los pseudobulbos en la parte donde han estado las hojas y son en su mayoría las de color amarillo; *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. y *Lycaste cruenta* Lindl. El segundo grupo están: *Lycaste virginales* Scheidw. Lindl. y *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. (Ajú, 2009).

Estos dos grupos requieren condiciones diferentes de cultivo y para tener éxito con estas plantas hay que seguir esta división. Las especies del género *Lycaste* tienen un sistema de raíces que indica que están más adaptadas a un ambiente semiterrestre, ya que a pesar que hay veces que se encuentran en los árboles siempre están donde se alojan hojas y otros materiales, así mismo se les encuentra en cavidades en las rocas, por esta

razón el medio de cultivo debe ser una mezcla que asegure un buen drenaje y que retenga cierta humedad aunque no por mucho tiempo (Ajú, 2009).

### **2.1.3 *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.**

Etimológicamente *lasioglossa* deriva de *lasio* que se refiere a peludo y *glossa* que es lengua, debido a su pubescencia extrema del labelo en la flor. Es una planta epífita, aproximadamente de 30 a 45 cm de alto, sus raíces son terrestres de 1.5 a 2 mm de grosor, tiene pseudobulbos ovoides sin espinas de 5 a 8.4 cm de alto, sus flores son vistosas con poca fragancia, sépalos café cobrizo claro hasta café chocolate con bordes amarillentos y brillantes, pétalos amarillos, labelo amarillo (Archila, 2011).

#### **A. Taxonomía**

La especie *Lycaste lasioglossa* Rchb.f., pertenece a la clase Liliopsida, Subfamilia de las Epidendroideae y familia Orchidaceae y su género es *Lycaste*. Plantas epífitas, raramente terrestres, auto o heterótrofas, principalmente tropicales y subtropicales. La flor presenta hermosos diseños, la cual es color café marrón, con un centro color amarillo con presencia de pubescencia como se muestra en la figura 1 (Especies de orquídeas, 2008). En el cuadro 1 muestra la taxonomía de la especie *L. lasioglossa*.

Cuadro 1. Taxonomía de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.

<b>Reino:</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino:</b>	<b>Tracheobionta</b>
<b>División:</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Clase:</b>	<b>Liliopsida</b>
<b>Subclase:</b>	<b>Liliidae</b>
<b>Orden:</b>	<b>Asparagales</b>
<b>Familia:</b>	<b>Orchidaceae</b>
<b>Subfamilia:</b>	<b>Epidendroideae</b>
<b>Tribu:</b>	<b>Cymbidieae</b>
<b>Subtribu:</b>	<b>Maxillariinae</b>
<b>Género:</b>	<b>Lycaste</b>
<b>Sección:</b>	<b><i>Deciduosae</i></b>
<b>Especie:</b>	<b><i>L. lasioglossa</i></b>

Fuente: (Ames, Corel, 1985)



Fuente (Especies de orquídeas, 2008)

Figura 1 Flor de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.

#### **2.1.4 Amenaza de extinción de las orquídeas**

Los factores que son causa de extinción de las orquídeas son principalmente: la extracción de su hábitat con fines comerciales, la destrucción inmoderada de los bosques para ser utilizadas como pastizales o cultivos agrícolas, deforestación, incendios forestales, trasiego ilegal de plantas, contaminación ambiental y erosión genética. Al cortar los árboles se producen cambios en la temperatura y la humedad, que algunas veces, el ambiente alterado ya no es adecuado para la existencia de éstas (González, 2002).

#### **2.1.5 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales se define como el aislamiento y crecimiento de tejidos en un medio sintético y aséptico, bajo condiciones controladas para preservar y lograr la proliferación de diversas porciones de la planta, en un medio nutritivo complementado con vitaminas, reguladores de crecimiento y fuentes de carbono, todo esto manejado mediante condiciones controladas y con asepsia.

Algunas de las investigaciones efectuadas desde los inicios de cultivo de tejidos fueron los primeros cultivos exitosos de órganos y el descubrimiento de la importancia de las vitaminas y de las auxinas para el crecimiento de raíces; los reportes sobre crecimiento indefinido de callos en medios artificiales; los trabajos de organogénesis de Skoog; la descripción del fenómeno de embriogénesis en cultivos de zanahoria; la obtención de los primeros protoplastos; el cultivo de anteras para regenerar plantas haploides a partir de granos de polen y otros, han sido el pilar fundamental para el cultivo de tejidos vegetales (Agvik, 2011).

En la naturaleza las plantas poseen la capacidad de reproducirse vegetativamente, estos mismos factores que dan inicio al crecimiento y a la multiplicación naturalmente están involucrados en el cultivo de tejidos vegetales, aunque de manera más eficiente, debido a

que se proporciona un ambiente artificial favorable para el desarrollo de la planta (Ordoñez, 2003).

### **2.1.6 Medios de cultivos para orquídeas**

Los medios de cultivo son vitales para la propagación *in vitro*, debido a que brinda los elementos necesarios para que a partir de explantes se pueda formar un nuevo individuo, considerando las condiciones adecuadas como luz, temperatura y humedad relativa. Las orquídeas necesitan un pH en el medio de cultivo de 4.5 a 5.5, esto varía según la especie a utilizar (Mckendrick, 2000).

En 1922 Lewis Knudson logró demostrar que las semillas de las orquídeas pueden germinar *in vitro* sin la presencia de micorrizas. Esto lo logró incorporando al medio nutritivo artificial una fuente de carbono, en este caso se empleó sucrosa. Esta técnica actualmente se conoce como germinación asimbiótica y en la actualidad es la base para la propagación masiva de la industria de orquídeas a nivel mundial (Archila, 2000).

Para la germinación de semillas de orquídeas se reportan en la literatura algunos medios de uso generalizado como Knudson C y MS. Sin embargo, los requerimientos pueden ser muy diversos, incluso en especies del mismo género. Se ha obtenido resultados aceptables en diferentes especies de orquídeas con promedios de germinación de semillas de un 70 a 90% empleando los medios Vacint y Went (V y W), Murashige y Skoog (MS), y el medio de cultivo MS a la mitad de su concentración, todos ellos adicionados con 0.1% de carbón activado (Mayo, 2008).

Molina 2012 evaluó el efecto de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y extracto de banano y tomate) en la germinación de semillas de orquídea, utilizó la especie *Comparettia speciosa*. A los 53 días de la siembra observó hinchamiento de las semillas, el cual se observó en mayor cantidad de semillas

incubadas en los medios Murashige y Skoog y Knudson, le siguió, en el número de semillas que mostraron incremento de tamaño, las que se incubaron en el medio elaborado a base de agua de coco, banano y tomate. Los medios Phytamax y Lindemann no mostraron resultados satisfactorios.

Los investigadores Supliguicha y Vera (2015) evaluaron compuestos orgánicos en la propagación sexual de orquídeas, los medios utilizados fueron Murashige y Skoog (MS) modificado con sacarosa, Murashige y Skoog modificado sin sacarosa, banano con sacarosa, banano sin sacarosa, harina de plátano verde con sacarosa, harina de plátano verde sin sacarosa, puré de papa con sacarosa y puré de papa sin sacarosa. Al tercer mes el medio con mayor incremento de crecimiento de plántulas fue el de harina de plátano verde con sacarosa, seguido de los medios MS sin sacarosa y puré de papa con sacarosa, los medios con menor crecimiento fueron el de banano con sacarosa y el de harina de plátano sin sacarosa.

En Hawai y Singapur, existen laboratorios de cultivo de tejidos vegetales que usan medios de cultivo para la propagación de orquídeas, en éstos se han realizado la adición de nutrientes para la germinación de semillas de orquídeas, aunque en los países europeos y en el Continente Americano es más frecuente el uso de medio de cultivo de Knudson C. Sin embargo, en 1978 se realizaron estudios evaluando los medios de cultivo Hildebrandt, Riker, y Duggar (HRD), Murashige y Skoog (MS) y Knudson C. se compararon el crecimiento y desarrollo de los protocormos en los diferentes medios de cultivo a los 50 días después de la siembra, se observó respuesta en la germinación de semilla y crecimiento de protocormos en el medio de cultivo Knudson C (Ammirato, 1990).

### **2.1.7 Germinación de semillas orquídeas *in vitro***

#### **A. Germinación simbiótica y asimbiótica de semillas**

Mediante la germinación *in vitro*, se reproducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contenga azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan. Hay dos tipos básicos de germinación *in vitro*: simbiótica y no simbiótica. En la germinación simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo (micorriza) apropiado (McKendrick, 2000).

La germinación asimbiótica es usualmente usada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas tienden a crecer fácilmente en comparación con las especies de zonas templadas. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, debido a todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada, debido que no existe la intermediación de micorrizas (McKendrick, 2000).

### **2.1.8 Fundamentos para mantener condiciones de esterilización**

Tanto para la germinación simbiótica y asimbiótica es de vital importancia que el medio, los frascos, los aparatos y las semillas se mantengan desinfectados desde el principio del proceso de germinación. Cualquier bacteria u hongo que se introduzca en los frascos crecerá más rápido que las semillas y pronto ocupará su espacio hasta eliminarlas.

Las condiciones de esterilización en la preparación del medio se alcanzan al esterilizar el medio y los frascos de vidrio o plástico alrededor de 15 minutos a 15 psi y temperatura de 120 °C. Esta temperatura y presión son suficientes para eliminar todas las esporas de bacterias y hongos presentes en el medio. Las semillas deben ser desinfectadas y transferidas a los frascos evitando la contaminación con hongos o bacterias externos. Además de asegurarse que todos los instrumentos utilizados en la transferencia estén desinfectados (McKendrick, 2000).

## **2.2 Marco referencial**

### **2.2.1 Descripción de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.**

La especie *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. se encuentra en su hábitat natural en los bosques de Alta Verapaz, Guatemala; es una planta epifita, aproximadamente de 30 a 45 cm de alto, sus raíces son terrestres de 1.5 a 2 mm de grosor, tiene pseudobulbos ovoides sin espinas de 5 a 8.4 cm de alto, sus flores son vistosas con poca fragancia, sépalos café cobrizo claro hasta café chocolate con bordes amarillentos y brillantes, pétalos amarillos, labelo amarillo (Archila, 2011).

### **2.2.2 Cultivo de tejidos en *L. lasioglossa***

La propagación y cultivo de las orquídeas fue revolucionando después del descubrimiento de Knudson en 1922 en donde las semillas pudieron ser germinadas en un medio simple con azúcar. Este trabajo demostró que la germinación de semillas de orquídeas en condiciones *in vitro* es posible sin la asociación con hongos.

En Guatemala se reporta una investigación de propagación de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. realizada por el investigador Estuardo Archila en esta se reporta no haber obtenido germinación en las semillas, se recomendó realizar otras investigaciones para la propagación *in vitro* de dicha especie (Archila, 1996).

### **2.2.3 Medios de cultivo**

Un medio de cultivo es definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos *in vitro*. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre seis y 40 compuestos. Se han reportado cerca de dos mil medios de cultivo, de los cuales los más

usados son 16, además de considerar que algunos de ellos presentan particularidades en la inducción de una vía específica en la morfogénesis vegetal (López, 1990).

El medio de cultivo es una solución acuosa que está formada por compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos, complejos naturales y agentes de soporte y gelificación. Los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

### **A. Sales inorgánicas**

Macronutrientes: los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos; además de Carbono, Hidrógeno y Oxígeno. Los elementos más utilizados son principalmente Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio y Azufre.

El Nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra en el medio en forma de nitrato o iones de amonio, o la combinación de ambos iones. El Fósforo se puede adicionar en cualquiera de las formas  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Las fuentes de macronutrientes son diversas; el Potasio se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza; es un catión que se agrega en forma de  $\text{KCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Así como el calcio se adiciona con  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  o en la forma anhidra de cualquier sal. El Magnesio y Azufre se utiliza como fuente el compuesto  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . y el Cloro se adiciona en forma de  $\text{KCl}$  o  $\text{CaCl}_2$ .

Las fuentes de micronutrientes permiten una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes, los más esenciales son Hierro, Manganeso, Zinc, Boro, Cobre, Cobalto y Molibdeno. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de cloroplastos.

Los micronutrientes constituyen parte del cuerpo vegetal y participan en diversas reacciones. El Hierro es requerido para la formación de precursores de la clorofila. El Manganeseo es necesario para el proceso fotosintético. Los elementos Cobre y el Zinc son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. El Molibdeno forma parte de las enzimas nitrato-reductasa y nitrogenasa. El Boro es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, también está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, en particular de uracilo. (Pizarro, 2012)

Los agentes quelatados son compuestos cuyas moléculas son capaces de detener un ión de un metal con varias uniones químicas formando un anillo complejo (quelato-EDTA ácido etilendinitrotetracetato). En bajas concentraciones estimulan el crecimiento haciendo que el Hierro esté disponible. Las concentraciones tradicionalmente se expresaban en mg/l, es preferente en mM, meq.l<sup>-1</sup> y  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Pizarro, 2012).

## **B. Vitaminas**

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas del metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las más empleadas son la Tiamina ó Vitamina B1, se añade como tiamina-HCl. Es considerada como la única, imprescindible o esencial para el crecimiento de las células vegetales. El ácido nicotínico (Niacina) que permite las reacciones catalíticas del metabolismo del explante. Piridoxina ó Vitamina B6 ésta se añade como piridixina-HCl. Mio-inositol no es considerada propiamente una vitamina es un azúcar-alcohol que tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando quizá en la vía biosintética del ácido galacturónico (Pizarro, 2012).

### **C. Hormonas del desarrollo vegetal**

Existen tres grupos principales de hormonas del desarrollo vegetal, las Auxinas en el primer grupo las cuales están vinculadas al alargamiento celular, inducción de callo, neoformación de meristemas radicales, se encuentran el Ácido naftalenacético (ANA), Ácido Indolbutírico (IBA), Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido Naftoxiacético (NOA) y Ácido Indolacético (AIA).

En el segundo grupo se identifican las Citocininas, estas promueven la división celular y organización y diferenciación de callos, estimulan la proliferación, las más utilizadas son Benciladenina (BA), Kinetina (Kin), Zeatina, Thidiazurón).

En tercer grupo se presentan las Giberelinas, estas promueven el alargamiento celular e incremento de la plasticidad de la pared y aumentar el contenido de glucosa y fructosa, provocando la disminución del potencial agua, lo que lleva al ingreso de agua en la célula permitiendo su expansión, se utiliza Acido Giberélico ( $GA_3$ ), Ácido Abscísico, poliaminas (Pizarro, 2012).

### **D. Aminoácidos**

Los Aminoácidos son una fuente adicional e inmediata de Nitrógeno, su asimilación puede ser más rápida que el Nitrógeno inorgánico aportado el medio, pueden actuar como agentes quelantes. La L-glutamina y la L-asparagina son transportadores de nitrógeno, L-arginina que estimula las raíces y L-cisteína que es un agente reductor.

### **E. Carbohidratos**

Los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y osmo-reguladores. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente, la siguen en importancia la glucosa, fructosa, maltosa, ramosa, galactosa, manosa, lactosa. La concentración a la que se emplea la sacarosa es de 20 a 45 g.l-1 (Pizarro, 2012).

### **F. Agua**

El agua para preparar medios de cultivo deberá ser destilada, bidestilada, tridestilada, desionizada o desminarizada, el agua potable contiene sales en solución que pueden modificar la respuesta de los tejidos en cultivo (Pizarro, 2012).

### **G. Agentes solidificantes**

Los agentes solidificantes se emplean en el caso de medios semisólidos. Se ha utilizado el agar como un sistema de “soporte” para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar es que con el agua forma geles que se derriten a 100 °C, se solidifican a 45 °C, por lo que es estable a las temperaturas de incubación, además no es alterado por enzimas vegetales, ni reacciona con los constituyentes del medio y no interfiere con la movilización de los componentes del medio de cultivo. Normalmente se utiliza seis gramos de agente solidificante por litro de medio de cultivo (Pizarro, 2012).

### **H. Otros compuestos**

Muchos compuestos o suplementos no definidos de composición química variable como agua de coco, endospermo de maíz, extracto de levadura, jugos y extractos de frutas

(plátano, tomate, papaya), caseína hidrolizada (como fuente proteínica), antioxidantes (ácido ascórbico, cítrico) y adsorbentes como el carbón activado se han utilizado en los medios de cultivo (Pizarro, 2012).

## **2.2.4 Lugar en donde se realizó la investigación**

### **A. Ubicación**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual se localiza en el Edificio T-8 tercer nivel, en el campus central de la Ciudad Universitaria Zona 12 de la Ciudad de Guatemala.

### **B. Infraestructura**

El laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales cuenta con área de transferencias, así como área de almacenamiento de materiales y reactivos, área para la preparación de medios de cultivo y un área de incubación con una temperatura promedio de 25 °C con iluminación de 1 000 a 3 000 lux y una humedad relativa de 70 % a 80 %. Para el funcionamiento del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales cuenta con el servicio de energía eléctrica, agua potable y aire acondicionado.

### **C. Equipo**

El laboratorio de cultivo de tejidos vegetales cuenta con un potenciómetro, autoclave, cámara de flujo laminar, estereoscopios, refrigeradora, microondas, balanzas analíticas, reactivos, cristalería e instrumentos de laboratorio básicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el medio de cultivo apropiado para la germinación de semillas y para el crecimiento inicial de plantas de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar cuatro medios de cultivo para identificar en el que se obtenga el mayor porcentaje de germinación de semilla de la orquídea *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.
2. Evaluar dos medios de cultivo para identificar en el que se obtenga un mayor crecimiento en tamaño de plantas de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.
3. Analizar si existe efecto en el crecimiento de plantas entre los medios de cultivo para la germinación de semilla y los medios de cultivo para el crecimiento inicial de plantas de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.

#### 4. HIPÓTESIS

1. En el medio de cultivo Knudson "C" Modificado se obtendrá el mayor porcentaje de germinación de semilla de orquídea *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. debido a que este medio de cultivo ha sido utilizado con buenos resultados en medios para la germinación de semillas de orquídea.
2. En el medio de cultivo Knudson "C" Modificado se tendrá el mayor crecimiento inicial de plantas de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. debido a que este medio es utilizado para propagación de especies de orquídeas tropicales.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Metodología experimental

#### 5.1.1 Evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

##### A. Descripción de los tratamientos

En la evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas se utilizaron cuatro medios, Medio Murashige y Skoog con el código "M1", Medio Kudson "C" Modificado con el código "M2", para el medio Archila y Morel 1965 con el código "M3" y "M4" respectivamente. El cuadro 2 muestra el código utilizado para cada medio de cultivo evaluado.

Cuadro 2 Medios de cultivo evaluados para la germinación de semillas de *L. lasioglossa* y el código asignado a cada uno.

Código de los tratamientos	Medios de cultivo
M1	Medio de cultivo Murashige y Skoog
M2	Medio de cultivo Knudson "C" Modificado
M3	Medio de cultivo Archila
M4	Medio de cultivo Morel 1965

Fuente: Elaboración propia, 2016

##### B. Unidad experimental

La unidad experimental consistió en semillas de la orquídea *L. lasioglossa* contenidas en suspensión en un mililitro de agua, colocadas en el tratamiento correspondiente, contenido en una cada de Petri.

### C. Diseño experimental

Se utilizó el diseño estadístico completamente al azar con cuatro tratamientos para la germinación de semillas de *L. lasioglossa* y ocho repeticiones, en total se tuvieron 32 unidades experimentales.

### D. Modelo estadístico-matemático

Fue utilizado el modelo estadístico-matemático correspondiente al diseño completamente al azar.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

**Dónde:**

$Y_{ij}$ : Germinación de semilla del ij-ésimo tratamiento

$\mu$ : Efecto de la media general

$\tau_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento de medios de cultivo

$\varepsilon_{ij}$ : Error experimental de la ij-ésima unidad experimental

Fuente: (UJCM, 2009)

### E. Arreglo experimental

El arreglo experimental fue distribuido con la ayuda de una calculadora con la función Random, en la figura 2 se muestra la distribución de los tratamientos y repeticiones para la evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

M1R8	M3R7	M3R5	M3R1
M4R8	M1R4	M4R2	M4R3
M2R1	M2R5	M4R6	M4R5
M1R2	M1R3	M3R2	M2R8
M3R3	M2R2	M3R4	M2R4
M1R1	M2R6	M1R5	M4R7
M1R6	M4R1	M3R6	M2R7
M2R3	M3R8	M4R4	M1R7

Fuente: Elaboración propia, 2016

Figura 2 Distribución de los tratamientos y repeticiones para la evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

Referencia: M1 medio MS. M2 medio Knudson "C". M3 medio Archila y M4 medio Morel. La R representa el número de repetición, así M1R1 significa medio MS repetición 1.

## F. Variable de respuesta

Porcentaje de germinación

Se utilizó, como criterio para determinar la germinación de la semilla, el cambio de color de blanco transparente a verde y la elongación del embrión. Para ello se observó a través de un estereoscopio cada caja Petri, en la cual se encontraban las semillas. Se procedió a contar el número de semillas germinadas.

Para obtener porcentaje de semillas germinadas se utilizó como referente el total de semillas contenidas en un mililitro de agua con semillas en suspensión. El porcentaje de semillas germinadas se obtuvo mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de semillas germinadas} = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Total de semillas en 1 mililitro en suspensión}} \times 100$$

## G. Análisis de la información

Para realizar el análisis de los datos de germinación de semillas de *L. lasioglossa* se utilizó el software InfoStat versión 2015. Se procedió a obtener el porcentaje de

germinación de semilla para luego realizar el análisis de varianza un diseño completamente al azar, debido a que presentaron diferencias significativas al cinco por ciento de significancia, se procedió a realizar la prueba múltiple de medias (post-ANDEVA), utilizando el criterio de la prueba de Tukey.

### **5.1.2 Evaluación de medios de cultivo para el crecimiento inicial de plantas de *L. lasioglossa*.**

#### **B. Descripción de los tratamientos**

Los tratamientos utilizados para la evaluación de medios de cultivo para el crecimiento inicial de plantas fueron el medio de cultivo Archila con el código "C1" y el medio Knudson "C" Modificado con el código "C2". El cuadro 3 muestra el código utilizado para los dos medios de cultivo evaluados.

Cuadro 3 Medios de cultivo evaluados para el crecimiento inicial de plantas de *L. lasioglossa* y el código asignado a cada uno.

Código de los tratamientos	Medios de cultivo
C1	Medio de cultivo Archila
C2	Medio de cultivo Knudson "C" Modificado

Fuente: Elaboración propia, 2016

#### **C. Unidad experimental**

La unidad experimental estuvo constituida por tres semillas germinadas contenidas en una caja de Petri.

#### D. Diseño experimental

Para la evaluación de crecimiento inicial de plantas de *L. lasioglossa* se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con arreglo combinatorio 4 x 2 con ocho (8) repeticiones, cuatro (4) tratamientos y dos (2) factores, se tuvieron 64 unidades experimentales.

#### E. Modelo estadístico-matemático

El modelo estadístico-matemático utilizado para el crecimiento inicial de protocormos y primera hoja de *L. lasioglossa* fue el modelo propuesto correspondiente al diseño completamente al azar con arreglo combinatorio 4 x 2.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta observada en la  $ijk$  – ésimo tratamiento.

$\mu$  = Efecto de la media general

$\alpha_i$  = Efecto del  $i$  - ésimo medio de cultivo para germinación de semillas

$\beta_j$  = Efecto del  $j$  – ésimo medio de cultivo para crecimiento de planta

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre el  $i$  – ésimo medio de cultivo para germinación de semillas y el  $j$  - ésimo medio de cultivo para crecimiento de planta

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental asociado a la  $ijk$  - ésima unidad experimental

(UJCM, 2009)

#### F. Arreglo experimental

Los tratamientos fueron distribuidos aleatoriamente con la ayuda de una calculadora con función randóm, la distribución de los tratamientos y las repeticiones se muestran en la figura 3.

M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
C1				C2			
C1M3R6	C1M2R5	C1M4R8	C1M4R5	C2M2R5	C2M3R6	C2M1R3	C2M4R2
C1M2R8	C1M3R7	C1M3R3	C1M1R8	C2M2R2	C2M2R8	C2M4R8	C2M4R5
C1M1R6	C1M4R6	C1M3R8	C1M2R6	C2M1R4	C2M2R4	C2M1R5	C2M3R3
C1M3R4	C1M1R1	C1M4R3	C1M3R2	C2M1R2	C2M4R6	C2M3R4	C2M2R1
C1M2R2	C1M4R4	C1M2R1	C1M3R1	C2M3R2	C2M3R1	C2M2R7	C2M4R7
C1M1R4	C1M1R5	C1M2R3	C1M1R7	C2M1R6	C2M2R3	C2M4R4	C2M3R7
C1M4R7	C1M1R3	C1M2R4	C1M4R2	C2M1R1	C2M2R6	C2M3R8	C2M4R3
C1M3R5	C1M1R2	C1M2R7	C1M4R1	C2M1R8	C2M1R7	C2M4R1	C2M3R5

Fuente: Elaboración propia, 2016

Figura 3 Distribución de tratamiento, factores y repeticiones para evaluar el crecimiento inicial de *L. lasioglossa*.

Referencia: C1 y C2, medio para el crecimiento inicial de la planta Archila y Knudson "C", respectivamente. M1 medio de germinación MS. M2 medio de germinación Knudson "C". M3 medios de germinación Archila y M4 medio de germinación Morel. R hace referencia al número de repetición. Así C1M4R1 significa medio Archila evaluado para crecimiento inicial de plantas de *L. lasioglossa*; semillas germinadas en medio Morel, repetición 1.

### G. Variable de respuesta

La variable de respuesta para el crecimiento inicial de plantas de *L. lasioglossa* se determinó a los 128 días después del traslado de la semilla germinada al medio evaluado, la medición fue realizada con la ayuda de una regla graduada en milímetros la cual se colocó en la superficie de la caja.

### H. Análisis de información

Para el análisis de los datos de altura de planta se utilizó el software InfoStat versión 2015. Se realizó la prueba de varianza a los datos y se comparó el efecto cuando las

semillas fueron germinadas en un medio de cultivo y trasladadas a dos medios de cultivo para su crecimiento inicial, donde se obtuvieron diferencia significativa al cinco por ciento de significancia por lo cual se procedió a realizar la prueba múltiple de medias (post-ANDEVA) entre tratamiento, utilizando el criterio de la prueba de Tukey.

## **5.2 Manejo del experimento**

### **5.2.1 Desinfección y esterilización de materiales, cristalería y equipo**

Las soluciones para la desinfección, como lo fueron el hipoclorito de sodio al 0.5 % y el alcohol etílico al 70 % se prepararon de la forma siguiente: para preparar 500 mm de hipoclorito de sodio al 0.5 % se agregaron a un beaker 450 mm de agua en el que se diluyeron 50 mm de un producto comercial que contenía 5 % de hipoclorito de sodio y para la elaboración de alcohol al 70 % se preparó 1000 mm agregando 736 mm de alcohol etílico al 95 % y 264 mm de agua.

La cristalería utilizada para realizar las diluciones y lavados como lo son; pipetas de 1, 5 y 25 mm, probetas de 50, 500 y 1000 mm, erlenmeyers de 50, 100, 250, 500 y 1000 mm, micro pipetas de 100 y 1000 mm, beakers de 250, 500, 1000 mm, frascos, agujas de disección, micro espátulas, bisturí, pinzas, cajas petri de vidrio, fueron esterilizados en una autoclave a una presión de 15 psi y 121 °C con un tiempo promedio de 15 minutos.

### **5.2.2 Medios de cultivo y su preparación**

#### **A. Preparación de soluciones concentradas de los medios de cultivo**

##### **a. Medio de cultivo Murashige y Skoog**

Para la preparación del medio MS, cuyos componentes se muestran en el cuadro 4A, se utilizaron soluciones concentradas, los macronutrientes se dividieron en dos grupos de

compuestos, para cada uno de los grupos se preparó la solución concentrada a 10X. La solución de Hierro se preparó a una concentración de 50X.

Los micronutrientes se dividieron en tres grupos, dos de estos grupos se prepararon a una concentración de 1000X y en forma separada el KI se preparó a una concentración de 100X. Las vitaminas se prepararon por separado cada una a una concentración de 1000X. En el cuadro 4A se muestra los grupos de compuestos y la concentración que corresponde para las soluciones concentradas preparadas del medio MS.

Para la preparación de cada una de las soluciones concentradas se colocó en un Erlenmeyer el 60 % de agua desmineralizada del volumen total que se preparó, posteriormente se procedió a pesar los compuestos y a mezclarlos en el orden, que para cada grupo aparece en el cuadro 4A. Después de disolver los compuestos que correspondían a cada solución concentrada, se procedió a trasladar la solución a una probeta graduada en la cual se aforó a la cantidad que correspondía a cada una de las soluciones concentradas preparadas.

Para la preparación de la solución de Hierro del medio MS se procedió de la forma siguiente: en dos Erlenmeyer fueron colocados en cada uno, el 30 % del volumen total que se preparó. Se procedió a pesar los compuestos, en el primer Erlenmeyer se colocó el compuesto  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , se procedió, en un plato caliente con agitación y con la ayuda de un agitador magnético, a disolver y calentar la solución. En el segundo Erlenmeyer se colocó el compuesto Na EDTA, el cual se disolvió con la ayuda de un agitador magnético. Posteriormente se procedió a verter la solución de Na EDTA a la de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , esta mezcla se realizó en agitación constante. Una vez mezclados los compuestos se trasladó la solución a una probeta graduada y se aforo a la cantidad correspondiente.

### **b. Medio de cultivo Knudson “C” Modificado**

Para la preparación de las soluciones concentradas del medio de cultivo Knudson C Modificado, cuyos componentes se muestran en el cuadro 5A, los macronutrientes se prepararon a una concentración de 10X, la solución de Hierro a una concentración de 50X y los micronutrientes se prepararon a una concentración de 1000X.

Para la preparación de cada una de las soluciones concentradas, se colocó en un Erlenmeyer el 60 % de agua desmineralizada del volumen total que se preparó, fueron pesados en orden descendente de cómo se listan en el cuadro 5A los compuestos, una vez disueltos se trasladaron a una probeta graduada en la cual se aforó al volumen correspondiente a cada una de las soluciones concentradas. La solución concentrada de Hierro del medio Knudson se preparó de forma similar a la del medio MS, cuya preparación se describe arriba.

### **c. Medio de cultivo Morel**

Para la preparación de las soluciones concentradas del medio de cultivo Morel, cuyos componentes se encuentran en el cuadro 7A, los macronutrientes se prepararon a una concentración de 10X, la solución de Hierro a una concentración de 50X, los micronutrientes a una concentración de 1000X y el Ioduro de Potasio a una concentración de 100X.

Para la preparación de cada una de las soluciones concentradas, se colocó en un Erlenmeyer el 60 % de agua desmineralizada del volumen total que se preparó, fueron pesados en orden descendente de cómo se listan en el cuadro 7A los compuestos, una vez disueltos se trasladaron a una probeta graduada en la cual se aforó al volumen correspondiente a cada una de las soluciones concentradas

La solución concentrada de Hierro del medio Morel se preparó de forma similar a la del medio MS, cuya preparación fue descrita anteriormente en este documento.

## **B. Preparación de medios de cultivo**

### **a. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog**

Para preparar el medio de cultivo MS fueron utilizadas las soluciones concentradas de este medio, en el cuadro 4A se muestra la cantidad de cada una de las soluciones concentradas que fueron agregadas por litro de medio de cultivo preparado.

En un Erlenmeyer se procedió a agregar el 60 % de agua desmineralizada del volumen total del medio de cultivo que se preparó, posteriormente fueron agregadas las soluciones concentradas del medio MS en el orden siguiente: macronutrientes “A”, macronutrientes “B”, solución de Hierro, micronutrientes “A”, Solución de KI, micronutrientes “B”, Mio-nositol, Acido nicotínico, Piridoxina- HCL, Tiamina-HCL y Glicina. Después de agregar cada una de las soluciones concentradas se procedió a agitar la solución en preparación. Posteriormente fue agregada sacarosa, de la cual se agregó en 2 % en relación al volumen. La solución fue vertida en una probeta graduada y se aforó a la cantidad preparada.

Luego se procedió a colocar el medio preparado en un beaker y a establecer el pH, para ello se utilizó un potenciómetro, el pH fue ajustado a 5.5 utilizando para ello NaOH o HCL. Después se dividió la solución en partes de 250 ml, los que fueron colocados en un Erlenmeyer de 500 ml, se procedió a agregar al medio agar, del cual se agregó el 0.6 % en relación al volumen, luego el Erlenmeyer fue cubierto con papel aluminio en la parte superior y colocado en la auto clave para ser esterilizado a 120 °C, 15 psi por 15 minutos.

Después de esterilizado el medio de cultivo, el Erlenmeyer contendió el medio de cultivo

esterilizado, se trasladó a la cámara de flujo laminar en donde se procedió a colocar en cajas de Petri de plástico estériles 20 ml del medio de cultivo.

#### **b. Preparación del medio de cultivo Knudson “C” Modificado**

Para preparar el medio de cultivo Knudson “C” Modificado fueron utilizadas las soluciones concentradas de este medio, en el cuadro 5A se muestra el volumen de cada una de las soluciones concentradas que fueron agregadas por litro de medio de cultivo preparado.

En un Erlenmeyer se procedió a agregar el 60 % de agua desmineralizada del volumen total del medio de cultivo que se preparó, posteriormente fueron agregadas las soluciones concentradas del medio Knudson en el orden siguiente: macronutrientes “A”, macronutrientes “B”, micronutrientes “A”, Solución de KI, micronutrientes “B” y solución de Hierro. Después de agregar cada una de las soluciones concentradas se procedió a agitar el medio de cultivo en preparación. Posteriormente fue agregada sacarosa de la cual se agregó el 2 % en relación al volumen preparado. La solución fue vertida en una probeta graduada y se aforó a la cantidad preparada. Previamente se extrajo agua de coco, la cual se filtró utilizando para el papel filtro y un embudo, se agregó al medio 100 ml por litro de medio de cultivo preparado.

Luego se procedió a colocar el medio de cultivo preparado en un beaker y a establecer el pH, para ello se utilizó un potenciómetro, el pH fue ajustado a 5.5 utilizando para ello NaOH o HCL. Después se dividió la solución en partes de 250 ml, los que fueron colocados en un Erlenmeyer de 500 ml, se procedió a agregar al medio agar, del cual se agregó el 0.6% en relación al volumen preparado, luego los Erlenmeyers fueron cubiertos con papel aluminio en la parte superior y colocado en la autoclave para ser esterilizado a 120 °C, 15 psi por 15 minutos.

Después de esterilizado el medio de cultivo, los Erlenmeyers conteniendo el medio de cultivo esterilizado, se trasladaron a la cámara de flujo laminar en donde se procedió a colocar en cajas de Petri de plástico estériles 20 ml del medio de cultivo.

### **c. Preparación del medio de cultivo Archila**

Para la preparación del medio de cultivo Archila, cuyos componentes se muestran en el cuadro 6A se procedió de la forma siguiente: en un Erlenmeyer se colocó el 60 % de agua desmineralizada del volumen total a preparar, posteriormente se agregó sacarosa al 3 % en relación al volumen preparado, ésta fue disuelta, luego se agregó 2.5 ml por litro del producto comercial Bayfolan Forte®, después se procedió a triturar una pastilla de tiamina de 300 mg, cantidad utilizada para un litro de solución, la cual fue agregada al medio. Previamente se extrajo agua de coco, la cual se filtró utilizando para ello papel filtro y un embudo, se agregó al medio 150 ml por litro de medio de cultivo preparado. Se agregó posteriormente 2 g por litro de carbón activado, se procedió a verter el medio de cultivo a una probeta en la cual se aforo a 1000 ml.

Luego se procedió a colocar el medio de cultivo en un beaker y establecer el pH, para ello se utilizó un potenciómetro, el pH fue ajustado a 5.5 utilizando para ello NaOH o HCL. Después se dividió la solución en partes de 250 ml, los que fueron colocados en un Erlenmeyer de 500 ml, se procedió a agregar al medio agar al 0.6 % en relación al volumen, luego el Erlenmeyer fue cubierto con papel aluminio en la parte superior y colocado en la autoclave para ser esterilizado a 120 °C 15 psi por 15 minutos.

Después de esterilizado el medio de cultivo, el Erlenmeyer conteniendo el medio de cultivo esterilizado, se trasladó a la cámara de flujo laminar en donde se procedió a colocar en cajas de Petri de plástico estériles 20 ml del medio de cultivo.

#### **d. Preparación del medio de cultivo Morel**

Para preparar el medio de cultivo Morel fueron utilizadas las soluciones concentradas de este medio, en el cuadro 7A se muestra la cantidad de cada una de las soluciones concentradas que fueron agregadas por litro de medio de cultivo preparado.

En un Erlenmeyer se procedió a agregar el 60 % de agua desmineralizada del volumen total del medio de cultivo que se preparó, posteriormente fueron agregadas las soluciones concentradas del medio Morel en el orden siguiente: macronutrientes "A", macronutrientes "B", micronutrientes "A", micronutrientes "B", Solución de Ioduro de Potasio y solución de Hierro. Después de agregar cada una de las soluciones concentradas se procedió a agitar el medio de cultivo en preparación. Posteriormente fue agregada sacarosa al 2 % en relación al volumen total preparado. La solución fue vertida en una probeta graduada y se aforó a la cantidad preparada.

Luego se procedió a colocar el medio de cultivo en un beaker y establecer el pH, para ello se utilizó un potenciómetro, el pH fue ajustado a 5.5 utilizando NaOH o HCl. Después se dividió la solución del medio de cultivo en partes de 250 ml, los que fueron colocados en un Erlenmeyer de 500 ml, se procedió a agregar al medio agar, el cual se agregó al 0.4 % en relación al volumen total preparado, luego los Erlenmeyers fueron cubiertos con papel aluminio en la parte superior y colocados en la autoclave para ser esterilizado a 120 °C, 15 psi por 15 minutos.

Después de esterilizado el medio de cultivo, los Erlenmeyers conteniendo el medio de cultivo esterilizado, se trasladaron a la cámara de flujo laminar en donde se procedió a colocar en cajas de Petri de plástico estériles 20 ml del medio de cultivo.

### C. Condiciones de cultivos en área de incubación

El área de incubación mantuvo luz artificial mediante lámparas fluorescentes de luz blanca de 2000 lux de intensidad, la temperatura fue de 21 – 25 °C con foto período de 16 horas.

#### 5.2.3 Esterilización y trasvasado de los medios de cultivo para la germinación de semillas

Una vez preparados los medios de cultivo para la germinación de semillas de orquídea, se procedió a su esterilización, para ello se colocaron en una autoclave por 20 minutos a 15 psi y 121 °C. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, fueron colocados 20 ml de medio estéril en cada caja de Petri estéril.

Las cajas de Petri con medio de cultivo fueron selladas con Papel Parafilm, después fueron trasladadas al cuarto de incubación hasta su utilización. La figura 4 muestra las cajas de Petri antes de la siembra de semillas de orquídea.



Fuente: Elaboración propia, 2015

Figura 4 Cajas de Petri conteniendo medio para la germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

#### **5.2.4 Desinfección de las semillas de orquídea con capsula abierta**

Para la desinfección de semillas de orquídea se utilizó la metodología siguiente: Con papel filtro se elaboraron bolsas en donde se colocaron las semillas de orquídea.

Dentro de la cámara de flujo laminar se colocaron 500 ml de etanol al 70 % en un beaker de 500 ml. Se colocaron por 15 segundos las tres bolsas de papel filtro que contenían las semillas de orquídea dentro del beaker que contenía alcohol al 70 %, luego las bolsas de papel filtro con las semillas se lavaron con agua desmineralizada estéril tres veces.

Posteriormente en otro beaker de 500 mm se colocó una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %, en esta solución fueron colocadas las bolsas, conteniendo las semillas de orquídea, por ocho minutos. Luego, las bolsas conteniendo las semillas de orquídea, fueron lavadas tres veces con agua desmineralizada estéril.

Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, en un beaker de 500 ml se colocó 100 ml de agua desmineralizada estéril, las bolsas de papel filtro fueron abiertas y colocadas las semillas de orquídea en el agua contenida en el beaker, éste fue agitado lentamente.

#### **5.2.5 Cuantificación de semillas de *L. lasioglossa*.**

La cuantificación de semillas de *L. lasioglossa* se realizó con la ayuda de un microscopio y un hematocitómetro para ello se realizó el procedimiento siguiente:

Del beaker que contenía semillas de orquídea desinfectadas en suspensión se procedió a extraer, con una jeringa estéril, 10 ml. Para ello se utilizaron 10 jeringas de 5 ml cada una, se extrajo un mililitro de agua con semillas en suspensión con cada jeringa.

En un hematocitómetro se procedió a colocar un mililitro de agua con semillas en suspensión, posteriormente se procedió, con la ayuda de un microscopio a una resolución

de 100X, a contar el número de semillas de orquídea que se observaban en el hematocitómetro.

Se realizaron 10 conteos de un mililitro de agua con semillas de orquídea en suspensión, se obtuvo el promedio de los conteos realizados. En la figura 5 se muestra las semillas de *L. lasioglossa* observadas en el hematocitómetro a 100X.



Fuente: Elaboración propia, 2015

Figura 5 Semillas de *L. lasioglossa* en el hematocitómetro a 100x.

### **5.3 Manejo general de los experimentos**

#### **5.3.1 Determinación de la especie**

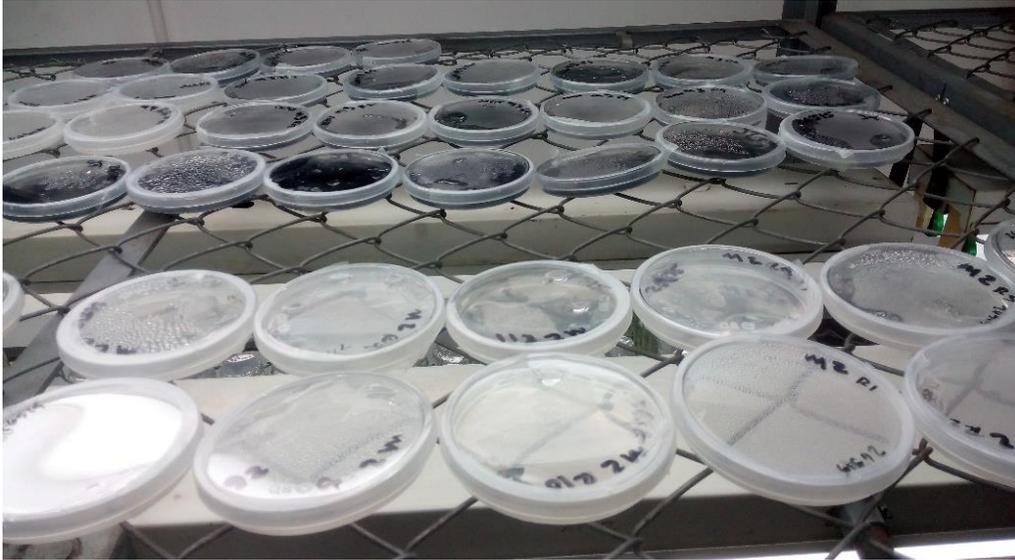
Se obtuvo la especie *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. de una colección privada perteneciente a un reconocido orquídeologo (Fredy Archila), Para confirmarla se determinó la misma mediante el uso de claves botánicas (Ames, Corel, 1985).

#### **5.3.2 Evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de *L. lasioglossa*.**

En la primera fase de la investigación se evaluó cuatro medios de cultivo para la germinación de semillas de orquídea *L. lasioglossa* para lo cual se procedió de la forma siguiente:

En la cámara de flujo laminar después de desinfectar y colocar en suspensión las semillas de *L. lasioglossa*, se utilizó una jeringa estéril de cinco mm, con la cual se extrajo un mililitro de agua con semillas de orquídea en suspensión, ésta fue esparcida en las cajas Petri que contenían los tratamientos que se evaluaron para la germinación de semillas.

Las cajas de Petri fueron selladas con papel Para Film, identificadas de acuerdo al tratamiento y repetición, posteriormente llevadas al cuarto de incubación en donde se colocaron de acuerdo a la distribución previamente establecida para un diseño experimental completamente al azar. En la figura 6 se muestran las cajas de Petri distribuías en el cuarto de incubación.



Fuente: Elaboración propia, 2016

Figura 6 Cajas de Petri distribuidas en diseño completamente al azar en la evaluación de medios de cultivo para la germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

### 5.3.3 Evaluación de medios de cultivo para el crecimiento inicial de planta de *L. lasioglossa*

En la segunda fase de la investigación se evaluó el crecimiento inicial de plantas de la orquídea *L. lasioglossa*, se evaluaron los medios Archila y Knudson "C", los cuales mostraron los más altos porcentajes de germinación de semillas.

#### A. Traslado de semillas germinadas.

Luego de la germinación de semilla se procedió el traslado de las mismas a las cajas de Petri que contenían los medios para el crecimiento inicial de plantas, se siguió la metodología siguiente:

En la cámara de flujo laminar debidamente desinfectada se colocaron las cajas de Petri identificadas con los dos medios de cultivo que se evaluaron, para realizar el traslado de semillas germinadas

Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a trasladar tres semillas germinadas a cada caja de Petri.

Luego en las cajas de Petri se anotó el medio de procedencia de las semillas germinadas transferidas a ellas y la fecha de transferencia, posteriormente se trasladaron al cuarto de incubación en donde se ubicaron de acuerdo a la distribución previamente establecida, en función del diseño completamente al azar.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Número de semillas en suspensión por mililitro de agua

El número de semillas de *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. en suspensión en un mililitro de agua fue de 665 semillas. Dato utilizado para determinar el porcentaje de germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

### 6.2 Efecto de medios de cultivo en la germinación de semilla de *L. lasioglossa*

En la evaluación de los cuatro medios de cultivo para la germinación de semilla de *L. lasioglossa* el medio de cultivo que mostró el porcentaje más alto de germinación fue el medio desarrollado por Archila, con el cual se obtuvo el 61.05 % de germinación, seguido del Medio de cultivo Knudson "C" Modificado con 58.92 % de germinación, luego el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con el 24.75 % de germinación y el medio de cultivo con menos respuesta en el porcentaje de germinación fue el medio de cultivo Morel 1965 con 18.18 % de germinación. Los datos muestran diferencia significativa al 0.05 (cuadro 9A). En la figura 7 se muestran los resultados del porcentaje de la germinación de semillas de la orquídea *L. lasioglossa*.

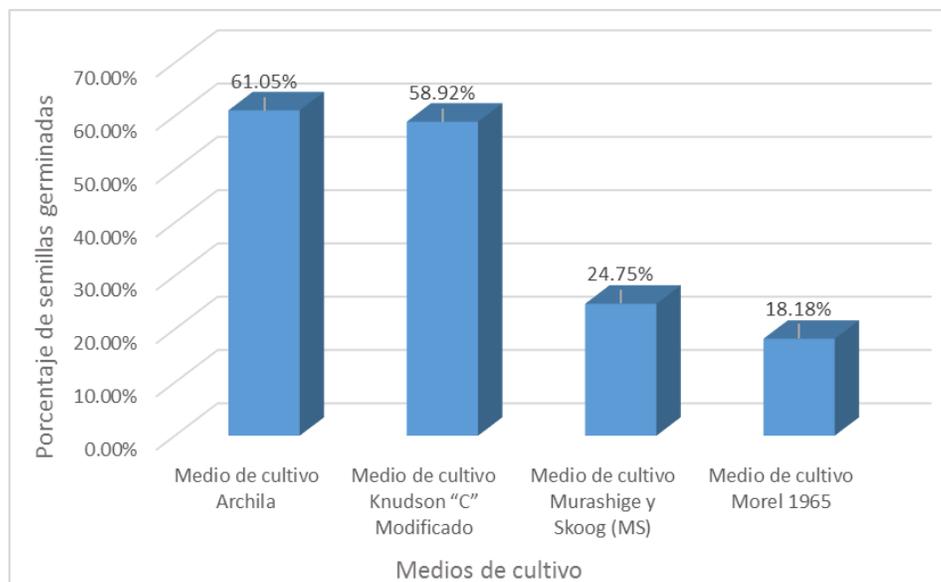


Figura 7 Efecto de medios de cultivo en la germinación de semillas de la orquídea *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.

Al realizar el análisis de comparación de medias utilizando el criterio de la prueba de Tukey, se observa que el medio de cultivo Archila y medio de cultivo Knudson "C" Modificado se encuentran en el grupo "A" donde muestra que estadísticamente son iguales y el medio de cultivo MS y medio de cultivo Morel se encuentran en el grupo "B" mostrando que no hay diferencia significativa entre los dos medios de cultivo. En el cuadro 10A muestra el cuadro de Tukey con las medias germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

Los medios de cultivo utilizados para la germinación de semilla, fueron seleccionados debido a investigaciones realizadas para propagación de orquídeas (Rodríguez, 2007; Feria, 2007), sin embargo se observó un alto porcentaje de germinación con el medio de cultivo Archila donde los macronutrientes y micronutrientes son proveídos por el producto comercial de Bayfolan Forte®, a diferencia del medio de cultivo Knudson "C" Modificado que son agregados mediante soluciones concentradas. Según Azofeita, Guevara y Jiménez (2008) se pueden obtener resultados aceptables en la utilización de productos foliares en los medios de cultivo, utilizando otras alternativas y permitiendo disminuir costos en la producción.

### **6.3 Efecto de medios de cultivo en el crecimiento de planta de *L. lasioglossa***

Las plantas de *L. lasioglossa* mostraron mayor crecimiento inicial, expresado en tamaño de protocormo con la primera hoja, en el medio de cultivo Archila, el cual fue de 5.7 mm. En el medio de cultivo Knudson "C" Modificado se observó un menor crecimiento de las plantas de *L. lasioglossa*, en este medio el tamaño de planta, considerado el tamaño del protocormo y la primera hoja, fue de 4.2 mm.

Existe diferencia estadística significativa al 0.05 (cuadro 11A para el efecto de los medios de cultivo en el crecimiento inicial de *L. lasioglossa*). En la figura 8 se muestra el efecto de los medios de cultivo Archila y Knudson "C" Modificado en el crecimiento inicial de *L. lasioglossa*.

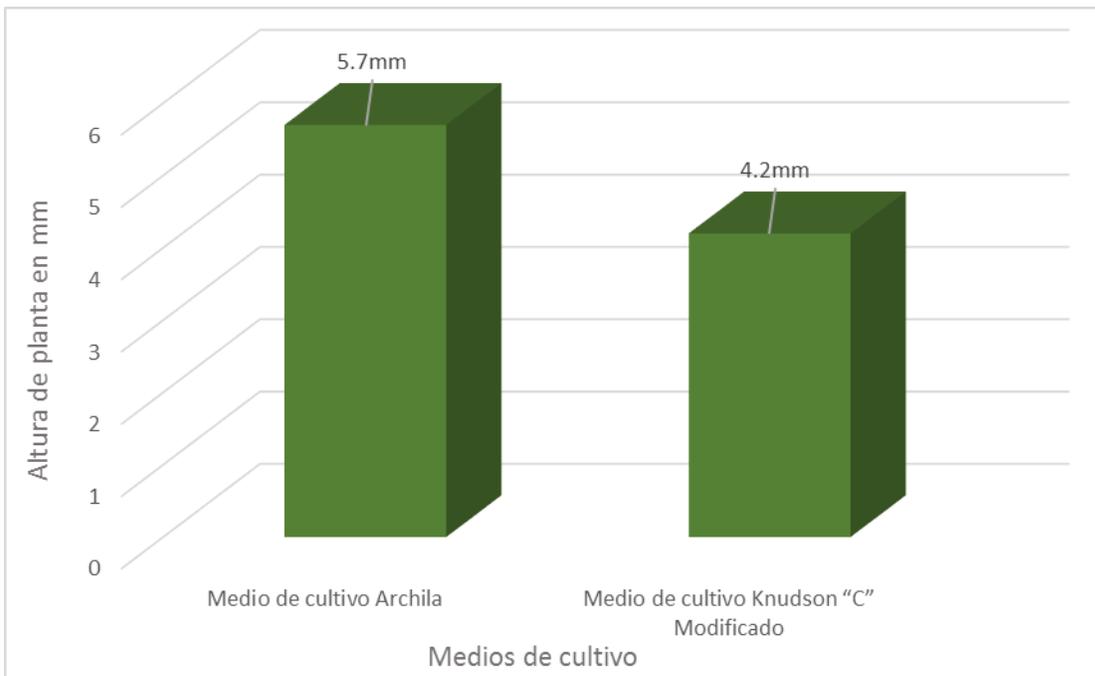


Figura 8 Efecto de los medios Archila y Knudson "C" Modificado en el crecimiento inicial de *L. lasioglossa*.

#### 6.4 Efecto de medios de cultivo en la germinación de semilla y crecimiento inicial de *L. lasioglossa*

El medio de cultivo Archila mostró mayor efecto en la altura de planta (protocormo con primera hoja) cuando las semillas fueron germinadas en este medio y trasladadas a este mismo medio para su crecimiento inicial; su altura fue de 8.21 mm.

El segundo tamaño en altura de planta (6.94 mm) se observó cuando las semillas de *L. lasioglossa* fueron germinadas en el medio de cultivo Archila y trasladadas para su crecimiento al medio Knudson "C" Modificado. Por otra parte el tercer tamaño de altura de planta (6.52 mm) se observó cuando las semillas fueron germinadas en el medio de cultivo Knudson "C" Modificado y trasladadas para su crecimiento al medio de cultivo Archila.

Cuando se utilizó el medio de cultivo MS como medio de germinación y el medio de cultivo Archila como medio de crecimiento el tamaño de las plantas de *L. lasioglossa* fue de 4.63 mm. Las plantas germinadas en el medio Knudson y trasladadas al mismo medio mostraron un tamaño de 4.02 mm.

Las plantas de *L. lasioglossa* que se originaron de la germinación de sus semillas en el medio de cultivo Morel trasladadas para su crecimiento inicial al medio de Archila mostraron un tamaño de 3.73 mm

El menor tamaño de plantas de *L. lasioglossa* (3.83 mm) se observó cuando las semillas fueron germinadas en el medio MS y trasladadas para su crecimiento inicial al medio Knudson "C" Modificado y cuando las semillas fueron germinadas en el medio Morel y trasladadas para su crecimiento al medio de cultivo Knudson "C" Modificado, en este último caso el tamaño de planta fue de 2 mm. En la figura 9 puede apreciarse la altura de plantas en mm de los efectos entre los medios de cultivo de germinación de semilla y medios de cultivo de crecimiento de *L. lasioglossa*. Se realizó una comparación de medias utilizando el criterio de Tukey que se encuentra en el cuadro 12A.

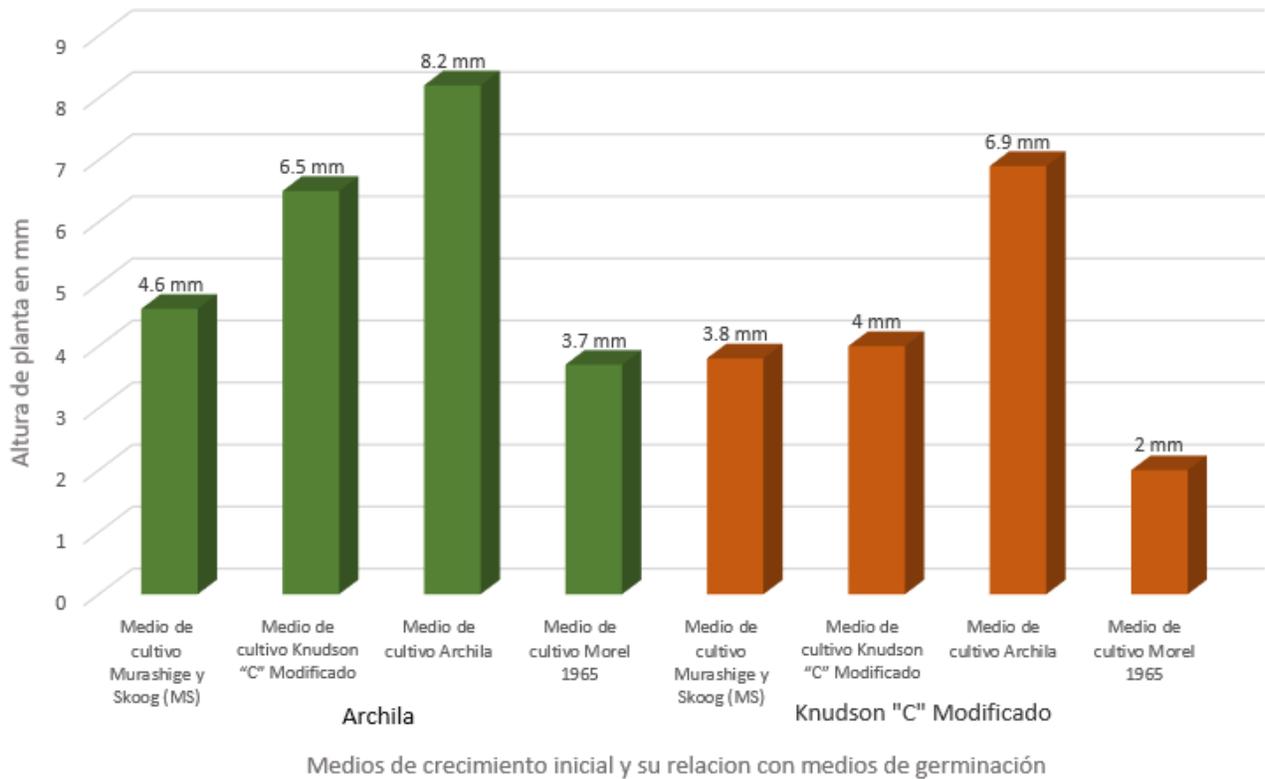


Figura 9 Altura de plantas en centímetros de los efectos entre los medios de cultivo de germinación de semilla y medios de cultivo de crecimiento de *L. lasioglossa*.

Cabe mencionar que el medio de cultivo Knudson "C" Modificado ha sido utilizado en otras investigaciones para la propagación de orquídeas (Archila, 1996; Mayo 2008; Molina 2012; Rodríguez 2007), sin embargo el medio de cultivo Archila es más efectivo para la propagación de *L. lasioglossa*.

El medio de cultivo Archila se diferencia del medio de cultivo Knudson "C" Modificado en los aspectos siguientes: el medio Archila a diferencia del medio Knudson tiene en sus componentes carbón activado al 0.2 %, contiene 300 mg/l de Tiamina, los macronutrientes y micronutrientes son proveídos por el fertilizante comercial Bayfolan Forte®. En el cuadro 8A se presentan las diferencias entre los medios antes referidos.

El medio de cultivo Archila con los resultados que se obtuvieron en *L. lasioglossa* es una alternativa al uso de fertilizantes foliares como fuente de macronutrientes y

micronutrientes en los medios de cultivo de orquídeas. Azofeita, Guevara y Jiménez (2008) evaluaron en cultivo *in vitro* de papa fertilizantes foliares para sustituir, en la misma concentración, los macronutrientes y micronutrientes del medio MS. Habiendo obteniendo resultados satisfactorios en dos de los fertilizantes foliares evaluados, además reportan una disminución significativa del costo de los medios de cultivo al utilizar fertilizantes foliares como fuente de nutrientes.

El medio de cultivo Archila y medio de cultivo Knudson "C" Modificado estadísticamente son iguales no mostrando diferencia significativa en la respuesta de germinación de semillas de *L. lasioglossa*, pero los componentes el medio de cultivo Archila son fáciles de obtener en el mercado local y de bajo costo, con lo cual se reduce el costo de preparación del medio de cultivo.

Esta forma de germinación asimbiótica de semillas de orquídeas puede ser una alternativa en la reproducción de especie en peligro de extinción, debido a que contribuye en la conservación de la variabilidad genética de la flora en Guatemala.

## 7. CONCLUSIONES

- 7.1 En la germinación de semillas de *Lycaste. lasioglossa* Rchb.f. los medios de cultivo MS y Morel 1965 son menos efectivos, los medios de cultivo Archila y Knudson "C" modificado son más efectivos en el porcentaje de germinación de semilla de la orquídea *L. lasioglossa* Rchb.f., sin embargo los componentes del medio de cultivo Archila son más accesibles y de bajo costo.
- 7.2 El medio de cultivo Archila es más efectivo en el crecimiento inicial de la orquídea *Lycaste. lasioglossa* Rchb.f en comparación con el medio de cultivo Knudson "C" Modificado.
- 7.3 El medio de cultivo Archila es efectivo en la germinación de semillas y el crecimiento inicial de plantas de *Lycaste. lasioglossa* Rchb.f.

## 8. RECOMENDACIONES

- 8.1 Utilizar el medio de cultivo Archila para la germinación de semillas y el crecimiento inicial de la orquídea *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.
- 8.2 Para completar el protocolo para la propagación de la orquídea *Lycaste lasioglossa* Rchb.f. se recomienda evaluar medios y sustratos para el enraizamiento, así como condiciones de aclimatación.

## 9. BIBLIOGRAFÍAS

1. Agvik, E. 2011. Enraizamiento y aclimatación de plántulas de *Vanilla planifolia* Andrews, provenientes de cultivo de tejidos con fines de conservación. Tesis Lic. Biol. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 69 p.
2. Ajú, MM. 2009. Las orquídeas bases generales para su conocimiento y enseñanza. (en línea) Tesis MA. Docencia Universitaria. Guatemala, USAC. Facultad de Humanidades. Estudio de Postgrado 78 p. Consultado 5 set 2016. Disponible en: [www.repositorio.usac.edu.gt/1621/1/07\\_2092.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/1621/1/07_2092.pdf)
3. Ames, O; Correll, DS. 1985. Orchids of Guatemala. Chicago, US, Chicago Natural History Museum, Fieldiana: Botany, v. 26, 2 pte.
4. Ammirato, P; Evans, D; Sharp, W. 1990. Hand book of plant cell culture ornamental especies. New York, US, McGraw Hill, 833 p.
5. Archila Morales, EE 2000. Manual de propagación de orquídeas *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía 87 p
6. Archila, E; Fajardo, E; Duran, J. 1996. Rescate de orquídeas en peligro de extinción a partir de cultivos de tejidos. *In* Simposio Nacional sobre Cultivos de Tejidos Vegetales (1996, Guatemala). Guatemala, s.e. 129 p.
7. Archila, FL. 2011. Evaluación del género *Lycaste* Lindl. en Guatemala; un aporte al estudio de la biodiversidad Guatemalteca. Guatemala, CONCYT, Proyecto no. 64-09. 177 p.
8. Arditti, J. 1977. Orchid biology, reviews and perspectives. New York, US, Cornell University Press. v. 1, p. 177-293.
9. Azofeita, A; Guevara, E; Jiménez, VM. 2008. Uso de abonos foliares comerciales en la elaboración de medios de cultivo *in vitro*. *Agronomía Costarricense* 32(2):149-160.
10. Busso, CA. 2008. *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula*. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 77:203-215.

11. CONAP (Consejo Nacional de Áreas Protegidas, GT). 2009. Lista de especies amenazadas de Guatemala (LEA). Guatemala, CONAP, Departamento de Vida Silvestre. 124 p.
12. Cortez, M. 2014. Manual práctico de producción y manejo de orquídeas *Phalaenopsis* (en línea). El Salvador. Consultado. 5 set 2015. Disponible en: <http://www.fundesyram.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=4065>
13. Especies de orquídeas (en línea) 2008. Consultado 27 mar 2015. US. Disponible en: <http://www.orchidspecies.com/lyclasioglossa.htm>.
14. Feria, M de; Chávez, M; Quiala, E. 2007. Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*. Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas. no. 1, p. 27-33.
15. Freuler, MJ. 2008 Orquídeas (en línea). Argentina. Albatros. 47 p. Consultado 18 mar 2015. Disponible en: <https://books.google.com.gt/books?id=SjFbL4qd9-MC&pg=PA8&dq=caracteristicas+de+las+orquideas&hl=en&sa=X&ei=nP8JVczbMqi1sATYp4HoBg&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=caracteristicas%20de%20las%20orquideas&f=false>
16. Generalidades de las orquídeas (en línea) 2014. España. Consultado 18 mar 2015. Disponible en: <http://www.cao.org.es/Documentos/cultivo/fichalycaste.htm>.
17. Gonzales, HE. 2002. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de monja blanca (*Lycaste Skinneri* var. Alba). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 5-6.
18. Hurtado, DV; Merino M, ME. 1991 Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
19. Hutner, SH. 1953 Comparative physiology of heterotrophic growth in plants. *In*: Growth and differentiation in plants. Loomis WE. (ed). Ames, Iowa, US, Iowa State College Press. 458 p.
20. López, PC. 1990. Medios de cultivo. *In* Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. Rosell, HC. y Villalobos, AV. P. 15-20. (Estudio FAO, Producción y protección vegetal. 105).

21. Lucas, F. 2015. Propagación de orquídeas con métodos convencionales. (Entrevista). Cobán, Alta Verapaz, Guatemala, Vivero Dephey.
22. Mayo, A; Cázares, JG; Cruz, E De la; Flores, A. 2008. Informe final: proyecto conservación y propagación de orquídeas de Tabasco. México, Fondo Sectorial / SAGARPA / CONACYT. 34 p.
23. McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba, Honduras, Ceiba Foundation for Tropical Conservation. p 4,5.
24. Molina, JC. 2012. Evaluación de cinco medios de cultivo Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y casero, y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Compartmentia speciosa* Rchb. F. Ecuador, Universidad de la Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. p. 130-135.
25. Ordoñez, M. 2003. Propagación *in vitro* de *Mammillaria vobuernesensis* Scheer. Tesis Lic Biol. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 70 p.
26. Pierik, RLM. 1988. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, 3 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 326 p.
27. Pizarro, F. 2012. Cultivo de tejidos vegetales. México, UNAM. p. 14- 25.
28. Rodríguez, L; Gonzales, R; Alvarado, K; Telles, E. 2007. Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres. El Salvador, Centro de Desarrollo de la Montaña. 13 p.
29. Supliguicha, PE; Vera, S. 2015. Evaluación del crecimiento *in vitro* de plantulas de orquídea *Dacyglossum edwardii* en medios de cultivo simples con suplementos orgánicos frente a medio de cultivo Murashige y Skoog modificado como testigo. Ecuador, Universidad de la Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas. p. 45-57
30. Thakur, U; Dongarwar, N. 2013. A new report of *in vitro* flowering and multiple shooting in a wild epiphytic orchid *Oberonia recurva* Lindl. from asymbiotically germinated seedlings (en línea). Plant Knowledge Journal 2(3):113-118. Consultado 10 jun 2016. Disponible en:  
[http://www.sciencej.com/dongawar\\_2\\_3\\_2013\\_113\\_118.pdf](http://www.sciencej.com/dongawar_2_3_2013_113_118.pdf).

31. UJCM (Universidad José Carlos Mariátegui, PE). 2009. Estadística experimental, estadística agrícola. Moquegua, Perú, Escuela Profesional de Ingeniería Agrícola, Experimentación Agrícola. p. 11- 45

## 10. ANEXOS

### Anexo 1

Cuadro 4A Componentes, concentración de soluciones y cantidad de solución concentrada utilizada para preparar un litro de medio de cultivo Murashige y Skoog.

<b>Murashige y Skoog Modificado Agua de coco</b>				
	<b>Componentes</b>	<b>Cantidad/l</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad de solución concentrada/litro de medio de cultivo</b>
Macronutrientes "A"	(NH <sub>4</sub> ) NO <sub>3</sub>	1650 mg	10X	100 ml
	KNO <sub>3</sub>	1900 mg		
	CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	440 mg		
Macronutrientes "B"	MgSO <sub>4</sub> 7h <sub>2</sub> o	370 mg	10X	100 ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	170 mg		
Hierro y Sodio	FeSO <sub>4</sub> 7h <sub>2</sub> o	27.8 mg	50X	20 ml
	Na <sub>2</sub> EDTA	33.6 mg		
Micronutrientes "A"	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22.3 mg	1000X	1 ml
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6 mg		
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg		
Ioduro de Potasio	KI	0.83 mg	100X	10 ml
Micronutrientes "B"	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25 mg	1000X	1 ml
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025 mg		
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg		
Hormonas y Vitaminas	Mio_inositol	100 mg	100X	10 ml
	Acido nicotínico	0.5 mg	1000X	1 ml
	Piridoxina- Hcl	0.5 mg		
	Tiamina- HCl	0.1 mg		
	Glicina	2 mg		
	<b>Agua de coco</b>	<b>200 ml</b>		

Fuente: (Hurtad, Merino,1991)

## Anexo 2

Cuadro 5A Componentes, concentración de soluciones y cantidad de solución concentrada utilizada para preparar un litro de medio de cultivo Knudson "C" Modificado.

<b>Knudson "C" Modificado</b>				
	<b>Componentes</b>	<b>Cantidad/l</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad de solución concentrada/litro de medio de cultivo</b>
<b>Macroelementos "A"</b>	Ca (NO) <sub>3</sub> 4 H <sub>2</sub> O	1000 mg	10X	100 ml
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 mg		
<b>Macroelementos "B"</b>	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	250 mg	10X	100 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 mg		
<b>Hierro</b>	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.8 mg	50X	20 ml
<b>Sodio</b>	Na EDTA	37.3 mg		
<b>Micronutrientes "A"</b>	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22.3 mg	1000X	1 ml
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6 mg		
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg		
<b>Micronutrientes "B"</b>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25 mg	1000X	1 ml
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025 mg		
	CoCL <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg		
<b>Regulador de Crecimiento</b>	Agua de coco	100 ml		
<b>Sacarosa</b>	Azucar	20000 mg		

Fuente: Arditti, Joseph, 1977

## Anexo 3

Cuadro 6A Componentes y cantidad utilizada por litro de medio de cultivo Archila

<b>Medio de Cultivo Archila</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad por Litro</b>
Carbón Activado	2 g
Agua de Coco	100 ml
Azúcar	30 g
Bayfolan Forte®	2.5 ml
Tiamina Pastilla	300 mg

Fuente: Archila, 2015

## Anexo 4

Cuadro 7A Componentes, concentración de soluciones y cantidad de solución concentrada utilizada para preparar un litro de medio de cultivo Morel 1965.

<b>Morel 1965</b>				
	<b>Componentes</b>	<b>Cantidad/l</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad de solución concentrada/litro de medio de cultivo</b>
<b>Macronutrientes "A"</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1000 mg	10X	100 ml
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	125 mg		
<b>Macronutrientes "B"</b>	KNO <sub>3</sub>	125 mg	10X	100 ml
	KCL	500 mg		
	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	500 mg		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125 mg		
<b>Micronutrientes "A"</b>	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	1 mg	1000X	1 ml
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1 mg		
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.03 mg		
	KI	0.01 mg	100X	10 ml
<b>Micronutrientes "B"</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mg	1000X	1 ml
	ALCL <sub>3</sub>	0.03 mg		
	NiCL <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.03 mg		
<b>Hierro</b>	FeCL <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	1 mg	50X	5 ml
<b>Sacarosa</b>	Azucar	20000 mg		

Fuente: Arditti, Joseph, 1977

## Anexo 5

Cuadro 8A Comparación de los componentes de los Medios de Cultivo Archila y Knudson "C" Modificado.

Medio de Cultivo Archila			Medio de Cultivo Knudson "C" Modificado		
	Componentes	Cantidad/l	Componentes		Cantidad/l
<b>Bayfolan Forte®</b>	Ca	0.625 mg	<b>Macronutrientes "A"</b>	Ca(NO) <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O	1000 mg
	N	275 mg		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>	500 mg
	S	3.75 mg			
	K <sub>2</sub> O	124.47 mg	<b>Macronutrientes "B"</b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250 mg
	Mg	1.375 mg		KH <sub>2</sub> .PO <sub>4</sub>	250 mg
	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	87.33 mg			
	Fe	1.25 mg	<b>Hierro</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8 mg
			<b>Sodio</b>	Na EDTA	37.3 mg
	Mn	1 mg	<b>Micronutrientes "A"</b>	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3 mg
	Zn	2 mg		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6 mg
	B	1 mg		H <sub>3</sub> .BO <sub>3</sub>	6.2 mg
	Mo	0.125 mg	<b>Micronutrientes "B"</b>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25 mg
	Co	0.05 mg		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025 mg
	Cu	1 mg		CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025 mg
	Ácido indolacético	0.075 mg			
Clorhidrato de tiamina	0.1 mg				
<b>Agua de Coco</b>	100 ml	<b>Componente orgánico</b>	Agua de coco	100 ml	
<b>Azúcar</b>	30 g	<b>Azúcar</b>	Sacarosa	20 g	
<b>Tiamina Pastilla</b>	300 mg				
<b>Carbón Activado</b>	2 g				

Fuente: Elaboración Propia, 2016

## Anexo 6

Cuadro 9A Resumen del análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

**Análisis de la varianza**

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> Aj</b>	<b>CV</b>
Porcentaje de Semillas Ger	24	0.84	0.82	22.77

**Cuadro de Análisis de la Varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Medios de Cultivo	9044.22	3	3014.74	35.05	<0.0001
Error	1720.33	20	86.02		
Total	10764.55	23			

## Anexo 7

Cuadro 10A Resumen de la prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey para la germinación de semillas de *L. lasioglossa*.

<b>Medios de Germinación</b>	<b>Porcentaje de germinación</b>	<b>Grupo Tukey</b>
Archila E.	61.05	A
Knudson "C" Modificado	58.92	A
Murashige y Skoog (MS)	24.75	B
Morel 1965	18.18	B

## Anexo 8

Cuadro 11A Resumen de análisis de varianza para la variable altura de planta en los medios de cultivo de germinación de semilla y crecimiento inicial de planta de *L. lasioglossa*.

**Análisis de la varianza**

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> Aj</b>	<b>CV</b>
Altura de planta	64	0.87	0.85	16.1

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Medios de crec. inicial	38.91	1	38.91	60.55	<0.0001
Medios de ger	189.23	3	63.08	98.16	<0.0001
Interaccion	6.18	3	2.06	3.21	0.0299
Error	35.98	56	0.64		
Total	270.3	63			

## Anexo 9

Cuadro 12A Resumen de la prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey para la altura de planta en los medios de cultivo para la germinación de semillas a medios de cultivo para crecimiento de plantas de *L. lasioglossa*.

<b>Medios de germinación</b>	<b>Medios de crecimiento</b>	<b>Altura de planta en mm</b>	<b>Grupo Tukey</b>
Archila E.	Archila E.	8.2	A
Archila E.	Knudson "C" Modificado	6.9	B
Knudson "C" Modificado	Archila E.	6.5	B
Murashige y Skoog (MS)	Archila E.	4.7	C
Knudson "C" Modificado	Knudson "C" Modificado	4	C
Murashige y Skoog (MS)	Knudson "C" Modificado	3.8	C
Morel 1965	Archila E.	3.7	C
Morel 1965	Knudson "C" Modificado	2	D

## Anexo 10

Cuadro 13A Datos del porcentaje de semillas germinadas de orquídea *L. lasioglossa*.

Medios de cultivo	Porcentaje de semillas germinadas
M1	27.5
M2	64.8
M3	42.9
M4	11.7
M1	29.5
M2	63.3
M3	58.5
M4	8.6
M1	25.2
M2	39
M3	70
M4	12.9
M1	19.4
M2	57.3
M3	58
M4	14.4
M1	19.1
M2	68.9
M3	64.4
M4	29
M1	27.8
M2	60.2
M3	72.5
M4	32.5

## Anexo 11

Cuadro 14A Datos de la altura de planta de *L. lasioglossa* en milímetros.

		Repeticiones							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Archila	MS	4	4	3.2	4.5	5.7	5.7	4.5	5.5
	Kdunson	7.2	5.7	6.5	6.7	6.8	7	6	6
	Archila	8.7	7.8	9.5	8.3	8	7.8	8.2	7.3
	Morel	3.8	3.8	5.3	3.2	3.3	4.2	2.8	3.3
Knudson "C"	MS	4	5	3.7	4.7	4.5	2.7	3.5	2.7
	Kdunson	5	4.8	4.3	4.5	4	3	3.7	2.8
Modificado	Archila	7.8	6.8	7.5	5	5.7	7.2	7	8.5
	Morel	2.5	2.5	2.3	1	1.5	2.2	1.7	2.3