

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

Establecimiento de un método de limpieza, siembra y germinación
in vitro de cinco especies de orquídeas y su introducción a un banco de semillas en el
Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por
María Priscila Juárez Barrios para optar al grado académico de Licenciada en Biología
Guatemala

2014

Establecimiento de un método de desinfección, siembra y germinación
in vitro de cinco especies de orquídeas y su introducción a un banco de semillas en el
Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

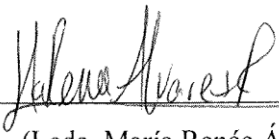
Establecimiento de un método de desinfección, siembra y germinación
in vitro de cinco especies de orquídeas y su introducción a un banco de semillas en el
Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por
María Priscila Juárez Barrios para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala

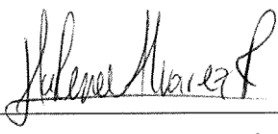
2014

Vo. Bo. Asesor principal:

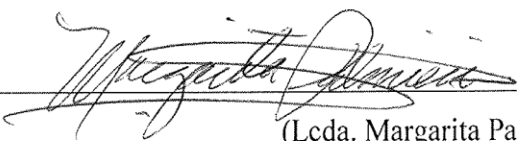
(f) 

(Lcda. María Renée Álvarez)

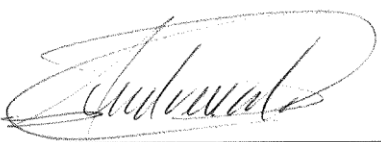
Tribunal Examinador:

(f) 

(Lcda. María Renée Álvarez)

(f) 

(Lcda. Margarita Palmieri)

(f) 

(Lic. Andrés Ávalos)

Fecha de aprobación: Guatemala 8 de diciembre 2014.

PREFACIO

El presente trabajo de graduación tuvo origen durante el “Taller de Prácticas Profesionales” en el año 2012 donde empecé a trabajar con la tinción de semillas de orquídeas para comprobar viabilidad, almacenadas en el laboratorio. Terminando así en el año 2013 las prácticas. Es así como surgió el tema inicial de la tesis, sembrar las 70 especies almacenadas. De todas estas especies no germinó ninguna; esto me puso a pensar si es cuestión de almacenamiento o la poca viabilidad de las semillas. Después de un año de no ver germinación, seguí el tema, sembrando nuevas especies e iniciar el procedimiento ya por mi persona, también elegí cinco especies que tuvieran en ese momento cápsulas disponibles para poder sembrarlas. Elegí nuevos medios de cultivo y métodos de desinfección de cápsula (procedimiento que nadie hace por especie). Así, desde el inicio, empezó a germinar, lo cual fue una experiencia muy satisfactoria porque todo lo hice yo, y así, la investigación y largos tiempos en el laboratorio valieron la pena por completo.

Quiero agradecer a la Licda. Ma. Renée Álvarez por su paciencia con cada párrafo leído, con escuchar cada obstáculo y por calmarme siempre en el proceso de estos dos años de realizar este trabajo. A la Licda. M. Palmieri por apoyarme siempre en toda la carrera, por alentarme a seguir y no juzgarme por haberme atrasado nunca, por sus sugerencias para la tesis y estar pendiente de mi trabajo. Gracias a mis papás Víctor Hugo y Vilma por apoyarme en el camino, tanto económicamente como de apoyo, cariño y orgullo. A mi hermano por estar siempre pendiente de mí, como siempre, por presionarme. Gracias a muchos de mis amigos por estar conmigo en toda la carrera (Amalia, Majo P, Eli, Willy, chiva, chino, Majo A, Tina, Olga, L3, Chofa, Zabdi, Toto, Peke, Martín, Jeffrey, Daniela, Erick, Isa, Rita, Andrea, Sara, Mile, Dra. S. Maselli), por estar pendientes del proceso con la tesis y por apoyarme en todos los años. A Licda. L. Madrazo, gracias por preocuparse siempre. A mis compañeros de laboratorio por ayudarme con alguna u otra cosa de sacar medios del autoclave y lavar material. También quiero agradecer a Phillip Seaton Investigador Asociado de Kew por su ayuda en la sugerencia de los medios de cultivo a utilizar. Así mismo, a Isabel Herrarte, María José Pérez y Mayra Maldonado por su ayuda en la obtención y clasificación de las cápsulas de orquídeas, sin ustedes no hubiera podido realizar este trabajo.

CONTENIDO

PREFACIO	IV
CONTENIDO	V
TABLA DE FIGURAS	VII
TABLA DE CUADROS.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes	2
1. Familia Orchidaceae	2
2. Germinación <i>in vitro</i>	6
3. Maduración de cápsulas	6
4. Bancos de semillas	7
B. Justificación	9
C. Objetivos	12
1. General	12
2. Objetivos específicos	12
II. METODOLOGÍA	13
A. Procedimientos	13
1. Obtención de muestra.....	13
2. Métodos de desinfección y esterilización de cápsulas	13
3. Almacenamiento	14
4. Medios de cultivo y siembra	14
5. Porcentaje de germinación y contaminación	16
6. Viabilidad.....	17
7. Análisis de datos	17
8. Diagrama de flujo.....	19
III. RESULTADOS	20
A. Germinación.....	20
1. Método de desinfección	20
2. Medio de cultivo	21
3. Especies	22
B. Contaminación.....	23
1. Método de desinfección	23
2. Medio de cultivo	24

3. Especies	25
C. Viabilidad	26
D. Introducción al banco de semillas.....	27
IV. DISCUSIÓN	28
A. Métodos y colecta	28
B. Germinación	30
1. Método de desinfección	30
2. Medio de cultivo	30
3. Especies	31
C. Contaminación.....	33
1. Método de desinfección	33
2. Medio de cultivo	34
3. Especies	35
D. Viabilidad y su relación con la germinación	35
E. Introducción de semillas al banco.....	36
V. CONCLUSIONES	37
VI. RECOMENDACIONES.....	39
VII. LITERATURA CONSULTADA	41
VIII. APÉNDICES	46
Apéndice A. Soluciones para medios de cultivo	46
Apéndice B. Análisis estadístico de germinación.....	48
Apéndice C. Análisis estadístico de contaminación	53
Apéndice D. Gráficas de germinación por especie de acuerdo al método y medios de cultivo.	56
Apéndice E. Gráficas de contaminación por especie de acuerdo al método y medios de cultivo.	57
Apéndice F. Fotografías de semillas por especie	59

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Vista frontal y lateral de <i>Cattleya</i> (Fuente: Seaton y Ramsay 2009). Representación gráfica de las partes de una flor de orquídea para su reconocimiento	4
Figura 2. Mapa conceptual de procedimiento desde colecta a siembra <i>in vitro</i> de las cinco especies de orquídeas. De cada medio de cultivo y método se calculó porcentaje de germinación y contaminación.	19
Figura 3. Porcentaje de germinación de las cinco especies de orquídeas y su promedio con tres métodos de desinfección, donde Método 1 = Tween y peróxido, Método 2 = (etanol y cloro) y Método 3 = flameo.	20
Figura 4. Porcentaje de germinación de las cinco especies y su promedio en cuatro medios de cultivo, donde Kn = Knudson.....	21
Figura 5. Gráficas de germinación de cinco especies analizadas a partir de cápsula cerrada y bajo tres métodos de desinfección.	22
Figura 6. Porcentaje de contaminación para las cinco especies y tres métodos de desinfección de cápsula y su promedio.	23
Figura 7. Porcentaje de contaminación para las cinco especies sembradas en cuatro medios de cultivo, así como el promedio.....	24
Figura 8. Gráfica de porcentaje de contaminación por las cinco especies analizadas a partir de cápsula cerrada.	25

TABLA DE CUADROS

Cuadro 1.	Tiempos entre la polinización de las plantas y colecta de cápsula.	7
Cuadro 2.	Costos aproximados de establecimiento de un banco de germoplasma.....	10
Cuadro 3.	Especies trabajadas y sus autores	13
Cuadro 4.	Tratamientos de limpieza de cápsula, tipo de medio de cultivo, número de réplicas por tratamiento.....	16
Cuadro 5.	Porcentaje de viabilidad por especie y tratamiento de cinco especies de la familia Orchidaceae.	26
Cuadro 6.	Coefficiente de correlación entre porcentaje de germinación y porcentaje de viabilidad según especie.....	27

SINOPSIS

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, la cual es una de las principales familias de plantas con flor en Guatemala. Éstas representan el 10% de la flora de Guatemala y es importante económicamente debido a su comercialización. Se reconoce por ser una familia inusual debido a su complejidad física y a sus flores especializadas, incluyendo la variabilidad y número de semillas que se producen en una sola cápsula.

Se propuso tres metodologías de desinfección de cápsulas y se realizó un montaje con merckoglass y conteo de semillas y se determinó su porcentaje de viabilidad. La siembra se realizó en cuatro medios de cultivo diferentes. Estos fueron: ½ MS, Knudson, Knudson con homogenizado de plátano y Knudson con homogenizado de papa. Se calculó el porcentaje de germinación y de contaminación por especie. Se realizó una correlación lineal para determinar la relación entre el porcentaje de germinación y el porcentaje de viabilidad. Así mismo, se realizó un Kruskal-Wallis para determinar la relación entre el porcentaje de germinación y contaminación con el método de desinfección de cápsula, medio de cultivo y especie.

El mejor método de desinfección fue el método 2 (etanol y cloro) con un 63% de germinación. El mejor medio de cultivo fue Knudson con homogenizado de papa con un 38% de germinación. Además, se determina que la especie con mayor porcentaje de germinación fue *Maxillaria variabilis*. Por lo tanto, se recomienda el método 2 como un método general de desinfección de semillas y el medio Knudson con homogenizado de papa. A partir de esto, se realizó su introducción a un banco de semillas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle.

I. INTRODUCCIÓN

Orchidaceae es una familia que representa el 10% de la flora de Guatemala. Esta familia es de importancia económica para el país debido a su abundancia y diversidad. Las orquídeas tienen una amplia demanda en el extranjero. Así mismo, se utilizan como ornamento y/o como producto principal para extracciones etanólicas debido a que algunas orquídeas tienen propiedades terapéuticas como antioxidantes, hipoglicémicas, antimicrobianas, entre otras (Macz 2005). También se da la producción de vainilla (a partir de la orquídea del género *Vainilla*).

La propagación *in vitro* vegetal es de importancia a nivel mundial debido a los beneficios que pueden obtenerse como la germinación de plántulas limpias libres de virus y la obtención de plantas numerosas a partir de una semilla. Así mismo, se puede almacenar un gran número de clones en un espacio reducido, lo que también disminuye los costos de mantenimiento.

Una de las principales características de las orquídeas son las pequeñas y abundantes semillas que se encuentran encapsuladas en un engrosamiento del tallo que se da durante su crecimiento. Estas semillas pueden o no ser viables, por lo que para la determinación de su viabilidad se deben observar en un microscopio para observar los embriones amarillos que generalmente indican viabilidad.

La literatura recomienda ampliamente el almacenamiento de semillas a largo plazo, de esta forma, no se pierde material genético y se pueden utilizar éstas en el futuro para propagación. Para realizar el almacenamiento adecuado de las semillas, las cápsulas deben pasar por un proceso de limpieza asegurar una posterior germinación. La limpieza se refiere a evitar la introducción de microorganismos contaminantes (como hongos o bacteria), que la disección de la cápsula se realice en condiciones higiénicas para transferir las semillas a un frasco estéril. Por medio de estos procedimientos se propondrá la elaboración de

un banco de semillas para el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala.

La germinación *in vitro* de semillas de orquídeas es el método que se elige en este protocolo con el objetivo de obtener plántulas de cinco especies de orquídeas. De acuerdo a las plántulas obtenidas, se determinará el porcentaje de germinación para tener un registro del crecimiento de las especies sembradas. La importancia de este estudio radica en el establecimiento de metodologías de desinfección y medios de cultivo que brinden los mejores porcentajes de germinación en orquídeas.

A. Antecedentes

1. Familia Orchidaceae. Orchidaceae es una familia que se desarrolla primordialmente en los trópicos y en regiones con temperatura templada de ambos hemisferios. Es una de las familias más diversas de plantas con flor, así como en variabilidad genética en el mundo y representa aproximadamente el 10% de la flora de Guatemala (Ames y Stewart 1985). Existen alrededor de 800 géneros y 20,000 especies descritas (Dix y Dix 2006), además de una amplia variedad de híbridos (Labrín et al. 2004). Se considera que se han originado de la familia Liliaceae, y es posiblemente la más avanzada de las monocotiledóneas (Ames y Stewart 1985).

Varios géneros y especies poseen una gran variación en la forma y la estructura, todas las orquídeas tienen una característica distintiva específica, lo cual las separa de otras plantas de flora. Esta característica es la columna (Ver Figura 1), una elongación en el axis floral que carga los dos órganos sexuales (Ames y Stewart 1985).

Las flores tienen tres sépalos y tres pétalos, uno de los superiores está modificado para formar un labelo (Ver Figura 1) que es lo que distingue a la familia de las orquídeas del resto de plantas con flor. Estos segmentos florales

rodean los órganos sexuales, que en las orquídeas están modificados para formar una columna que consiste de estambre y estilo fusionado (Dix y Dix 2006).

Las raíces de las orquídeas son carnosas y están cubiertas de un velamen esponjoso que está relacionado a la absorción del agua. Los tallos pueden ser largos y delgados, cortos y gruesos. Muchas epífitas tienen tallos con bases engrosadas llamados pseudobulbos, algunas terrestres tienen bulbos. Tanto los bulbos como los pseudobulbos ayudan a retener agua y nutrientes (Dix y Dix 2006). Las hojas muestran un patrón lineal en nervadura característica de monocotiledóneas. Algunas son gruesas y suculentas mientras otras pueden ser delgadas y plegadas (Dix y Dix 2006).

También se dice que es una familia inusual debido a su complejidad y a la variedad de flores especializadas, su gran variedad y diversidad de hábitat y la gran cantidad de semillas que se producen en una sola cápsula. La mayoría de las orquídeas que producen un gran número de semillas, presentan diferentes características físicas (tamaño de flor, tamaño de labelo, coloración) según la especie (Ames y Stewart 1985). Se hace necesario determinar la viabilidad de las semillas para dar a conocer el grado de conservación de las muestras, principalmente por el tamaño tan pequeño y su embrión inmaduro sin endospermo (Lallana y García 2013).

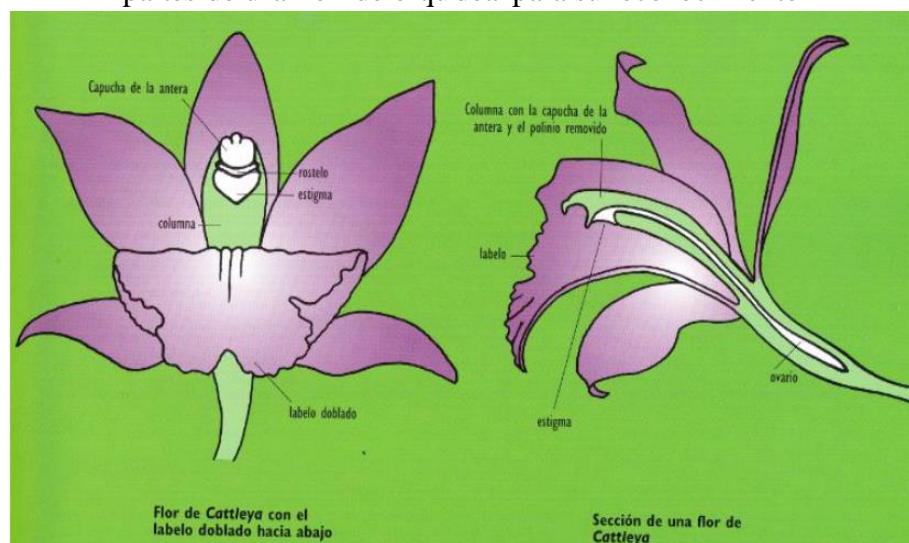
Esta falta de endospermo o alimento almacenado en las semillas hace que se crea que dependen de ayuda externa de simbiosis con micorrizas para germinar y para que se dé un crecimiento adecuado a partir de una semilla (Ames y Stewart 1985). Esta ayuda externa son las micorrizas. Las micorrizas se dan en asociación simbiótica con las orquídeas. Este tipo de asociación difiere de otras asociaciones de las raíces de las plantas y los microorganismos en la rizósfera, por la gran especificidad y organización de la relación planta-hongo. Debido al tamaño de las semillas, al germinar, el embrión no sobrevive sin una fuente externa de carbohidratos y nutrimentos o si no es infectada por un hongo simbiótico como *Rhizoctonia*, *Marasmius*, *Armillaria* y *Fomes*, que en su estado no micorrízico frecuentemente se comportan como patógenos destructivos. Las hifas intracelulares dentro de la orquídea tienen una vida limitada, destruyéndose a las

30 o 40 horas de haber penetrado a la planta, por lo tanto, debe haber otro tipo de infección para que la asociación persista. La transferencia de nutrientes es un proceso continuo que parece realizarse a través de las membranas intactas del hongo hacia las células hospederas de la orquídea. Las orquídeas epífitas tropicales se conectan con la planta que las soporta, a través de las hifas del hongo micorrízico, lo que indica un grado de parasitismo de la orquídea con otra planta (Anaya 2003).

El polen de las orquídeas se encuentra en porciones llamadas polinios, los cuales son transportados por ciertos polinizadores que generalmente son insectos. Éstos se encuentran dentro de una cavidad detrás de la capucha de la antera en el extremo de la columna. El estigma está ubicado debajo de la columna, justo detrás de la capucha de la antera, separado de la antera por un tejido llamado rostelo (Seaton y Ramsay 2009).

Inmediatamente detrás de las flores se encuentra el ovario. Al momento que los granos de polen germinan en el estigma, el ovario se va engrosando mientras los óvulos se van desarrollando dentro. Cada óvulo fertilizado se transformará en una semilla, y cuando éstas crecen y maduran, el fruto o cápsula crecerá y se ensanchará poco a poco (Seaton y Ramsay 2009).

Figura 1. Vista frontal y lateral de *Cattleya*. Representación gráfica de las partes de una flor de orquídea para su reconocimiento



(Fuente: Seaton y Ramsay 2009).

Las orquídeas tienen un importante valor económico principalmente debido a su atractivo como plantas ornamentales y han sido utilizadas para hibridación desde el siglo XVIII (Dix y Dix 2006). La vainilla es extraída de varios géneros de *Vanilla* y es un producto importante para el comercio en el hemisferio oeste. Algunas especies asiáticas tienen tubérculos que contienen levadura nutritiva que está asociada a la producción de goma de mascar. Esa misma sustancia es utilizada en países orientales como tónico emoliente para nervios, para parálisis, y como alimento similar a la tapioca (Ames y Stewart 1985).

Así mismo, las orquídeas han tenido un papel importante en la política y la cultura de varios países. En Guatemala, la llamada “Monja Blanca” (*Lycaste skinneri* var. *alba*) es la flor nacional. En Costa Rica, *Guarianthe skinneri* es conocida como la “Guaria Morada” o “Flor de San Sebastián”, es la flor nacional (Ames y Stewart 1985).

Su propagación sexual se refiere a la reproducción por semilla, mientras que la propagación asexual se refiere al tejido vegetativo o explante, como tallo, hoja, raíz o tubérculo. La propagación asexual siempre se reproduce de la misma planta o flor. No siempre hay recombinación genética y, mientras los frascos estén bien rotulados, el investigador siempre sabrá cómo se verán las plantas mucho tiempo antes que germinen. Esto le permite vender plantas mucho antes que maduren, y así, ahorrar trabajo, tiempo y espacio. Las orquídeas son altamente evolucionadas. Muchas han evolucionado con insectos polinizadores específicos u hongos micorriza de los cuales dependen para la germinación de la semilla. La propagación sexual puede ser utilizada para hacer crecer a las plantas con ciertas características como la resistencia a enfermedades o la habilidad de soportar climas más cálidos o más fríos (Greisen 2000).

Las epífitas habitan generalmente en el trópico y subtrópico, en un cinturón que se extiende a ambos lados del Ecuador. La lluvia y la existencia de zonas boscosas, generalmente de abundante vegetación, son la base para que el 40% de las orquídeas encuentren, bajo las frondosas cúpulas de los árboles tropicales, luz, calor y humedad que necesitan (Hartman 1971).

Las orquídeas pueden ser encontradas en gran variedad de hábitats, en altitudes hasta 4,220 msnm, volcanes, planicies y cordilleras. Se pueden encontrar en aproximadamente 14 zonas de vida, desde bosques nubosos a 3500 msnm o más y en bosques húmedos y tropicales a 100 msnm con precipitaciones anuales de hasta 700 mm a 400 mm (Dix y Dix 2006).

2. Germinación *in vitro*. La germinación de semillas generalmente requiere de la presencia de un hongo para que ésta se lleve a cabo. La semilla de orquídeas carece de un endospermo, éstas contienen un embrión redondo, rodeado de células cuyo número está alrededor de 50 células. Debido a esto, el embrión no tiene los nutrientes necesarios para poder desarrollarse desde un inicio. Es por esto que necesitan la simbiosis con los hongos, pues éstos desdoblan el almidón que se encuentra en el sustrato orgánico y lo transforma en azúcares simples, que sí puede asimilar el embrión (Macz 1995). Por lo tanto, la siembra de semillas *in vitro* se realizan en medios de cultivo que contienen nutrientes artificiales y condiciones físicas controladas (Macz 1995).

Knudson fue uno de los pioneros en el trabajo de cultivo de tejidos a partir de germinación de semillas. Demostró que los hongos eran responsables del rompimiento del almidón en azúcares simples, los cuales favorecían la germinación de las semillas de orquídeas. Por lo tanto, debido a él, se sabe que es posible el cultivo *in vitro* a partir de semillas sin una asociación necesaria con los hongos endosimbióticos (Macz 1995).

3. Maduración de cápsulas. El tiempo que requieren las semillas y las cápsulas para madurar varía ampliamente (ver Cuadro 1) y depende no sólo de la composición genética del género y especie pero también del clima y de las condiciones culturales. En climas cálidos, las semillas y cápsulas maduran más rápido de lo normal (Greissen 2000). Las semillas están comúnmente más maduras lo suficiente para germinar un mes o más antes que la cápsula se abra. Sin embargo, si se colectan antes, las semillas pueden no germinar exitosamente.

Cuadro 1. Tiempos entre la polinización de las plantas y colecta de cápsula.

Planta (Género y especie)	Días para corte de cápsula
<i>Epidendrum radicans</i>	65
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	120-140
<i>Leochilus oncioides</i>	- (no hay datos)
<i>Oncidium leucochilum</i>	110-140 (122)
<i>Cymbidium</i> (especies)	270-360
<i>Cypripedium</i> (especies)	30
<i>Lycaste aromatica</i>	250

Fuente: (Greisen 2000)

En el cuadro anterior se muestran algunas especies y el tiempo en que tarda la cápsula en madurar a partir de la polinización. Para *Leochilus oncioides* no se tienen datos.

4. Bancos de semillas. A lo largo de la vida en la humanidad se han almacenado semillas. Los antiguos agricultores almacenaban semillas para poder sembrarlas posteriormente o como reserva de alimento. Ya a mediados del siglo XX se inicia de forma sistemática el almacenamiento de semillas con propósitos científicos o para su conservación. La conservación *ex situ* es una de las que más se realiza en la actualidad (Iriundo 2001).

El almacenamiento de semillas a largo plazo es ampliamente aceptado pues es un procedimiento relativamente simple y económico en términos de tecnología, material, personal y gastos de mantenimiento. Almacenándolas en un banco de semillas, no se pierde material genético y se les puede dar uso para su propagación en el futuro, de ser necesario (Iriundo 2001).

Las semillas pueden estar almacenadas por largos períodos tiempo debido a que las mismas tienen adaptaciones de dispersión, por lo que son capaces de mantenerse viables, de forma natural. Así mismo, debido a su mínimo tamaño, es posible que haya variabilidad genética dentro de las mismas, lo que las hace aptas

para asegurar la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriando 2001). Según Mosqueda *et al.* (2010), las semillas pueden almacenarse por meses, Tarré *et al.* (2007) dice que puede ser por un año o incluso indefinido y, de acuerdo con Paulete (2007) pueden durar hasta dos años almacenadas.

Germoplasma es la unidad hereditaria que dicta el desarrollo de plantas y animales, la información biológica que se transmite por generaciones. Este se pierde al perder vida la célula, por lo que se busca conservarlo por medio de su almacenamiento. La conservación genética es necesaria debido a que los bancos de germoplasma tienen como misión localizar, coleccionar y conservación de plantas consideradas ser de prioridad importante para la sociedad. Así mismo, se trabaja para adquirir conocimiento científico para optimizar la conservación y uso de los recursos fitogenéticos. (Jardín Botánico de Universidad de Valencia, 2000)

De acuerdo con Knutson y Stoner, 1989, la preservación de las semillas en un banco de germoplasma se realiza *ex situ*, las cuales se preservan en condiciones adecuadas para almacenamiento a largo plazo y es la más fácil y la más utilizada. Según con el estudio realizado por FAO en 2012, el establecimiento de un banco de germoplasma varía dependiendo del tamaño y la capacidad del banco que se necesita. Así mismo, de la cantidad de germoplasma que necesite almacenarse, de los objetivos del banco y qué tipo de especies han de almacenarse. Con base en el Cuadro 2, el costo depende del tamaño del banco, teniendo en cuenta el equipo que se necesita para mantenerlo.

B. Justificación

Guatemala tiene alrededor de 800 géneros de orquídeas (Dix y Dix 2006). Esta riqueza de especies es lo que caracteriza la biodiversidad que está presente en el país. Por lo tanto, tiene un alto potencial de comercialización de especies y desarrolla proyectos de conservación para las mismas, dándole importancia significativa al mercado económico del país. Debido a la deforestación, avance de la frontera agrícola, entre otros, que han estado afectando a los ecosistemas del país, el patrimonio natural ha disminuido con el tiempo. Algunas especies como *Lycaste skinneri* var. *alba* Dombroin (flor nacional de Guatemala), se encuentran en peligro de extinción. En Guatemala, son 308 las especies que se encuentran dentro del listado de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre), esto indica que son especies que se encuentran en peligro de extinción y que está prohibido comerciarlas por su importancia florística.

La obtención de un método correcto de almacenamiento puede contribuir a la reintroducción de las especies al ecosistema y así propiciar su conservación. Esta misma conservación contribuye al aumento de la abundancia de estas especies y propicia la perpetuación de la especie.

Esto es una ventaja principalmente debido a que, históricamente, las orquídeas han sufrido el deterioro de sus poblaciones naturales por la deforestación, fragmentación y sobre todo la extracción masiva de plantas enteras; la extracción es motivada por su alto valor hortícola y comercial, lo que en general promueve su recolecta ilegal (Naranjo y Dirzo 2009). El reproducir orquídeas de varias especies puede contribuir a reducir la extracción de las orquídeas nativas de su hábitat y a conservarlas, así como los bosques donde éstas se encuentran pues para extraer una orquídea generalmente se talan los árboles.

Cuadro 2. Costos aproximados de establecimiento de un banco de germoplasma.

Estimated equipment costs by gene bank size				
Item	Small		Medium	Large
	Necessary	Optional		
Long term liquid nitrogen tanks	\$5 000 to \$40 000		\$40 000 to \$120 000	> \$120 000
Shipping tanks	\$3 000		\$3 000	\$3 000
Equipment for straw filling	\$500		\$40 000	\$40 000
Equipment (ranging from Styrofoam box to programmable freezer) for freezing samples	\$200		\$200 to \$20 000	\$200 to \$20 000
Microscope	Compound \$500		Phase contrast \$5 000	Phase contrast with fluorescence \$15 000
Centrifuge		\$10 000	\$10 000	\$10 000
Spectrophotometer (fixed or portable)		\$2 100	\$2 100	\$2 100
Makler counter chamber	\$850		\$850	\$850
Haemocytometer	\$200		\$200	\$200
pH meter	\$1 200		\$1 200	\$1 200
Osmometer		\$8 000	\$8 000	\$8 000
Water bath			\$800	\$800
Total	\$11 450 to \$46 450	\$31 500 to \$66 550	\$111 350 to \$211 150	\$201 350 to \$221 350

Note: costs are shown in United States dollars at 2012 prices.

Fuente: (FAO, 2012)

La principal ventaja de trabajar con medio de cultivo *in vitro* es que se obtienen plantas sanas, probablemente libres de virus, con crecimiento óptimo y cualidades que requiere para su comercio. Es también una herramienta eficaz para aumentar la diversidad genética de la flora por medio de la implementación de los bancos de semillas y poder hacer uso de los mismos con fines de reproducción. Los bancos de semillas pueden maximizar la diversidad de especies a largo plazo y así poder hacer uso racional de ellas en el futuro, de ser necesario.

Para obtener una germinación exitosa *in vitro* y hacer uso de las semillas a largo plazo, es necesario el establecimiento de métodos de desinfección de cápsula eficaces para dicha germinación; así como de evaluar las semillas de forma sistemática a lo largo de su almacenamiento. Hay pocos estudios que presenten métodos de desinfección de cápsulas, por ejemplo, Mohanty *et al.* 2012, quienes establecen método de desinfección con Tween, solución de cloruro de mercurio y etanol; Jevsnik and Luthar, 2010, quienes desinfectaron la cápsula con ácido dicloroisocianúrico sal sódica dihidrato, Tween 20 y lavado con agua; de acuerdo Vijayakumar *et al* 2012, las cápsulas se humedecieron con solución de detergente y Bavistin, fueron desinfectadas con alcohol 70% y solución de cloruro de mercurio. Hay menor número de estudios que comparan diferentes métodos de desinfección. Así mismo, se considera indispensable un método de desinfección adecuado debido a que no hay estudios previos que los comparen y así permite obtener semillas sin contaminación y evita que las semillas sean infectadas durante su almacenamiento. Las cápsulas se desarrollan en diferentes ambientes, los tamaños y grosor en sí de las cápsulas son diferentes entre especies; los métodos de colecta difieren entre sí según el colector, por lo que la contaminación externa de la misma también difiere.

El almacenamiento de semillas permite determinar el tiempo que pueden estar guardadas antes de sembrarlas de nuevo. Así mismo, el almacenamiento permite su conservación genética. El modo de almacenamiento también es clave para la utilización posterior de las semillas y verificar la eficacia de dicho almacenamiento. Es necesario realizar regeneraciones temporales de las semillas en el mismo medio elegido para poder verificar su viabilidad después del almacenamiento.

En Guatemala, son pocos los estudios e investigación que se hace en cultivo *in vitro*, es necesario concientizar a instituciones sobre las ventajas de este tipo de cultivo. Así mismo, sugerir su utilización, tanto para la industria ornamental como para la industria agraria. El poco conocimiento de estas técnicas y la falta de insumos económicos para la investigación en el país lo convierte en un obstáculo para su implementación. El costo de implementar un laboratorio de

cultivo de tejidos es bastante alto y más aún si se quiere mantener e introducir semillas para almacenamiento de germoplasma. Por ejemplo, se recomienda que se busquen los recursos económicos por la cantidad de \$11,450 a \$46,450 (FAO, 2012) para la inversión total que se requiere para la construcción y mejoramiento de los bancos de germoplasma animal y vegetal. Los recursos económicos se toman en cuenta para un laboratorio pequeño por ser solamente para semillas de orquídeas.

C. Objetivos

1. General

Establecimiento de un método de desinfección de cápsulas y medios de cultivo para siembra *in vitro* de cinco especies de la familia Orchidaceae e introducción al banco de germoplasma del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala.

2. Objetivos específicos

- Propuesta de un método eficaz de desinfección de cápsulas.
- Propuesta de un medio de cultivo eficaz para la germinación de las cinco especies *in vitro*.
- Viabilidad de las semillas por medio de montaje en placa.
- Porcentaje de germinación de orquídeas según el método de limpieza de cápsulas y según el medio de cultivo utilizado antes del almacenamiento.
- Porcentaje de contaminación de semillas de orquídeas según el tratamiento de limpieza y tipo de medio de cultivo.
- Introducción de semillas viables al banco de semillas del laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala

II. METODOLOGÍA

A. Procedimientos

1. Obtención de muestra. Se cortó cuatro cápsulas maduras de cinco especies de orquídeas con una tijera podadora de jardín. La tijera se sumergió en cloro al 10% entre cada corte. Cada cápsula se almacenó en sobres de papel pequeños y rotulados con género y especie, fecha de colecta y colector. Posteriormente se cortó la punta que tuvo contacto con el cloro para impedir la absorción de cloro por parte de la cápsula. Los sobres fueron colocados en un desecador con cloruro de litio por una semana (Ossenbach *et. al.* 2006) (ENSCONET 2009).

Cuadro 3. Especies trabajadas y sus autores

Especie	Autor
<i>Epidendrum radicans</i>	Pav. ex Lindl
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	Bateman ex Lindl. Dressler & W.E.Higgins
<i>Maxillaria variabilis</i>	Bateman ex Lindl
<i>Oncidium</i> sp	--
<i>L. oncioides</i>	Knowles & Westc.

2. Métodos de desinfección y esterilización de cápsulas

Previo a realizar los procedimientos de desinfección, todas las cápsulas colectadas fueron lavadas con agua de chorro y cepilladas suavemente con jabón.

a. Método1 (esterilización con peróxido). Para el proceso de desinfección, se lavó las cápsulas con agua de chorro, sumergiéndolas por dos minutos en constante movimiento, posteriormente se lavó con Tween 20 al 5% por 10 minutos. Finalmente se realizó un lavado con agua destilada por dos

minutos. Para el proceso de esterilización, se sumergieron en un beaker de 250 ml con una solución acuosa de (H₂O₂) al 3% (comúnmente utilizado para desinfección general) por 15 minutos y se lavó tres veces con agua destilada estéril dentro de una campana de flujo laminar.

b. Método 2 (desinfección con etanol y cloro). Las cápsulas fueron directamente colocadas en un beaker de 250 ml con etanol 95% por 12 segundos y posteriormente en otro beaker (250 ml) con cloro 10% (solución preparada con agua destilada y cloro) por 45 minutos. Posteriormente se colocaron en servilleta estéril para secarlas. Este procedimiento fue realizado dentro de la campana de flujo laminar.

c. Método 3 (esterilización por medio de flameo). Para llevar a cabo la esterilización de cápsulas, se sumergió las cápsulas en un beaker de 250 ml con etanol 70% y se flameó dentro de la campana de flujo laminar. Después se procedió a abrir la cápsula para sembrar las semillas, así como para su almacenamiento.

3. Almacenamiento. Se cortó la cápsula a la mitad con un bisturí estéril dentro de la campana de flujo laminar. Estas semillas se trasladaron a una caja Petri de vidrio con papel aluminio y así no hubo pérdida de semillas. Se colocó dentro de una desecadora con cloruro de litio por un día (Ossenbach *et. al.* 2006; Seaton y Ramsay 2009). Posteriormente, se colocó en frascos de vidrio y estos a su vez dentro de un frasco con tapadera con sílica gel. Se etiquetó el frasco con nombre de especie, medio de cultivo, fecha y quién sembró. Este fue almacenado a temperatura de -20°C durante un año que se recomienda éstas estén en congelamiento hasta su próxima siembra.

4. Medios de cultivo y siembra. Para la siembra se utilizó tres tipos de medio de cultivo Knudson (ver 0, en Apéndice), medio Knudson con homogenizado de papa y medio Knudson con homogenizado de plátano (ver 0, Apéndice). Así mismo, también se utilizó el medio ½ MS para la siembra. Este último medio se utilizó como control debido a que es el medio usual para la siembra de semillas en cultivo de tejidos. Estos cuatro medios se utilizaron con

los tres métodos de desinfección de cápsula, se utilizó una cápsula por método de desinfección.

Para la preparación de los medios de cultivo, se siguió las recetas (ver Apéndice), las sales utilizadas se prepararon según Murashige & Skoog 1962m (*Physiol. Plant* 15:473-497) y para la preparación de las vitaminas, se siguió el protocolo según Gamborg *et al*, 1968 (*Expl. Cell. Res.* 50: 150-158). Una vez realizada la preparación de un litro de cada medio de cultivo, se autoclaveó por una hora. Una vez estéril, se vertió 25 ml con pipeta estéril en 30 frascos previamente autoclaveados, los cuales se colocaron en una campana de flujo laminar (previamente desinfectada con etanol 90%, flameada y se esperó 30 minutos antes de colocar los frascos dentro) hasta gelificar y hasta que no hubiera condensación en los mismos (esto aproximadamente tres horas). Ya gelificados, se cerraron con tapas plásticas y parafilm para evitar contaminación. El parafilm fue previamente rociado con etanol 70% y se dejó secando en la campana.

Para la obtención de semillas, en campana de flujo laminar, se tomó la cápsula y se realizó un corte longitudinal con un bisturí de hoja estéril. La cápsula se partió en dos y con la ayuda de una espátula pequeña se fue sacando las semillas directamente a una servilleta estéril. Las semillas se dividieron en cinco partes iguales. Dentro de la campana. Una cuarta parte de las 5 partes se utilizó para realizar montaje en placa (ver sección viabilidad) y la parte sobrante (3/4) se almacenó. Las otras cuatro partes se sembraron en los cuatro medios de cultivo.

Con base en los métodos de desinfección de la cápsula y de medios utilizados en la siembra de semillas, se realizaron 12 tratamientos, los cuales se muestran en el cuadro siguiente (ver Cuadro 4):

Cuadro 4. Tratamientos de limpieza de cápsula, tipo de medio de cultivo, número de réplicas por tratamiento.

Tratamiento	Método de limpieza	Medio de cultivo	Número de réplicas				
			<i>E.r</i>	<i>G.a</i>	<i>O</i>	<i>M.v</i>	<i>L.o</i>
1	Método 1 (Tween y peróxido)	Knudson con papa	4	3	1	1	1
2	Método 1 (Tween y peróxido)	Knudson con plátano	4	3	1	1	1
3	Método 1 (Tween y peróxido)	½ MS	4	3	1	1	1
4	Método 1 (Tween y peróxido)	Knudson	4	3	1	1	1
5	Método 2 (etanol y cloro)	Knudson con papa	4	3	1	1	1
6	Método 2 (etanol y cloro)	Knudson con plátano	4	3	1	1	1
7	Método 2 (etanol y cloro)	½ MS	4	3	1	1	1
8	Método 2 (etanol y cloro)	Knudson	4	3	1	1	1
9	Método 3 (flameo)	Knudson con papa	4	3	1	1	1
10	Método 3 (flameo)	Knudson con plátano	4	3	1	1	1
11	Método 3 (flameo)	½ MS	4	3	1	1	1
12	Método 3 (flameo)	Knudson	4	3	1	1	1

Número de réplicas (especies): *E.r* (*Epidendrum radicans*), *G.a* (*Guarante aurantiaca*), *O* (*Oncidium* sp), *M.v* (*Maxillaria variabilis*), *L.o* (*Leochilus oncidioides*).

5. Porcentaje de germinación y contaminación. Se realizó un conteo de las semillas germinadas a las seis semanas a partir de la fecha de siembra. Se colocó una hoja con 45 cuadros de 1 x 1 cm debajo de los medios de cultivo para así se contó las semillas que se observaron dentro de un cuadrado. Ese número de semillas se multiplicó por el número de cuadrados en los cuales se

observó germinación de semillas. Este conteo se realizó con un estereoscopio dentro de la campana de flujo laminar. El porcentaje de germinación se determinó dividiendo el número de semillas germinadas por el número total de semillas sembradas multiplicado por cien, así: $(\text{semillas germinadas}/\text{número total semillas}) \times 100$.

De la misma forma, se calculó el porcentaje de contaminación para determinar la eficiencia del método de limpieza de cápsulas; $(\text{semillas contaminadas}/\text{número total de semillas}) \times 100$.

6. Viabilidad. Para realizar el proceso de análisis de viabilidad de semillas, se utilizó las semillas obtenidas de cinco especies de la familia Orchidaceae. Se llevó a cabo un montaje de las semillas con merckoglass en cubre objetos para observar los embriones viables.

Utilizando una cuadrícula de 1mm x 1mm debajo de la placa, se contó el número de semillas sembradas y el número de embriones viables para calcular el porcentaje de viabilidad. Esto se hizo multiplicando el número de semillas viables por cien y dividiendo esa cantidad por el número de semillas sembradas.

7. Análisis de datos. Se calculó el coeficiente de correlación para conocer la relación entre la germinación y porcentaje de viabilidad, utilizando el paquete estadístico de Microsoft Excel de Windows 8.

Para la comparación de los porcentajes de germinación y contaminación, con respecto a los medios de cultivo, métodos de desinfección y especies, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, utilizando el paquete estadístico SPSS IBM 22.

Las hipótesis estadísticas utilizadas son las siguientes, donde las tres primeras corresponden a la comparación del porcentaje de germinación (H1, H2 y H3) y las 3 últimas corresponden a la comparación del porcentaje de contaminación (H4, H5 y H6):

H1: El porcentaje de germinación es el mismo entre las categorías de método de desinfección, medios de cultivo y especies.

Así mismo, se propuso tres hipótesis en base a contaminación:

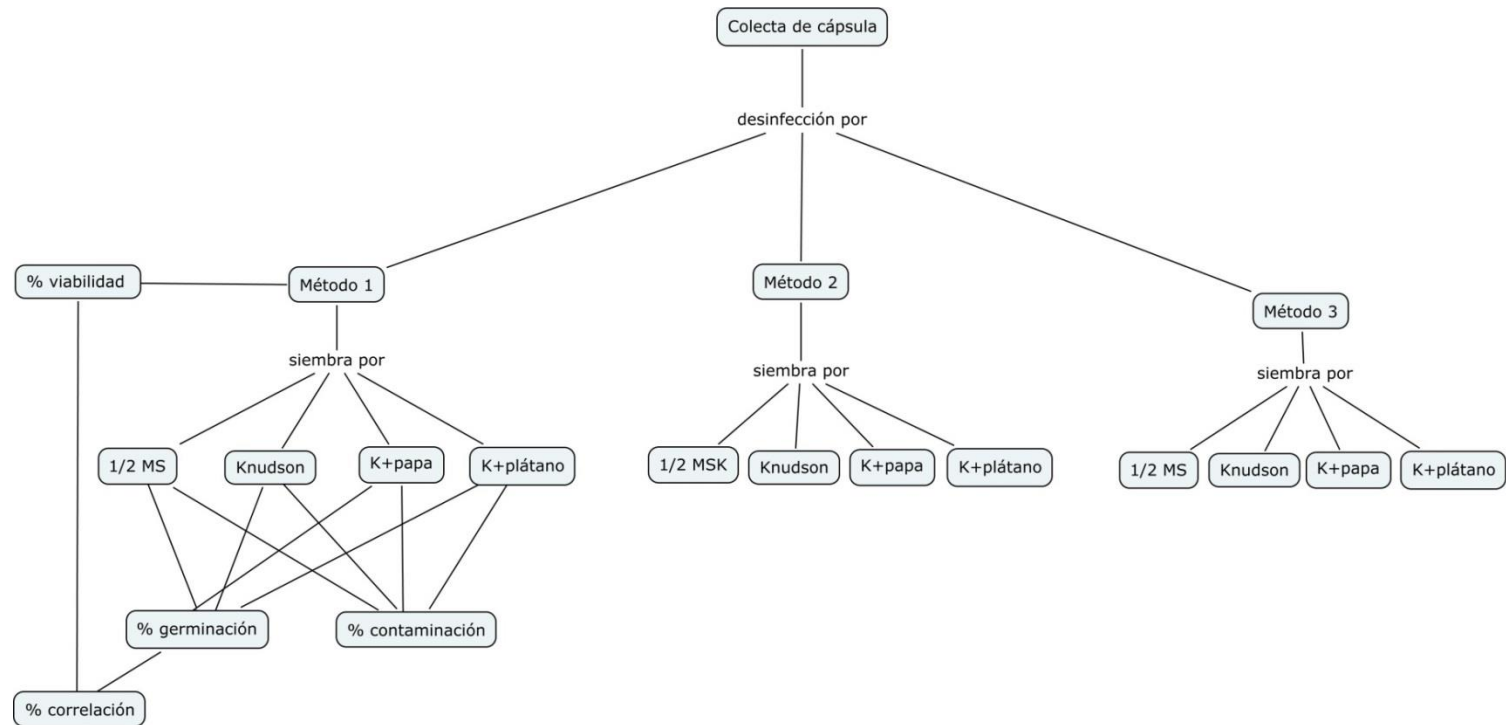
H2: El porcentaje de contaminación es el mismo entre las categorías de método de desinfección.

H3: El porcentaje de contaminación es el mismo entre las categorías de medio.

H4: El porcentaje de contaminación es el mismo entre las categorías de especie.

8. Diagrama de flujo

Figura 2. Mapa conceptual de procedimiento desde colecta a siembra *in vitro* de las cinco especies de orquídeas. De cada medio de cultivo y método se calculó porcentaje de germinación y contaminación.



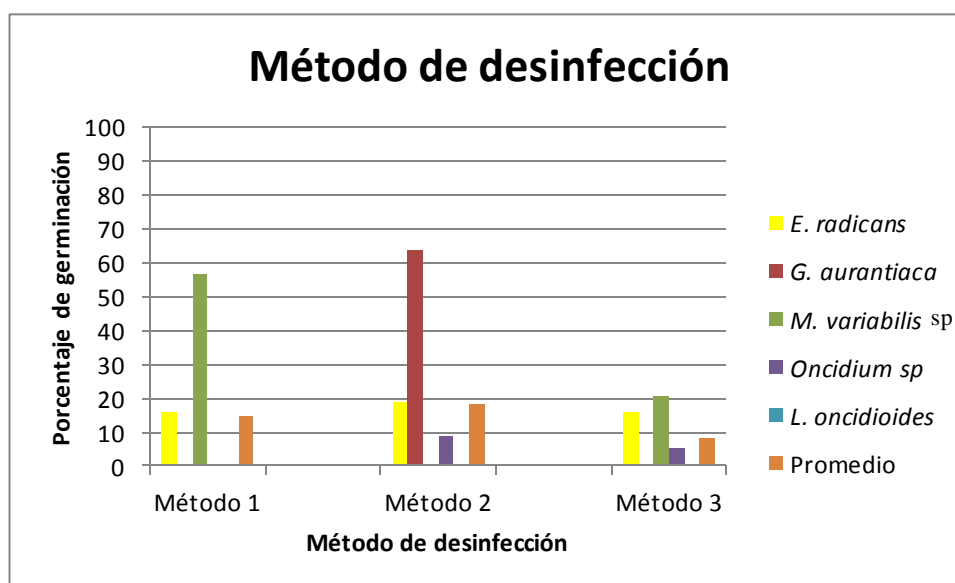
Así mismo, se calculó porcentaje de viabilidad de cada especie y con el porcentaje de germinación, se calculó la correlación entre germinación y porcentaje de viabilidad. Se realizó el mismo procedimiento para las cinco especies, utilizando una cápsula por método de desinfección.

III. RESULTADOS

A. Germinación

1. Método de desinfección. La germinación se presentó de acuerdo a los datos del Cuadro 1 de Apéndice B, donde se muestra la germinación de las especies según el método de desinfección de cápsula. Se considera que el método de desinfección tiene algún tipo de influencia en la germinación de cada especie.

Figura 3. Porcentaje de germinación de las cinco especies de orquídeas y su promedio con tres métodos de desinfección, donde Método 1 = Tween y peróxido, Método 2 = (etanol y cloro) y Método 3 = flameo.

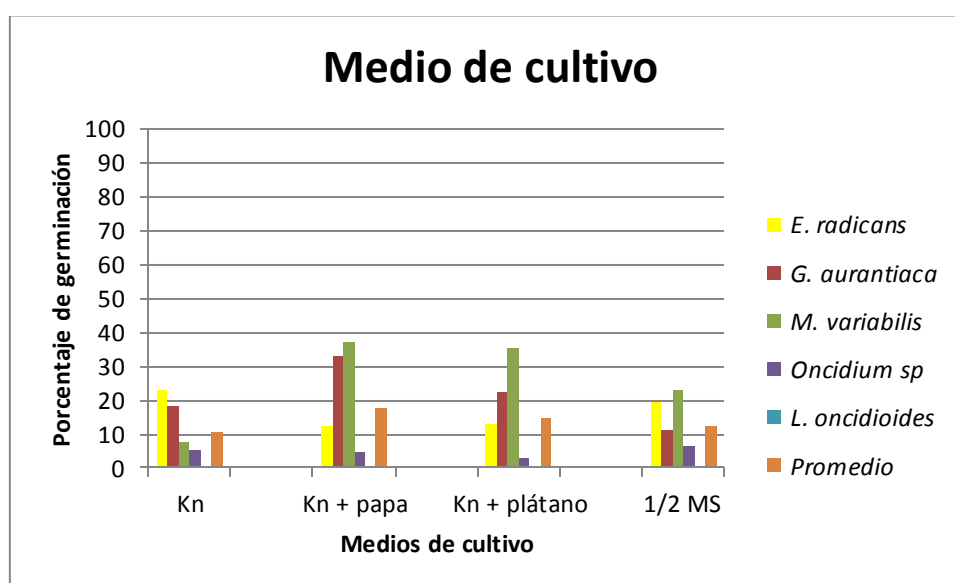


Con base en la prueba de Kruskal-Wallis (ver Apéndice B, Cuadro 2), no existe diferencia significativa (0.574) entre los tres métodos de desinfección para el porcentaje de germinación. Sin embargo, en la Figura 2 se observa que el método 2 (Etanol y cloro) de desinfección fue el mejor de acuerdo a los porcentajes de germinación, mientras que el menos efectivo fue el método 3 (flameo). Para *Guarlanthe aurantiaca*, el mejor método fue el método 2 (etanol y cloro) de

desinfección de cápsula, con un porcentaje de 63.61% (ver Apéndice B Cuadro 1), con el único método que germinó. Para *Maxillaria variabilis*, el mejor método de desinfección fue el método 1 (Tween y peróxido), con un porcentaje de 56.66%. *Oncidium* sp., obtuvo una mejor germinación bajo el método con un porcentaje de 8.88%. La especie *Leochilus oncidoides* no germinó bajo ningún método. La especie *Epidendrum radicans* germinó con el método 2 de desinfección de cápsula, con un porcentaje de 19.07%.

2. Medio de cultivo. Se presentan los resultados en una gráfica basados en los datos de apéndice, Cuadro 4. Las cinco especies fueron sembradas en cuatro medios de cultivo y se presenta la eficacia de cada medio para cada especie.

Figura 4. Porcentaje de germinación de las cinco especies y su promedio en cuatro medios de cultivo, donde Kn = Knudson

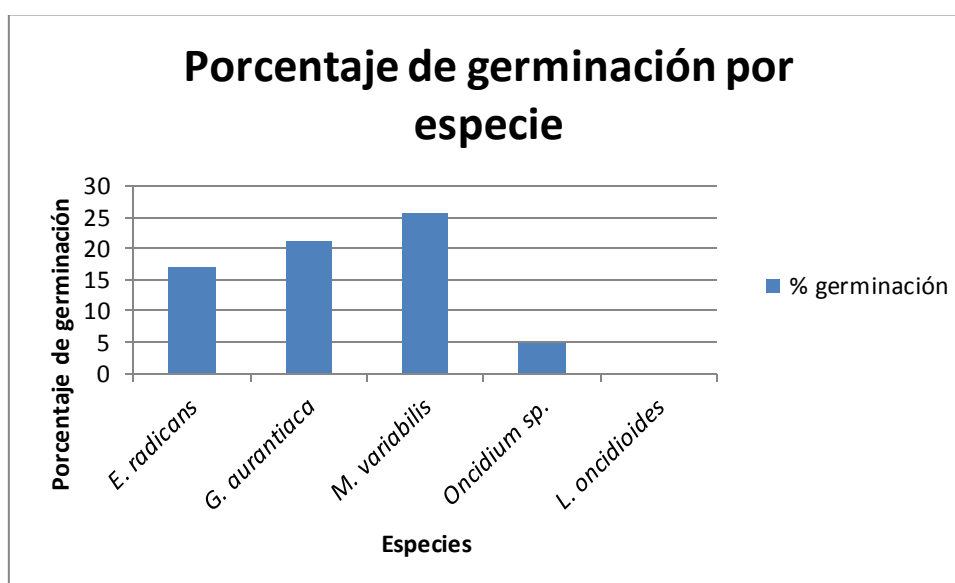


Con base en la prueba de Kruskal-Wallis (ver Apéndice B, Cuadro 4), no existe diferencia significativa (0.993) entre los cuatro medios de cultivo para el porcentaje de germinación. Sin embargo, se observa que el mejor medio de cultivo para germinación de semillas fue Knudson con homogenizado de papa, con un promedio de 31.50%, seguido de 1/2 MS con un promedio de porcentaje de contaminación de 23.26%. los

medios de cultivo que se contaminaron menos fue Knudson con 22.91% y Knudson con plátano con 22.27%.

3. Especies. Se presentan los resultados de los porcentajes de germinación por especie en cada medio de cultivo, haciendo énfasis en los resultados mayores en la siguiente gráfica. Se trabajó con cinco especies diferentes con un resultado mayor de contaminación en comparación con las otras especies.

Figura 5. Gráficas de germinación de cinco especies analizadas a partir de cápsula cerrada y bajo tres métodos de desinfección.

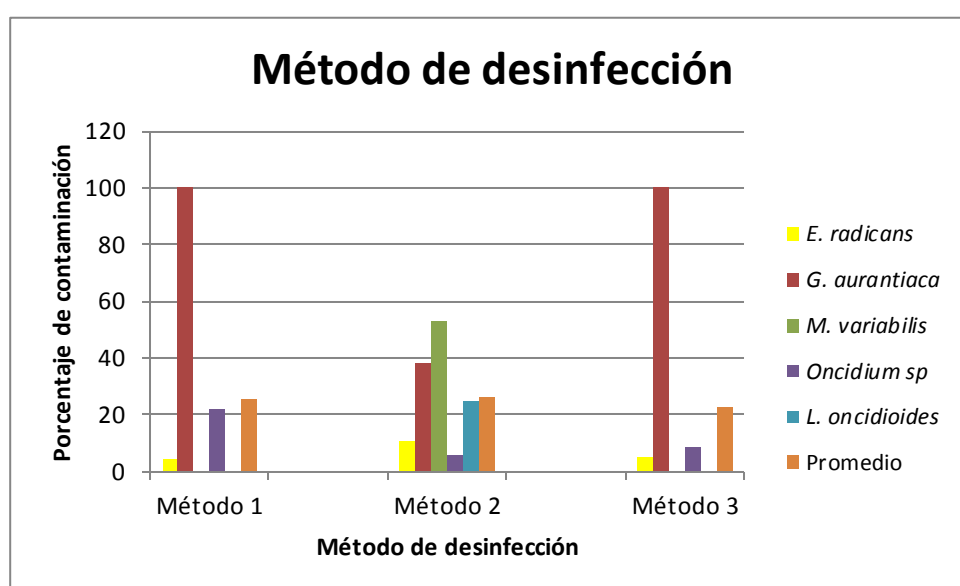


Con base en la prueba de Kruskal-Wallis (ver Apéndice B, Cuadro 6), existe una diferencia significativa (0.01) entre las cinco especies de orquídeas para el porcentaje de germinación. Las cinco especies fueron sembradas en cuatro medios de cultivo. No se presenta la gráfica para *L. oncioides* pues las semillas no germinaron con ningún método de desinfección. La especie que tuvo más germinación fue *E. radicans*, mientras que la que menos tuvo germinación fue *Oncidium sp.* Los promedios de porcentaje de germinación según especie son: *E. radicans* (16.88%), *G. aurantiaca* (21.20%), *M. variabilis* (25.74%), *Oncidium sp.* (4.81%) y *L. oncioides* (0%) (ver apéndice C). La mayor especie que germinó fue *M. variabilis* (ver Figura 4).

B. Contaminación

1. Método de desinfección. La contaminación se presentó de acuerdo a los datos del Cuadro 8 Apéndice C, donde se muestra la contaminación de las especies según el método de desinfección de cápsula. Se considera que dicha contaminación se presentó dependiendo del método de desinfección.

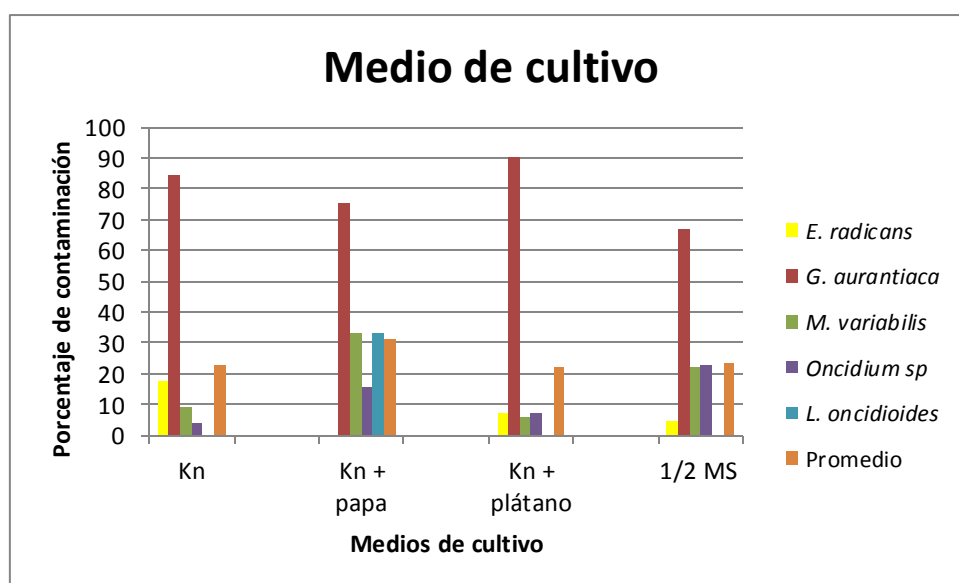
Figura 6. Porcentaje de contaminación para las cinco especies y tres métodos de desinfección de cápsula y su promedio.



Con base en la prueba de Kruskal-Wallis (ver Apéndice C, Cuadro 2), no existe diferencia significativa (0.438) entre los tres métodos de desinfección para el porcentaje de contaminación. Esto se observa con el mayor porcentaje de germinación de 100% con el método 1 (Tween y peróxido) para *G. aurantiaca* y el mejor de 22.40% con el método 1 para *Oncidium sp*.

2. Medio de cultivo. Se presentan los resultados en una gráfica basados en los datos de apéndice C, Cuadro 10. Las cinco especies fueron sembradas en cuatro medios de cultivo y se presenta el porcentaje de contaminación presente en los mismos.

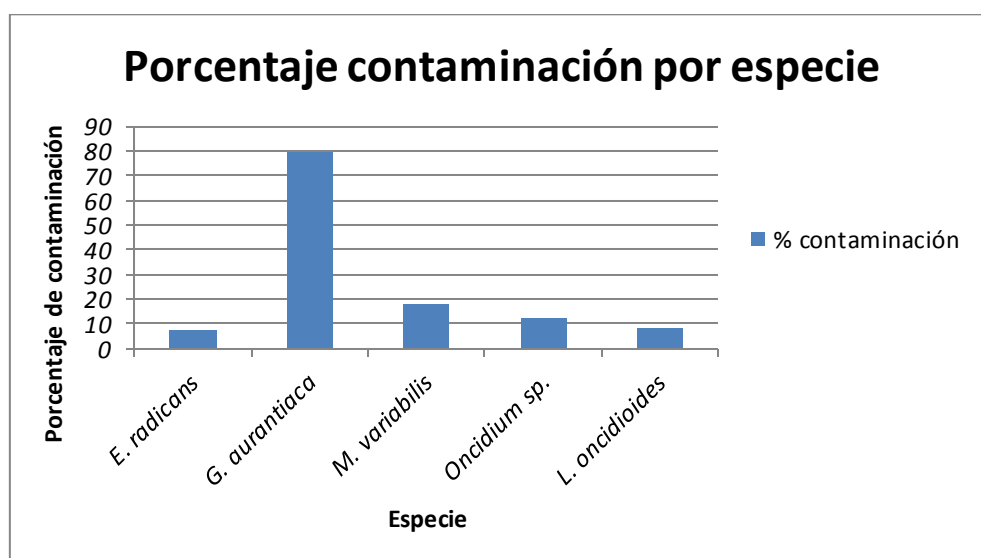
Figura 7. Porcentaje de contaminación para las cinco especies sembradas en cuatro medios de cultivo, así como el promedio



Con base en la prueba de Kruskal-Wallis (ver Apéndice C, Cuadro 4), no existe diferencia significativa (0.959) entre los cuatro medios de cultivo para el porcentaje de contaminación. Se observó mayor contaminación en Knudson con plátano con un 90.616% de contaminación. El menor porcentaje de contaminación se dio en el medio de cultivo Knudson + papa con un 33.33%. Los porcentajes de los promedios de cada medio de cultivo fueron: Knudson (22.91%), Knudson con homogenizado de papa (31.506%), Knudson con homogenizado de plátano (22.271%) y ½ MS (23.259%).

3. Especies. Se presentan los resultados de los porcentajes de contaminación por especie en cada medio de cultivo, haciendo énfasis en los resultados mayores en la siguiente gráfica. Se trabajó con cinco especies diferentes con un resultado mayor de contaminación basado en el Cuadro 10, apéndice C.

Figura 8. Gráfica de porcentaje de contaminación por las cinco especies analizadas a partir de cápsula cerrada.



Con base en la prueba de Kruskal-Wallis (ver Apéndice C, Cuadro 6), existe diferencia significativa (0.000) entre las cinco especies de orquídeas para el porcentaje de contaminación. Se observa que *G. aurantiaca* fue la especie que tuvo más contaminación y *E. radicans* la que menos se contaminó. No se toma en cuenta el resultado de *L. oncidioides* debido a que esa contaminación fue el único resultado presente de esa especie, no hubo germinación. Los promedios de porcentaje de contaminación según especie son: *E. radicans* (7.35%), *G. aurantiaca* (79.32%), *M. variabilis* (17.59%), *Oncidium sp* (12.35%) y *L. oncidioides* (8.33%) (ver apéndice C, Cuadro 5).

C. Viabilidad

Se presentan a continuación los resultados de las semillas que germinaron según la especie y el método utilizado de limpieza de cápsulas.

Cuadro 5. Porcentaje de viabilidad por especie y tratamiento de cinco especies de la familia Orchidaceae.

Especie	Método	Número total de semillas	Número de semillas viables	Porcentaje viabilidad (%)	Porcentaje de germinación (%)
<i>Epidendrum radicans</i>	1	265	90	33.96	15.78
	2	305	50	16.39	19.07
	3	182	79	43.41	15.97
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	1	235	39	16.60	0
	2	1800	1789	99.39	63.61
	3	882	737	83.56	0
<i>Oncidium sp.</i>	1	192	0	0	0
	2	225	225	100	8.89
	3	185	185	100	5.56
<i>Leochilus oncidoides</i>	1	120	0	0	0
	2	20	0	0	0
	3	60	0	0	0
<i>Maxillaria variabilis</i>	1	112	102	91.07	56.67
	2	184	180	97.82	0
	3	72	72	100	20.56

El mayor porcentaje de viabilidad se observó en *G. aurantiaca* y en *M. variabilis*, mientras que el menor fue en *L. oncidoides* debido a la inmadurez de las semillas. A partir de esto, se obtuvo el porcentaje de germinación por especie, siendo el mayor para *G. aurantiaca* y *M. variabilis* y el menor para *L. oncidoides*. Cada especie fue separada de acuerdo al método de desinfección de cápsula para posteriormente realizar el conteo de las semillas con embrión viable.

Cuadro 6. Coeficiente de correlación entre porcentaje de germinación y porcentaje de viabilidad según especie.

Especie	Coefficiente de correlación
<i>Epidendrum radicans</i>	-0.92
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	0.65
<i>Oncidium</i> sp.	0.93
<i>Leochilus oncidioides</i>	---
<i>Maxillaria variabilis</i>	-0.82
Coefficiente general	-0.032

De acuerdo a los coeficientes de correlación por especie, se obtuvo correlación negativa fuerte (-0.9) para *E. radicans*, y *M. variabilis* (-0.82) indicando que hay germinación inversamente proporcional a la viabilidad. Así mismo, se obtuvo correlación positiva más fuerte (0.9), para *Oncidium* sp. El coeficiente para *L. oncidioides* no fue calculado debido a que los porcentajes de viabilidad y germinación fueron 0%. El coeficiente de correlación para todas las especies fue de -0.032.

D. Introducción al banco de semillas. Se introdujo semillas de 4 especies de orquídeas al Banco de Semillas del Laboratorio de Cultivo de tejidos. Las especies introducidas son: *Epidendrum radicans*, *Guarianthe aurantiaca*, *Oncidium* sp. y *Maxilaria variabilis*. Las semillas de las especies mencionadas fueron colocadas en un frasco con tapadera plástica y parafilm dentro de un contenedor con sílica gel en un congelador a -20°C. Así mismo, se presentó un cuaderno con la fecha de ingreso al banco de cada especie y el peso de las semillas para su récord de almacenamiento dentro del laboratorio.

IV. DISCUSIÓN

A. Métodos y colecta

Los métodos de desinfección fueron elegidos según lo observado y leído en artículos previos sobre siembra *in vitro* de semillas de orquídeas utilizados (Batty *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007; Piria *et al.*, 2008; Naing *et al.*, 2010). Y se seleccionaron aquellos métodos que sus componentes (etanol, cloro, peróxido de hidrógeno), se encontraban disponibles en las instalaciones del laboratorio o fue factible comprarlos. Los medios de cultivo, principalmente Knudson y ½ MS fueron elegidos por ser los medios de cultivo más utilizados para siembra de semillas de orquídeas (Abraham *et al.* 2012; Salazar 2010; Piria *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2006). Los medios de cultivo Knudson con homogenizado de papa y homogenizado de plátano fueron sugerencia directa de Phillip Seaton, quien fue contactado por ser especialista en siembra *in vitro* de semillas de orquídeas. Se reconoce la papa como un suplemento natural que contiene complejos orgánicos que no han sido del todo definidos. En estudios de orquídeas, la adición de estos compuestos orgánicos al medio de cultivo han sido previamente exitosos (Castañeda 2008).

De acuerdo a Castañeda (2008), la papa es un tubérculo que consta de un 80% de agua, contiene también carbohidratos y almidones que representan el 20% y 75% respectivamente de la materia seca. Así mismo, contienen vitamina C y algunas del complejo B, es rica en minerales, que constituyen el 1% total de la papa. El potasio es el componente principal y elemento mayoritario. Estos compuestos, junto con otros son utilizados para promover el crecimiento y desarrollo de la planta. Adicionalmente, la única diferencia entre estos medios y el medio Knudson es el homogenizado, por lo que son ingredientes fáciles de encontrar y accesibles de precio.

Los medios de cultivo con homogenizado de papa y plátano se utilizaron debido a que el plátano como suplemento nutricional es una excelente fuente de potasio. Este es elemento esencial de ácidos nucleicos y ATP, esencial para la fotosíntesis y respiración, promueve el desarrollo de la planta y el crecimiento de raíz (Greisen 2000).

Las cápsulas fueron colectadas según su disponibilidad, pues el tiempo de maduración de cápsula es muy distinto en todas las especies. El tiempo que requiere la maduración de cápsulas en orquídeas depende no solamente de la composición genética sino también de factores ambientales y del cultivo. En clima tropical o caluroso, las cápsulas maduran más rápido de lo normal pero si éstas son colectadas antes de tiempo, podrían no germinar (Greisen 2000). Se recomienda ampliar información de cómo reconocer una cápsula madura para obtener cápsulas con semillas viables debido a que, si se colectan antes de tiempo (inmaduras), éstas podrían no germinar. Cada especie tiene diferente época de maduración, es por eso que se recomienda, así mismo, conocer por lo menos el género de la cápsula para saber si se puede colectar.

El procedimiento realizado para la desinfección de cápsulas fue el mismo para las cinco especies, por lo que no influyó en la germinación de las semillas, a pesar de tener réplicas de cada medio de cultivo. Uno de los factores que pudo haber influido en el poco número de semillas germinadas fue que, a pesar del control que se tuvo al abrir la cápsula dentro de una caja Petri, al abrirla dentro de la campana de flujo laminar, estas volaron por el flujo de aire y se pudo haber perdido parte mínima de la muestra. En la especie *L. oncioides* no se tuvo pérdida de semillas debido a que se extrajeron semillas inmaduras, éstas se encontraban pegadas en la parte interna de la cápsula. Previo a la siembra, se secaron las semillas de las cinco especies en una desecadora de vidrio. Este método de secado con cloruro de litio es uno de los más utilizados para poder almacenar las semillas (Seaton y Ramsay 2009). Se sugiere utilizar cajas Petri más altas para que el aire no pegue directo a las semillas.

El número de réplicas entre especies varía debido a que las cápsulas de las especies obtenidas son de diferente tamaño y por lo mismo, hay más semillas en las cápsulas grandes. Así mismo, las cápsulas inmaduras tienen menos semillas pues se encontraban pegadas la una con la otra, teniendo menos cantidad dentro de una cápsula. Las semillas más abundantes fueron las de *E. radicans*, que estaban dentro de una cápsula más grande.

D. Germinación

La germinación se observa por la presencia de protocormos verdes los cuales tienen contacto con el medio de cultivo. Estos se desarrollan alrededor de dos a tres semanas después de la siembra. El tiempo de germinación varía según la especie.

1. Método de desinfección. Se considera que el método de desinfección de cápsula no tuvo influencia en la germinación de semillas de las cinco especies de orquídeas (Ver Figura 2). Sin embargo, en el caso de *L. oncidoides*, se infiere que no germinó porque las semillas se observaban inmaduras (sin forma definida y se pegaban entre sí) y por lo tanto se cree, no eran viables. Las otras cuatro especies sí germinaron. Sin embargo, el que no se sugiere por su simpleza es el método 3 (flameo), pues se considera que la llama por unos segundos no es suficiente para esterilizar la capa gruesa de la cápsula. Los otros dos métodos consisten en una desinfección más profunda, por lo que se recomienda su utilización, principalmente si se está utilizando otra especie diferente a las utilizadas en el presente trabajo. Adicionalmente, no hay diferencia entre los métodos de desinfección debido a que solamente se utilizó cápsulas cerradas, cuyas semillas están estériles en su interior. Los métodos de desinfección son útiles para desinfectar la parte externa de la cápsula y que así, durante el procedimiento del primer corte, las semillas y el material utilizado no se contaminen.

2. Medio de cultivo. No hay diferencia significativa entre los medios de cultivo (ver apéndice B, Cuadro .4) para la germinación de semillas. Sin embargo, se recomienda utilizar los medios con homogenizados, así como mayor número de réplicas por cada medio de cultivo, debido a que se obtuvo un mayor porcentaje de germinación. Esta diferencia, aunque no es significativa, se debe a que los medios con homogeneizado tienen mayores concentraciones de nutrientes como potasio y carbohidratos.

De acuerdo con Molnár *et al* (2011), el extracto de papa contiene carbohidratos, aminoácidos, vitaminas como C, B1 y B6, así como minerales (potasio, hierro y

magnesio). Si bien generalmente éste tipo de aditivo orgánico se utiliza para cultivo de anteras, este ha sido agregado al medio de cultivo para micropropagación de orquídeas y ha sido efectivo para especies como *Phalaenopsis* y *Doritaenopsis*.

De acuerdo con Islam *et al* (2011), hay estudios que establecen que el extracto de papa contiene niacina, lo cual induce el crecimiento de orquídeas. También hay otros que reportan que niacina y tiamina pueden inducir la germinación de orquídeas y el crecimiento de plántulas y que es posible encontrar estos compuestos en el extracto de papa o en combinación con otras sustancias orgánicas desconocidas. Incluso se menciona en un reporte de (Akter *et al* 2007), quienes trabajaron con *Oncidium* y reportaron que el crecimiento de planta fue mejor en el medio que contenía extracto de banano, zanahoria, papa, agua de coco y triptona. Este crecimiento fue exitoso en cuanto a altura de la planta, número de hojas, número de raíces, largo de raíz, peso fresco y seco. El mismo crecimiento exitoso ha sucedido en otros estudios con *Cattleya*, *Phalaenopsis* y *Vanda*.

Se considera el uso de varios aditivos orgánicos para cultivo de tejidos vegetales para promover el crecimiento de plantas incluyendo extracto de banano, papa y jugo, extracto de papaya y maíz (Nambiar *et al* 2012). Estos ayudan en producir más protocormos, plántulas y hojas. También sugiere que se agregan estos aditivos debido a que contienen vitaminas naturales, feromonas, hormonas y proteínas, así como lípidos y minerales.

3. Especies. De acuerdo con la germinación observada en *E. radicans*, se observó que el empleo de los medios Knudson y ½ MS fueron los más exitosos en germinación. Aquí se observa que la presencia de un medio con más nutrientes no es necesaria, Knudson contiene agua de coco (ver apéndice, Cuadro 1) y ½ MS los nutrientes necesarios para su germinación, una fuente adicional de potasio y otros nutrientes no es requerida para *E. radicans*.

En cuanto a *G. aurantiaca*, el medio de cultivo Knudson con homogenizado de papa y Knudson con homogenizado de plátano fueron los medios con los que se obtuvo más germinación. Esto hace evidente la necesidad de nutrientes adicionales

que esta especie necesita para germinar, se recomienda sembrar semillas de *G. aurantiaca* en medios Knudson con homogenizado de papa y Knudson con homogenizado de plátano como alternativa.

M. variabilis tuvo germinación exitosa en los medios con homogenizados de papa y plátano, así mismo, se observó germinación en medio ½ MS, por lo que se infiere que estas semillas no necesitan un tipo específico de medio. Pueden crecer en medios de cultivo con bastantes nutrientes como en el medio Knudson o bien, con menos azúcar y menos potasio, como en ½ MS. Se sugiere que la siembra de las semillas de *M. variabilis* se realice en medio Knudson con homogenizado de plátano y papa para obtener mejores resultados de germinación (ver Figura 6), sin embargo, no se debe descartar su siembra en medio ½ MS.

Para *Oncidium* sp, los cuatro medios de cultivo utilizados fueron efectivos para la germinación de las semillas, sin embargo, sí se observa diferencia en la germinación por especie debido a que sus cápsulas y tamaño de semillas son diferentes. Así mismo, hubo mayor germinación en ½ MS. Los medios de cultivo y desinfección influyen en el porcentaje de germinación por especie (ver apéndice, Figura 8).

Como se había mencionado con anterioridad, *L. oncidoides* no germinó debido a que las cápsulas que se obtuvieron estaban aún inmaduras, por lo que los embriones aún no eran viables.

E. Contaminación

1. Método de desinfección. Se observó que la contaminación presente en los medios de cultivo se dio por presencia de hongos. Existen dos formas posibles que pudo contaminarse las semillas: 1. Por la apertura de la cápsula en la campana de flujo laminar y 2. La cápsula ya estaba en dehiscencia. En el primer caso, se pudo dar porque el método de desinfección no fue suficiente para esterilizar la capa externa de la cápsula. En el segundo caso, es posible que la cápsula haya estado abierta al momento de la colecta y que no haya sido visible.

En el caso de *G. aurantiaca*, los métodos de desinfección 1 (Tween y peróxido) y 3 (flameo), no se recomienda para la desinfección de cápsula de dicha especie. Estos métodos son los que tienen menos tiempo de sumersión en soluciones de limpieza, como el peróxido por 15 minutos del tratamiento 1, para el tratamiento 3 sólo sumergir la cápsula en etanol y flamear. Se considera que las cápsulas de *G. aurantiaca* necesitan un tratamiento de cloro a una mayor concentración (15% aproximadamente) para no contaminarse. Se cree que la contaminación se da porque las cápsulas de la especie son bastante gruesas y necesitan estar en una solución por más tiempo.

Las cápsulas de *M. variabilis* no deben ser desinfectadas por el método 2 (etanol y cloro). Esta especie no tuvo ningún tipo de contaminación con el método 1 y 3, esto puede deberse a que las cápsulas son más pequeñas, por lo que el tratamiento simple de flameo y el estar poco tiempo en solución de Tween y peróxido, es suficiente. Es suficiente desinfectarlas con peróxido por 15 minutos y/o con el tratamiento 3 que sólo consiste en sumergirlas en etanol y flamear.

Las cápsulas de *E. radicans* pueden ser desinfectadas con el método 1 (Tween y peróxido), pues fue el que menos se contaminó. Se puede observar (Ver Figura 5) que con los otros dos métodos de desinfección hubo más presencia de contaminación. Si bien en el método 1 se sumergen las semillas por menos tiempo en cloro al 10% 10

minutos, (en comparación con el método dos que trata las semillas por 45 minutos con cloro 10%), es el más eficiente por la utilización de peróxido como desinfectante. Se considera esa eficiencia debido a que el peróxido de hidrógeno reduce los grupos funcionales de las enzimas debido a los radicales libres que también oxidan esos grupos. Así mismo, se ha visto que elimina virus, bacterias y algunos protozorarios, así como esporas a bajas temperaturas (Rojas *et. al.*2008). En comparación con el cloro, este tiene capacidad germicida que puede penetrar en la pared celular pero también altera funciones específicas de las proteínas e inhibe procesos metabólicos de bacterias y virus, impidiendo así su proliferación en el cultivo (Rojas *et. al.*2008).

Para *Oncidium* sp., el método 2 de desinfección es el adecuado pues es el que menos se contaminó (ver Figura 5). Estas cápsulas son pequeñas y no son tan gruesas, por lo que no necesitan un tratamiento en las que estén sumergidas por tanto tiempo como lo es el cloro 10% por 45 minutos. Las semillas contaminadas solamente presentaron contaminación con el medio de cultivo ½ MS, fue en un 36% más que las demás (este porcentaje no es significativo), por lo que no se tomará en cuenta (ver Apéndice E). Se observa, por ende, que por especie, la que presentó mayor contaminación fue *G. aurantiaca* (ver Figura 7).

Los métodos 1 y 3 de desinfección son recomendables utilizar para la especie *L. oncidioides*. Como se ha explicado anteriormente, se considera que el tamaño de las cápsulas tiene relación con la efectividad de desinfección del método. Por lo que se puede inferir que siendo estas cápsulas más pequeñas y de menor grosor pueden ser desinfectadas con métodos más simples como el flameo y peróxido. Todo esto indica que el método de desinfección no juega un papel determinante en los porcentajes de contaminación (ver apéndice C, Cuadro1). Uno de los factores de contaminación se sugiere, es que provenga de la cápsula.

2. Medio de cultivo. El medio de cultivo no influye en los porcentajes de contaminación (ver apéndice, C.4). De acuerdo a los resultados en los cuatro medios de cultivo, el que tuvo mayor contaminación visible fue Knudson con homogenizado de papa y el que tuvo menor contaminación fue ½ MS. Sin embargo, no es posible

generalizar en este caso debido a que el porcentaje de contaminación depende mucho más de la especie que del medio de cultivo.

3. Especies. En cuanto a *G. aurantiaca*, se observa una contaminación del 100% en los cuatro medios de cultivo utilizados. Se cree que las semillas ya estaban contaminadas y que el medio de cultivo no influye en su germinación pues con uno de los métodos de limpieza sí germinó con los cuatro medios. *L. oncidioides* obtuvo el mayor resultado de contaminación en el medio Knudson con homogenizado de papa. Esto puede deberse a que el medio de cultivo con papa tiene muchos nutrientes que facilitan la proliferación del hongo. Las semillas de *E. radicans* se consideran las más viables pues se obtuvo bajos porcentajes de contaminación, por método de desinfección y medio de cultivo. No hay mucha diferencia en los porcentajes de contaminación por especie, cada especie tiene su fuente de contaminación; pudiendo ser por exceso de nutrientes de los medios o que la cápsula ya estaba contaminada antes de la siembra (ver apéndice, figura C.6). Considerando que a partir de la limpieza de cápsulas se tuvo control de usar guantes nuevos, instrumentos estériles (rociado todo con etanol 70%), cabello agarrado, manos dentro de campana, se descarta la técnica como la causa de contaminación.

F. Viabilidad y su relación con la germinación

La viabilidad se refiere a la capacidad de germinación de una semilla y si ésta está viva. La determinación de viabilidad de las semillas permite conocer el estado de conservación en el que se encuentran (Lallana y García 2013; Ossenbach *et. al.* 2006). De acuerdo a lo observado en el Cuadro 4, para *E. radicans* se observó una fuerte correlación, la cual es inversamente proporcional, indicando que mientras más embriones viables se observó, menos germinación se obtuvo. Mientras que para *G. aurantiaca*, el coeficiente de correlación entre porcentaje de germinación y porcentaje de viabilidad no fue fuerte pero tampoco significativo para la germinación. En cuanto a *Oncidium* sp, el coeficiente de correlación fue adecuado debido a que se observó embriones viables que sí germinaron. *L. oncidioides* no se calculó debido a que no hubo germinación, por lo cual se sabe que no tenía embriones viables. *M. variabilis*,

de valor similar a *E. radicans*, no tuvo germinación pero sí embriones viables. Este método de viabilidad es posible que no haya sido el mejor debido a que los embriones se observan amarillos, asemejando viabilidad pero sí puede ser que no lo sean. Es por esto que existen métodos como Tetrazolio para detección de embriones viables, el cual estos se tiñen de rojo (Lallana y García 2013).

G. Introducción de semillas al banco

Se introdujo semillas viables al banco de semillas del laboratorio de cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala. Se introdujo las semillas de *E. radicans* el 5 de marzo 2014, *G. aurantiaca* el 11 de marzo 2014, *Oncidium* sp. El 4 de abril 2014 y *M. variabilis* el 31 de marzo 2014. Las semillas de *L. oncidioides* no fueron introducidas debido a que las semillas no eran viables. Las semillas fueron colocadas en frascos de vidrio tapados por completo con parafilm sobre la tapadera, dentro de un contenedor con sílica gel en un congelador a -20°C.

V. CONCLUSIONES

- Aunque no existe diferencia significativa, (0.574), el mejor método de desinfección de acuerdo al promedio de porcentaje de germinación (19%) fue el método 2 (etanol y cloro). El peor método de desinfección fue método 3 (flameo) con un porcentaje de 8.8%.
- Aunque no existe diferencia significativa (0.993), el mejor medio de cultivo de acuerdo al promedio de porcentaje de germinación (37%) fue Knudson con homogenizado de papa. El peor método de cultivo fue ½ MS con un porcentaje de germinación de 6.66%.
- La especie que tuvo mayor porcentaje de germinación fue *Maxillaria variabilis* con un promedio de 25.74%. La especie que tuvo menor porcentaje de germinación fue *Leochilus oncidioides* con 0%.
- Aunque no existe diferencia significativa (0.438), el método menos efectivo de desinfección de acuerdo al promedio de porcentaje de contaminación (26.51%) fue el método 2 (etanol y cloro). El método de desinfección más efectivo de acuerdo al porcentaje de contaminación fue el método 3 (flameo) con un promedio de 22.74%.
- Aunque no existe diferencia significativa (0.993), el método de cultivo menos efectivo de acuerdo al promedio de porcentaje de contaminación (431.506%) fue Knudson con homogenizado de papa. El medio de cultivo más efectivo de acuerdo al promedio fue Knudson con homogenizado de plátano con 22.271%.

- La especie que tuvo mayor porcentaje de contaminación fue *Guarianthe aurantiaca* con un promedio de 79.32%.
- No existe una correlación (-0.032, valor general) entre los porcentajes de germinación y los porcentajes de viabilidad.
- Se introdujo semillas de *Epidendrum radicans*, *Guarianthe aurantiaca*, *Maxillaria variabilis* y *Oncidium* sp al banco de semillas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala.

VI. RECOMENDACIONES

- En este trabajo se obtuvo resultados de germinación de cápsulas recién cortadas. Se recomienda sembrar las semillas almacenadas cada año para determinar el tiempo de viabilidad que tienen a -20°C .
- Por otra parte, en este trabajo se utilizaron cinco especies, por lo que se debe también ampliar el número de especies para conocer los métodos de desinfección aplicables por especie, pues se considera que no todos tienen los mismos resultados.
- Se recomienda el uso general de medio de cultivo Knudson con homogenizado de papa (Ver Apéndice A).
- Se recomienda la desinfección de cápsula en general y sumergirla 15 segundos en etanol y 45 minutos en cloro 10%. etanol y cloro.
- Realizar los mismos análisis de desinfección con cápsulas grandes y pequeñas y poder determinar si el grosor y el tamaño tienen influencia en la contaminación.
- Se sugiere probar tetrazolio para detección de embriones viables en semillas de orquídeas debido a que este es sugerido por autores como Lallana y García (2013). “poner citas”
- Ampliar literatura sobre reconocimiento de cápsulas maduras según especie de orquídea.
- Sacar las semillas dentro de campana de flujo laminar y hacerlo dentro de una caja Petri procurando que la tapa superior sirva de barrera contra el aire estéril para que las semillas no se dispersen.

- Dejar los medios de cultivo suficiente tiempo dentro de campana de flujo laminar para que gelifique por completo y evitar posterior condensación. El calor del autoclave promueve que se acumulen gotas de agua dentro de los frascos y si no se deja tiempo suficiente dentro de campana, esa condensación queda. Las semillas de orquídea son muy pequeñas y el agua puede evitar que las semillas estén completamente sobre el medio de cultivo.
- Sembrar regularmente las mismas semillas para determinar su tiempo de viabilidad.

VII. LITERATURA CONSULTADA

- Akter, S., K. Nasiruddin y A. Khaldun. 2007. *Organogenesis of Dendrobium orchid using traditional media and organic extracts*. Journal Agriculture & Rural Development. 5(1&2)30-35.
- Ames, O. y D. Stewart. 1985. *Orchids of Guatemala and Belize*. Dover Publications, Inc. New York. 779 pp.
- Anaya, A. 2003. *Ecología Química*. Plaza y Valdez. México, Distrito Federal. 349 pp.
- Arditti, J. 2009. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons. United Kingdom. 1560 pp.
- Bottani, E. y H. Odetti. 2006. *Química inorgánica*. Universidad Nacional del Litoral. Argentina. 428 Pp.
- Chacón, J. 2011. *Producción de orquídeas bajo condiciones tropicales*. Agro-AL DÍ. Boletín Técnico quincenal de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica. Año 1. No. 4. 5 pp.
- Dix, M.A. y M. Dix. 2006. *Diversity, distribution, ecology and economic importance of Guatemalan orchids*. En Biodiversidad de Guatemala volumen I. editor Enio Cano. Universidad del Valle de Guatemala. 187-198.
- European Native Seed Conservation Network (ENSCONET). 2009. *ENSCONET Curation Protocols & Recommendations*. 2009. En:

http://www.kew.org/sites/default/files/ENSCONET_Curation_protocol_English.pdf. Fecha de consulta: 21 de octubre 2015.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012. *Cryoconservation of animal genetic resources*. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 12. Rome. 222 pp.
- George, E. M. Hall y G. De Klerk. 2007. *Plant propagation by tissue culture: Volume 1. The Background*. Springer Science & Business Media. The Netherlands. 502 Pp.
- Greisen, K. 2000. *Commercial Propagation of Orchids in Tissue Culture: Seed-Flasking Methods*. Kay S. Greisen Specialties. United States of America. 63 pp.
- Hartmann, W. 1971. *Introducción al cultivo de las orquídeas*. Editorial Fournier, S.A. México. 109 pp.
- Iriondo, J. 2001. *Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas*. Universidad Politécnica de Madrid. Prod. Prot, Veg. 16 (1):1- 24.
- Islam, M. M. Akter y A. Prodhan. 2011. *Effect of potato extract on in vitro seed germination and seedling growth of local Vanda roxburgii orchid*. Bangladesh Agricultural University. 9(2): 211-215.
- Jardín Botánico de la Universidad de Valencia. 2000. *Plants, germplasm bank*. EN: <http://www.jardibotanic.org/colbanc.php?idioma=eng>. Fecha de consulta: Agosto 2015.

- Jevšnik, Tomaz, Zlata Luthar. 2015. *Successful disinfection protocol for orchid seeds and influence of gelling agent on germination and growth*. Acta agriculturae Slovenica. 95-102.
- Knutson, Lloyd, Allan Stoner. 1989. *Biotic diversity and Germplasm preservation, global imperatives*. Springer Science & Business Media. 532 Pp. En:https://books.google.com.gt/books?id=OgdBB2ZTGKEC&vq=germplasm+banks&dq=orchid+germplasm+banks&source=gbs_navlinks_s Fecha de consulta: 28 de septiembre 2015.
- Lallana, V. y L. García. 2013. *Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de Trichocentrum jonesianum*. Investigación Agraria. 15(2):129-132.
- Macz, O. 1995. *Manual para la propagación de orquídeas in vitro*. Programa de Fortalecimiento Académico de las Sedes Regionales, PROFASR. 90 pp.
- Molnár, Zoltán, Emese Virág, Vince Ördög. 2011. *Natural substances in tissue culture media of higher plants*. University of West Hungary. Acta Biologica Szegediensis. 55(1): 123-127.
- Mosqueda, A., J. Cázares y E. de la Cruz. 2010. *Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco*. Tabasco, México. 31 pp. <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdfh>
- Nambiar, N., Tee, C. y M. Maziah. 2012. *Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm-like bodies in Dendrobium Alya Pink*. Malasyia. Plant Omics Journal. 5(1): 10-18.

- Naranjo, E. y R. Dirzo. 2009. *Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna*. Capital natural de México. CONABIO, México, 247-276.
- Paulete, J. 2007. *Cultivo de semillas en frascos*. En: <http://microplanta.wordpress.com/2007/01/12/cultivo-de-semillas-en-frascos/>
Fecha de consulta: 5 de junio 2014.
- Razdan, M. 2003. *Introduction to plant tissue culture*. Science Publishers. United States of America. New Delhi. 375 Pp.
- Rodríguez, Helga. 2010. *Estudio de factibilidad para el establecimiento de bancos de germoplasma del INTA*. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en el Marco del programa de Fomento para la Producción sostenible. Costa Rica. 48 Pp.
- Rojas, María, M. Orta y V. Franco. 2008. *Comparación de mecanismos de acción de desinfectantes aplicados en aguas residuales*. Aquaforum. Universidad Nacional Autónoma de México. (49) 19-22. En: http://seia.guanajuato.gob.mx/document/AquaForum/AF49/AF4904_ComparacionMecanismosAccion.pdf. Fecha de consulta: 2 de octubre 2014.
- Sánchez, N. y V. Jiménez. 2010. *Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales*. San Pedro, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 21:(1):Pp193-205.
- Sarkar, A. 2009. *Plant stem cells*. Discovery Publishing House. New Delhi. 324 Pp.

- Seaton, P. y M. Ramsay. 2009. *Cultivo de orquídeas por semillas*. Kew Publishing. Reino Unido. 82 pp.

- Tarré, E., B. Balzana, A. Mançano, L. Alves, R. Campostrini y E. Mansur. 2007. *Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic Encholirium Mart. Ex Schult. & Schult. F. and Dyckia Schult. & Schult. F. species (Bromeliaceae)*. São Paulo. Acta Botanica Brasílica. Vol 21 No. 4

- Vijayakumar, S. Rajalkshimi, G y K. Kalimuthu. 2012. *Propagation of Dendrobium aggregatum by green capsule culture*. Universidad de Costa Rica. Lankesteriana 12(2): 131-135.

VIII. APÉNDICES

Apéndice A. Soluciones para medios de cultivo

Cuadro 1. Preparación de medio Knudson y Knudson con agregados de plátano o banano para un litro

Medio Knudson (para 1 litro)	
Reactivo	Cantidad
MS Micro Stock	1ml
Stock de hierro	1ml
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.25g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g
Agua de coco	0.1 (100ml)
Sacarosa	20 g
Homogenizado de plátano o papa (con 25 ml agua destilada)*	100g
H ₂ O	Ajustar volumen
pH	5.5
Gelrite	3g
NAA Stock 1 mg/ml	18.6 ul
BA Stock 1m g/ml	180.24 ul
Carbón activado	2.5 g

*Se utilizará el mismo peso de papa o plátano para los homogeneizados.

Cuadro 2. Preparación de medio MS

Medio MS (para 1 litro)	
Reactivo	Cantidad
MS Macro	100 ml
MS Micro	1ml
Ca	10 ml
Fe	10 ml
Vitamina B5	2ml
Sucrosa	30g
H2O	Agustar volumen
pH	5.8
Gelrite	2g
Autoclavear	

(Murashinge & Skoog 1962; Gamborg *et al* 1968)

Para la preparación del medio utilizado $\frac{1}{2}$ MS se toma la mitad de los valores y se afora a 1L.

Apéndice B. Análisis estadístico de germinación

Cuadro 1. Datos brutos de germinación con número de réplicas y media.

Tratamientos / Réplicas			Réplicas				Media	
			1	2	3	4		
1	Epidendrum radicans	Método 1	Kn	55.5555556	26.6666667	13.3333333	NA	31.852
			Kn papa	11.1111111	0	13.3333333	NA	8.1481
			Kn plátano	11.1111111	0	0	NA	3.7037
			1/2MS	8.8888889	13.3333333	55.5555556	0	19.444
		Método 2	Kn	22.2222222	22.2222222	20	NA	21.481
			Kn papa	22.2222222	17.7777778	0	NA	13.333
			Kn plátano	11.1111111	24.4444444	20	NA	18.519
			1/2MS	17.7777778	17.7777778	28.8888889	24.4444444	22.222
		Método 3	Kn	28.8888889	13.3333333	0	NA	14.074
			Kn papa	17.7777778	13.3333333	17.7777778	NA	16.296
			Kn plátano	20	15.5555556	13.3333333	NA	16.296
			1/2MS	31.1111111	13.3333333	24.4444444	0	17.222
Tratamientos/Réplicas			Réplicas				Media	
			1	2	3	4		
2	Guarlanthe aurantiaca	Método 1	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	0	0	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	0	0	0	NA	0
		Método 2	Kn	55.5555556	NA	NA	NA	55.555
			Kn papa	100	97.7777778	NA	NA	98.889
			Kn plátano	66.6666667	NA	NA	NA	66.666
			1/2MS	35.5555556	31.1111111	33.3333333	NA	33.333
		Método 3	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	0	0	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	0	0	0	NA	0
3	Maxillaria variabilis	Método 1	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	80	NA	NA	NA	80
			Kn plátano	77.7777778	NA	NA	NA	77.778
			1/2MS	68.8888889	NA	NA	NA	68.889
		Método 2	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	0	NA	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	0	NA	NA	NA	0
		Método 3	Kn	22.2222222	NA	NA	NA	22.222
			Kn papa	31.1111111	NA	NA	NA	31.111
			Kn plátano	28.8888889	NA	NA	NA	28.889
			1/2MS	0	NA	NA	NA	0

4	Oncidium sp	Método 1	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	0	NA	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	0	NA	NA	NA	0
		Método 2	Kn	15.5555556	NA	NA	NA	15.556
			Kn papa	0	NA	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	20	NA	NA	NA	20
		Método 3	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	13.3333333	NA	NA	NA	13.333
			Kn plátano	8.88888889	NA	NA	NA	8.8889
			1/2MS	0	NA	NA	NA	0
5	Leochilus oncidioides	Método 1	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	0	NA	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	0	NA	NA	NA	0
		Método 2	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	0	NA	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	0	NA	NA	NA	0
		Método 3	Kn	0	NA	NA	NA	0
			Kn papa	0	NA	NA	NA	0
			Kn plátano	0	NA	NA	NA	0
			1/2MS	0	NA	NA	NA	0

Cuadro 2. Comparación de métodos en germinación. Porcentaje de germinación con base en el método de desinfección.

Especie	Medio	Método 1	Método 2	Método 3
<i>Epidendrum radicans</i>	Kn	31.85185	21.48148	14.07407
	Kn papa	8.148148	13.33333	16.2963
	Kn plátano	3.703704	18.51852	16.2963
	1/2MS	19.44444	22.22222	17.22222
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	Kn	0	55.555	0
	Kn papa	0	98.88889	0
	Kn plátano	0	66.666	0
	1/2MS	0	33.33333	0
<i>Maxillaria variabilis</i>	Kn	0	0	22.22222
	Kn papa	80	0	31.11111
	Kn plátano	77.77778	0	28.88889
	1/2MS	68.88889	0	0
<i>Oncidium sp.</i>	Kn	0	15.55556	0
	Kn papa	0	0	13.33333
	Kn plátano	0	0	8.88889
	1/2MS	0	20	0
<i>Leochilus oncioides</i>	Kn	0	0	0
	Kn papa	0	0	0
	Kn plátano	0	0	0
	1/2MS	0	0	0
Promedio		14.49074	18.27772	8.416667

Cuadro 3. Resultado de prueba Kruskal-Wallis de comparación de la germinación de acuerdo al método de desinfección.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje de germinación es la misma entre las categorías de Método de desinfección.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.574	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Cuadro 4. Comparación de Medios. Porcentaje de germinación con base en el medio de cultivo.

Especie	Método	Kn	Kn papa	Kn plátano	1/2MS
<i>Epidendrum radicans</i>	1	31.85185	8.148148	3.703704	19.44444
	2	21.48148	13.33333	18.51852	22.22222
	3	14.07407	16.2963	16.2963	17.22222
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	1	0	0	0	0
	2	55.555	98.88889	66.666	33.33333
	3	0	0	0	0
<i>Maxillaria variabilis</i>	1	0	80	77.77778	68.88889
	2	0	0	0	0
	3	22.22222	31.11111	28.88889	0
<i>Oncidium sp.</i>	1	0	0	0	0
	2	15.55556	0	0	20
	3	0	13.33333	8.88889	0
<i>Leochilus oncioides</i>	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
Promedio		10.71601	17.40741	14.716	12.07407

Cuadro 5. Resultado de prueba Kruskal-Wallis de comparación de la germinación de acuerdo al medio de cultivo.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje de germinación es la misma entre las categorías de Medios.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.993	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Cuadro 6. Comparación de Especies. Porcentaje de germinación con base en la especie de orquídea.

Método	Medio	<i>Epidendrum radicans</i>	<i>Guarianthe aurantiaca</i>	<i>Maxillaria variabilis</i>	<i>Oncidium sp.</i>	<i>Leochilus oncioides</i>
Método 1	Kn	31.852	0	0	0	0
	Kn papa	8.1481	0	80	0	0
	Kn plátano	3.7037	0	77.778	0	0
	1/2MS	19.444	0	68.889	0	0
Método 2	Kn	21.481	55.555	0	15.556	0
	Kn papa	13.333	98.889	0	0	0
	Kn plátano	18.519	66.666	0	0	0
	1/2MS	22.222	33.333	0	20	0
Método 3	Kn	14.074	0	22.222	0	0
	Kn papa	16.296	0	31.111	13.333	0
	Kn plátano	16.296	0	28.889	8.8889	0
	1/2MS	17.222	0	0	0	0
Promedio		16.883	21.204	25.741	4.8148	0

Cuadro 7. Resultado de prueba Kruskal-Wallis de comparación de la germinación de acuerdo a la especie.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje de germinación es la misma entre las categorías de Especies.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.001	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Apéndice C. Análisis estadístico de contaminación

Cuadro 8. Comparación de Métodos. Porcentaje de contaminación con base en el método de desinfección.

Especie	Medio	Método 1	Método 2	Método 3
<i>Epidendrum radicans</i>	Kn	11.11111	22.22222	19.25926
	Kn papa	0	0	0
	Kn plátano	0	22.22222	0
	1/2MS	13.33333	0	0
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	Kn	100	53.33333	100
	Kn papa	100	26.66667	100
	Kn plátano	100	71.85185	100
	1/2MS	100	0	100
<i>Maxillaria variabilis</i>	Kn	0	26.66667	0
	Kn papa	0	100	0
	Kn plátano	0	17.77778	0
	1/2MS	0	66.66667	0
<i>Oncidium sp.</i>	Kn	11.11111	0	0
	Kn papa	33.33333	12.59259	0
	Kn plátano	11.85185	10.37037	0
	1/2MS	33.33333	0	35.55556
<i>Leochilus oncidioides</i>	Kn	0	0	0
	Kn papa	0	100	0
	Kn plátano	0	0	0
	1/2MS	0	0	0
Promedio		25.7037	26.51852	22.74074

Cuadro 9. Resultado de prueba Kruskal-Wallis de comparación de la contaminación de acuerdo a método de desinfección.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje de contaminación es la misma entre las categorías de Método.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.438	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es .05

Cuadro 10. Comparación de medios. Porcentaje de contaminación con base en el medio de cultivo.

Especie	Método	Kn	Kn papa	Kn plátano	1/2MS
<i>Epidendrum radicans</i>	1	11.11111	0	0	13.33333
	2	22.22222	0	22.22222	0
	3	19.25926	0	0	0
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	1	100	100	100	100
	2	53.33333	26.66667	71.85185	0
	3	100	100	100	100
<i>Maxillaria variabilis</i>	1	0	0	0	0
	2	26.66667	100	17.77778	66.66667
	3	0	0	0	0
<i>Oncidium sp.</i>	1	11.11111	33.33333	11.85185	33.33333
	2	0	12.59259	10.37037	0
	3	0	0	0	35.55556
<i>Leochilus oncioides</i>	1	0	0	0	0
	2	0	100	0	0
	3	0	0	0	0
Promedio		22.91358	31.50617	22.2716	23.25926

Cuadro 11. Resultado de prueba Kruskal-Wallis de comparación de la contaminación de acuerdo a medio de cultivo.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje de contaminación es la misma entre las categorías de Medio.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.959	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es .05

Cuadro 12. Comparación de especies. Porcentaje de contaminación con base en la especie de orquídea.

Método	Medio	<i>Epidendrum radicans</i>	<i>Guarlanthe aurantiaca</i>	<i>Maxillaria variabilis</i>	<i>Oncidium sp.</i>	<i>Leochilus oncidioides</i>
Método 1	Kn	11.111	100	0	11.111	0
	Kn papa	0	100	0	33.333	0
	Kn plátano	0	100	0	11.852	0
	1/2MS	13.333	100	0	33.333	0
Método 2	Kn	22.222	53.333	26.667	0	0
	Kn papa	0	26.667	100	12.593	100
	Kn plátano	22.222	71.852	17.778	10.37	0
	1/2MS	0	0	66.667	0	0
Método 3	Kn	19.259	100	0	0	0
	Kn papa	0	100	0	0	0
	Kn plátano	0	100	0	0	0
	1/2MS	0	100	0	35.556	0
Promedio		7.3457	79.321	17.593	12.346	8.3333

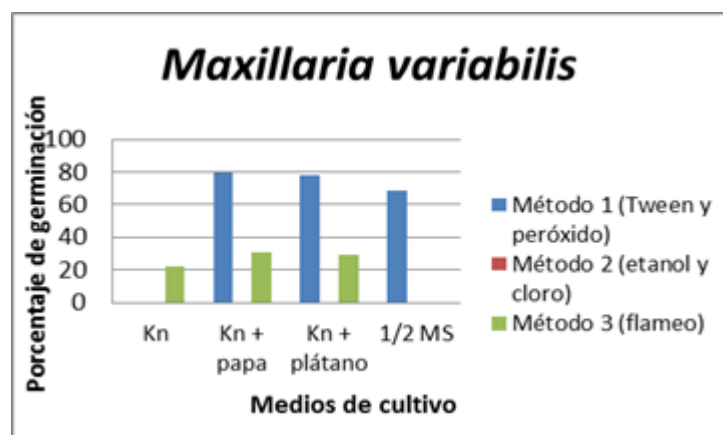
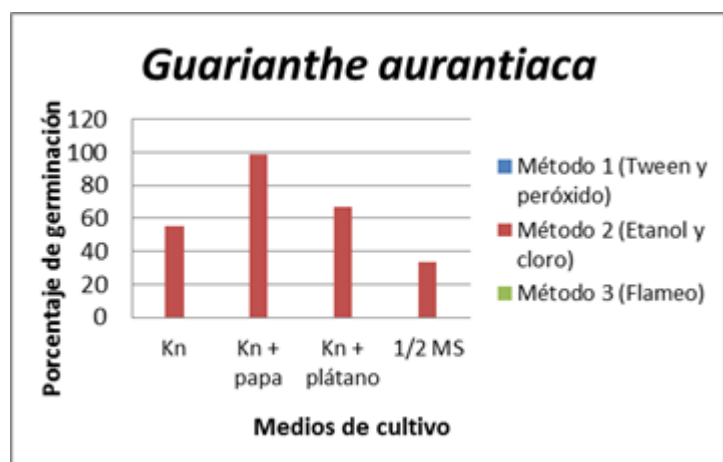
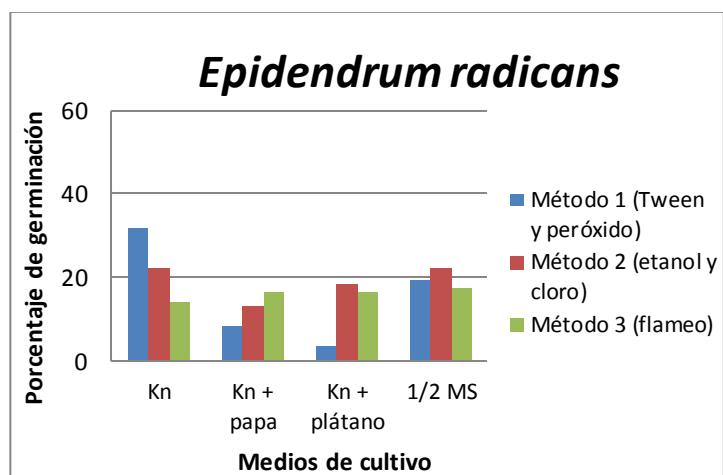
Cuadro 13. Resultado de prueba Kruskal-Wallis de comparación de la contaminación de acuerdo a la especie.

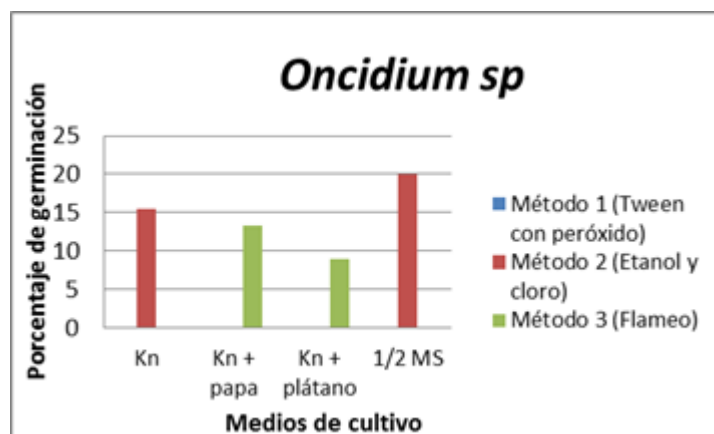
Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje de contaminación es la misma entre las categorías de Especie.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.000	Rechace la hipótesis nula.

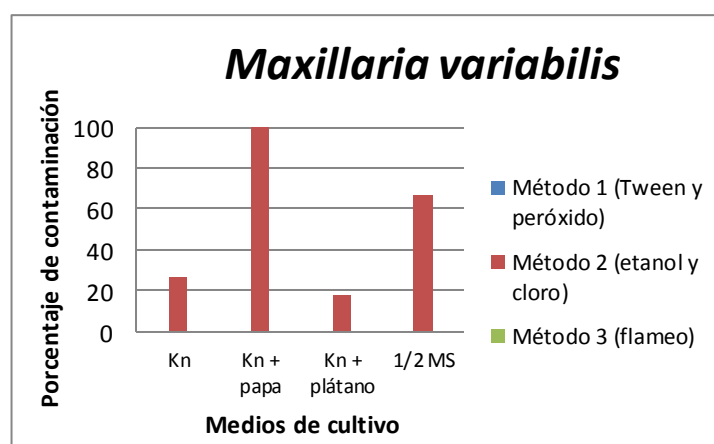
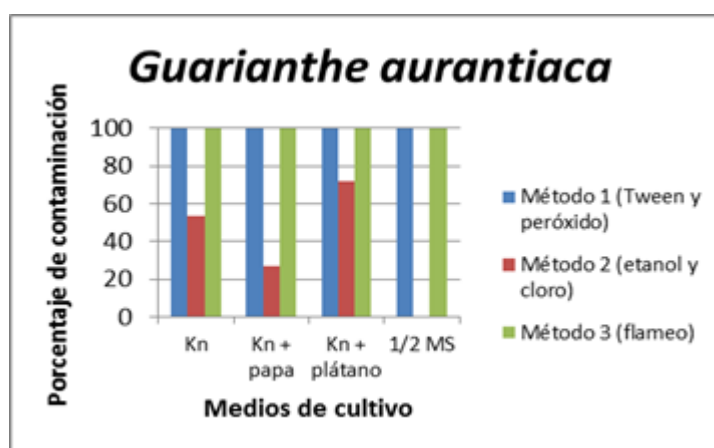
Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es .05

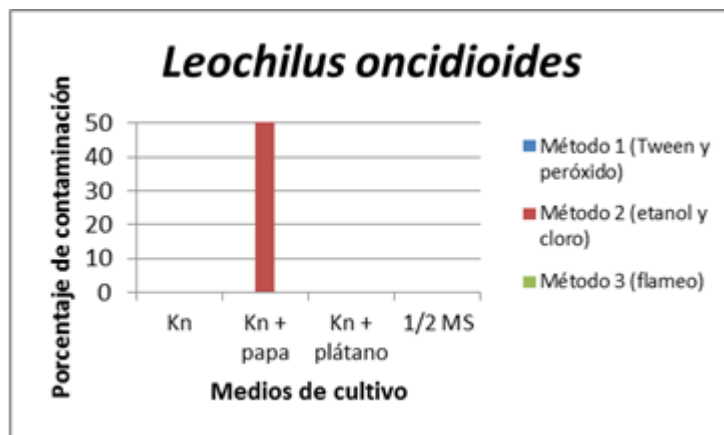
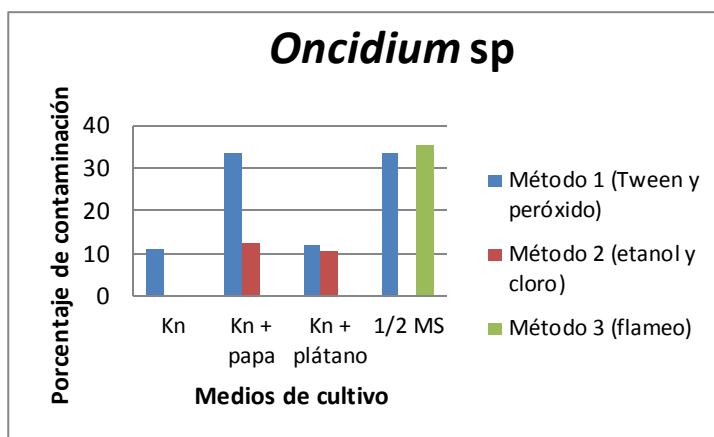
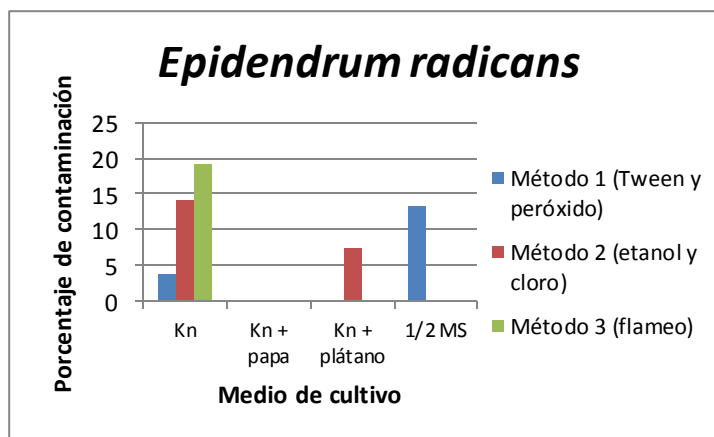
Apéndice D. Gráficas de germinación por especie de acuerdo al método y medios de cultivo





Apéndice E. Gráficas de contaminación por especie de acuerdo al método y medios de cultivo.





Apéndice F. Fotografías de semillas por especie

Figura 1. *Epidendrum radicans* (semillas) 400x

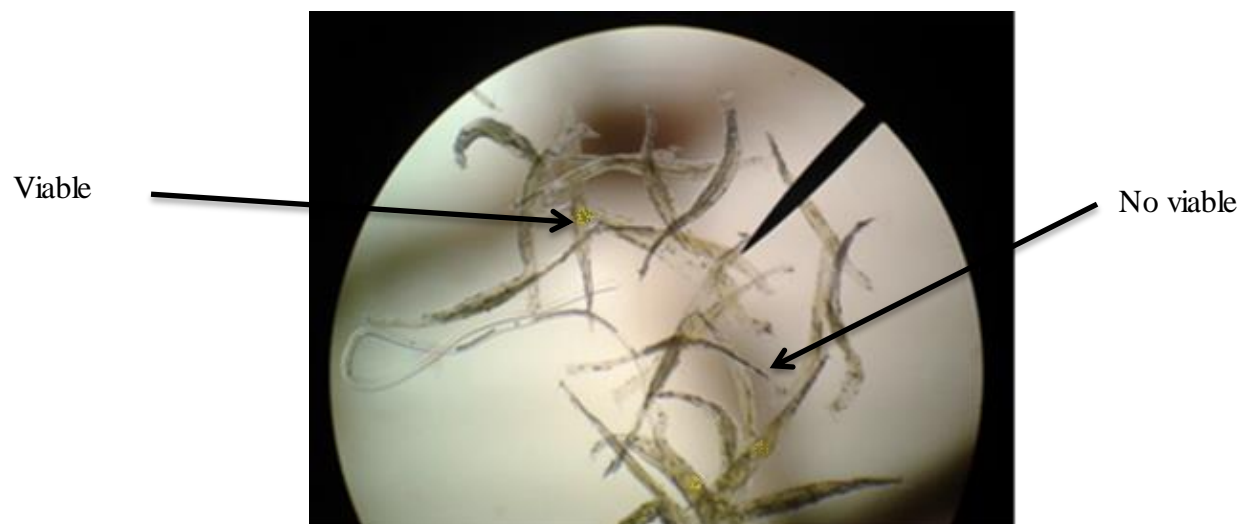


Figura 2. *Epidendrum radicans* (germinación) 100x



Figura 3. *Guarianthe aurantiaca* (semillas) 100x



Figura 4. *Guarianthe aurantiaca* (germinación) 100x

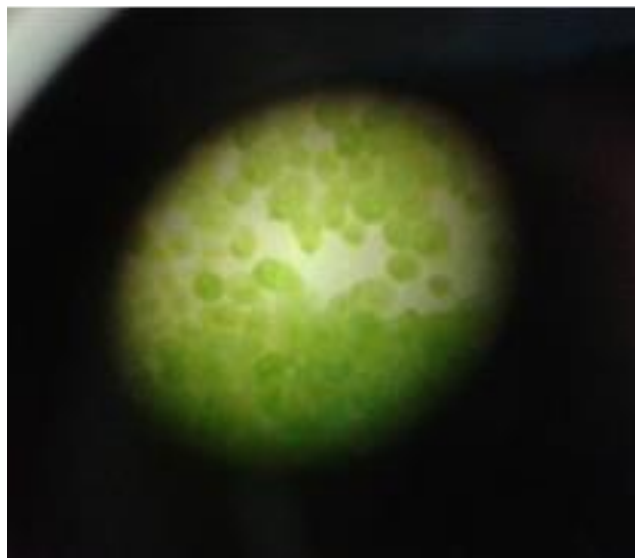


Figura 5. *Maxillaria variabilis* (semillas) 100x

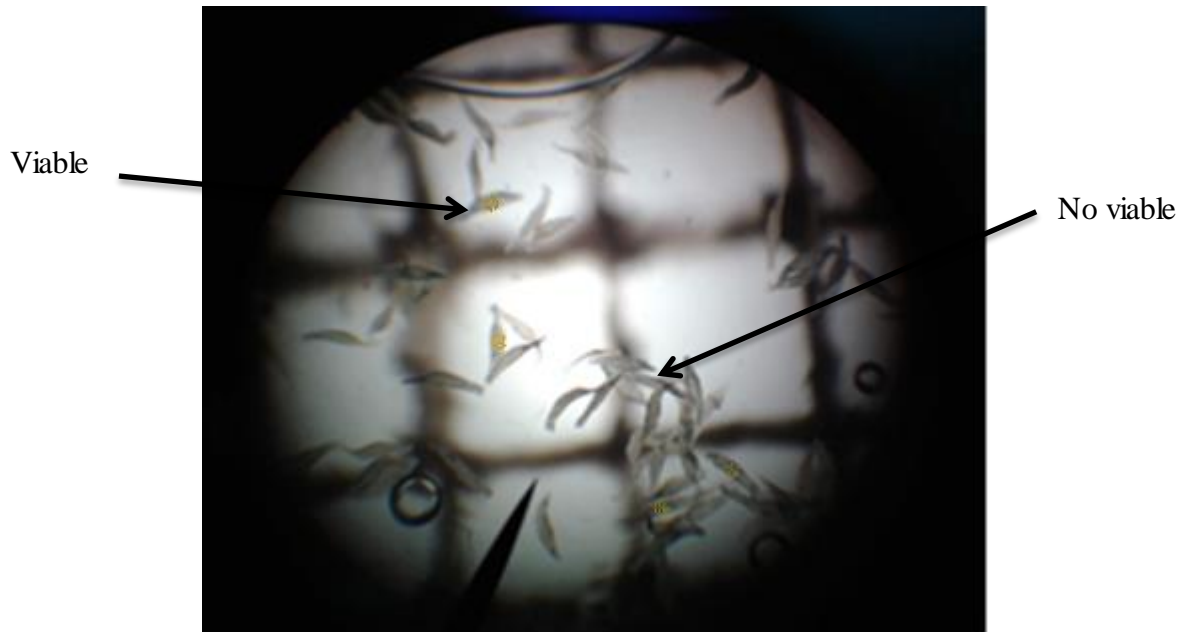


Figura 6. *Maxillaria variabilis* (germinación) 100x

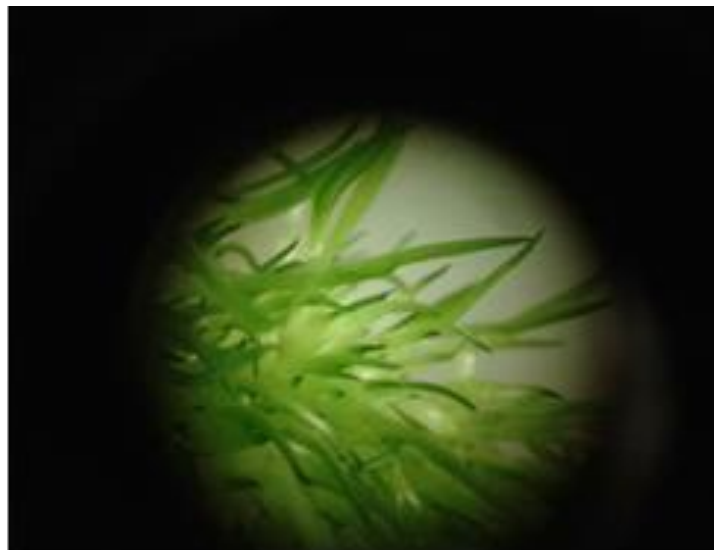


Figura 7. *Leochilus oncioides* (semillas) 100x



No hubo germinación de *Leochilus oncioides*

Figura 8. *Oncidium* sp (semillas) 100x

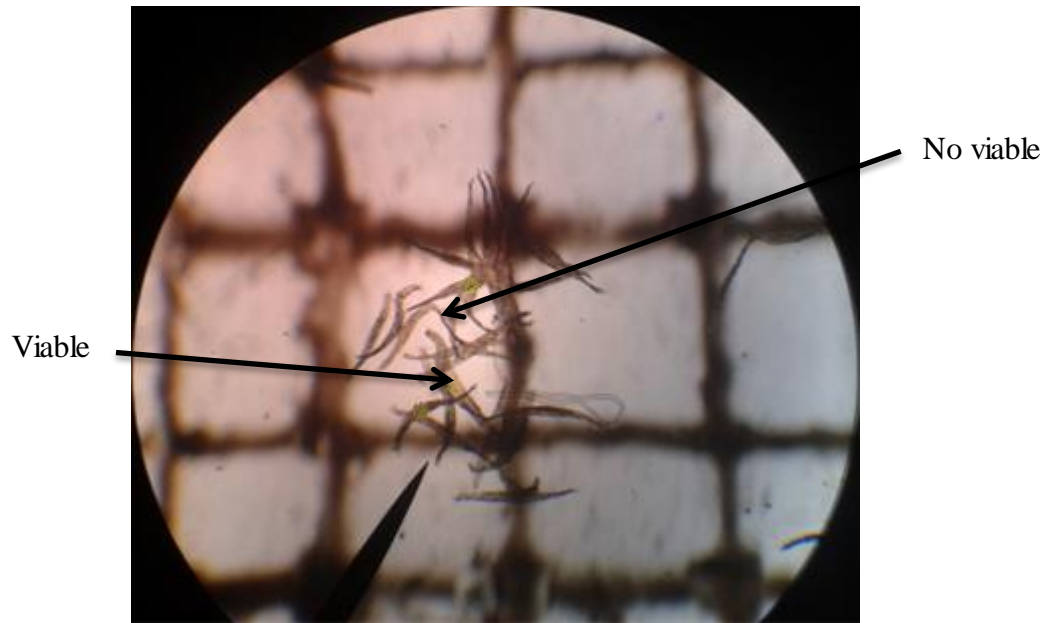


Figura 9. *Oncidium* sp (germinación) 100x

