

Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología



**MICROPROPAGACION DE ORQUÍDEAS A PARTIR DE SEMILLAS EN
CONDICIONES DE CULTIVO IN VITRO**

Tesis Presentada por:

Bachiller. Karina Flores Huisa

Para Optar al Título Profesional de Biólogo

Asesor:

M. Sc. Máximo Américo Chacón Campana

Cusco – Perú

2019

Dedicatoria

- ✓ A Dios por protegerme cada día de mi vida.
- ✓ A mis padres; Apolinaria y Francisco por darme la vida y ser un ejemplo a seguir.
- ✓ A mis hermanos José Luis, Beatriz, Daniel, Juan Carlos, Milagros por sus palabras de aliento a seguir e inolvidables momentos compartidos en familia.
- ✓ A mi mentor Dr. Luis Fernando Miranda Ángeles (†) y familia por haber contribuido a mi formación profesional y todos sus consejos dados a lo largo de mi vida.

Agradecimientos

- ✓ A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por haberme formado en la Carrera de Ciencias Biológicas.
- ✓ A la Universidad Nacional Agraria la Molina y al Instituto de Biotecnología (IBT) por haberme permitido continuar con mi formación profesional.
- ✓ Un agradecimiento a mi asesor M.Sc. Blgo Máximo Américo Chacón Campana por su asesoramiento en la presente Tesis.
- ✓ Al cuerpo docente de la Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Biología, por haber contribuido en mi formación profesional.
- ✓ Mis agradecimientos a la Dra María E. Holgado Rojas, M.Sc Blga Gloria Calatayud Hermosa, al Blgo. Marcial Villafuerte Arriaga, por su ayuda en la colecta de orquídeas y sus valiosos aportes.
- ✓ Al Blgo. Marco León Martínez por su donación de la especie de *Epidendrum macrocarpum* para la realización del trabajo.
- ✓ A mis amigos Percy, Michael, Ruth Lucy, Doris por su constante apoyo a lo largo de nuestra formación y ayuda en la realización del presente trabajo e inolvidables momentos compartidos.
- ✓ A mis amigas Ruth, Neisha, por su ayuda en las mediciones de las plántulas.
- ✓ A mis amigas Karina, Mariluz, Lauria, Eudocia, Anne por brindarme su amistad confianza e inolvidables momentos compartidos a lo largo de nuestra formación profesional.

INDICE

RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN.....	II
PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	III
JUSTIFICACIÓN	IV
OBJETIVOS.....	V
Objetivo general	V
Objetivos específicos	V
HIPÓTESIS	VI

CAPITULO I

1.ANTECEDENTES	- 1 -
1.1. INTERNACIONALES	- 1 -
1.1.1 NACIONALES.....	- 2 -
1.1.2 LOCALES	- 2 -
1.2Marco conceptual.....	- 3 -
1.2.1 Familia Orchidaceae.....	- 3 -
1.2.1.1Genero <i>Prosthechea</i>	- 3 -
1.2.1.2 <i>Prosthechea crassilabia</i> (Poepp. & Endl). Carnevali & I.Ramirez (2003).	- 3 -
1.1.3Género <i>Sobralia</i>	- 5 -
1.1.3.1 <i>Sobralia setigera</i> Poepp. & Endl.(1836).....	- 5 -
1.1.4 Género <i>Epidendrum</i>	- 7 -
1.1.4.1 <i>Epidendrum macrocarpum</i> Rich (1792).....	- 7 -
1.3 Cultivo in vitro	- 8 -
1.3.1 Semillas.	- 8 -
1.4 Germinación	- 9 -
1.4.1 Germinación <i>in vitro</i>	- 10 -
1.4.2 Germinación Asimbiótica <i>in vitro</i>	- 11 -
1.5 Propagación por semillas.....	- 11 -
1.5.1. Por semilla Proveniente de Capsula Dehiscente	- 11 -
1.5.2. Por Semillas de Capsulas no Dehiscente (Capsula cerrada).....	- 12 -
1.6. Condiciones de cultivo	- 12 -
1.6.1. pH.....	- 12 -
1.6.2. Temperatura.....	- 13 -
1.7 Área de incubación.....	- 13 -

1.7.1. Esterilización	- 13 -
1.7.2. Calor seco	- 13 -
1.7.3. Vapor bajo presión (autoclave)	- 14 -
1.8 Medios de Cultivo	- 14 -
1.8.1. Macronutrientes	- 14 -
1.8.2. Micronutrientes	- 15 -
1.8.3. Vitaminas	- 16 -
1.8.4. Fuentes de carbono	- 17 -
1.8.5. Agente gelificante	- 17 -
1.8.6. Carbón activado	- 18 -
1.9 Sustancias orgánicas usadas en la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas	- 18 -
1.9.1. Nutrientes del plátano verde	- 19 -
1.9.2. Nutrientes de agua de coco	- 19 -
1.10. Aclimatación de orquídeas	- 19 -
1.10.1. Invernadero	- 20 -
1.10.2. Sustratos para Aclimatación de orquídeas	- 20 -
1.10.3. Musgo Blanco	- 20 -
1.10.4. Fibra de coco	- 21 -
1.10.5. Principales características de la fibra de coco	- 21 -
1.10.5.1. Cascarrilla de arroz.	- 21 -
1.10.5.2. Desinfección del Sustrato	- 21 -
1.11. Factores para el desarrollo de las orquídeas	- 21 -
1.11.1. Luz	- 21 -
1.11.2. Temperatura	- 22 -
1.11.3. Riego	- 22 -
1.11.4. Preparación del material a aclimatar	- 22 -

CAPITULO II

2.MATERIALES Y METODOLOGÍA	- 23 -
2.1 Lugar de procedencia de la muestra.....	- 23 -
2.1.2 Ubicación del Material de Colecta	- 23 -
2.2 Materiales	- 25 -
2.2.1 Biológico	- 25 -
2.2.2. De Campo	- 25 -
2.2.3. Equipos de Laboratorio	- 25 -

2.2.4. Material de vidrio	- 25 -
2.2.5. De acero quirúrgico	- 25 -
2.2.6. Medios de cultivo	- 26 -
2.2.7. Vitaminas	- 26 -
2.2.8. Suplementos Orgánicos	- 26 -
2.2.9. Materiales de Desinfección	- 26 -
2.2.10. Otros materiales	- 26 -
2.2.11. Materiales de Invernadero	- 26 -
2.2.12. Estructura de invernadero..	- 27 -
2.3 METODOLOGÍA	- 27 -
2.3.1. Colecta de la muestras	- 27 -
2.3.2 Preparación de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) stock para macronutrientes y micronutrientes.	- 27 -
2.4 Preparación de vitaminas	- 29 -
2.2.4.1 Protocolo de Desinfección de Cápsulas cerradas	- 31 -
2.5 Procedimiento de germinación in vitro	- 32 -
2.7Procedimiento de repique de plántulas	- 33 -
2.8 Procedimiento para el proceso de aclimatación	- 33 -
2.8.1 Preparación de las plántulas	- 33 -
2.8.2 Preparación del sustrato de aclimatar.....	- 33 -
2.8.2Aclimatación	- 34 -
2.9 Procesamiento de datos	- 34 -
2.9.1 Diseño Experimental.....	- 34 -
2.9.2 Análisis de Datos.....	- 34 -
2.9.3Variables Utilizadas.	- 34 -

CAPITULO III

Resultados y Discusiones	35
3.1 Efecto de los 2 formulaciones nutritivas en medios de Cultivo MS modificado.....	35
3.1.1 Germinación de <i>Prosthechea crassilabia</i> Poepp& Endl.....	35
3.1.2 Germinacion de <i>Sobralia setigera</i> Poepp&Endl.....	37
3.1.3. Germinación de <i>Epidendrum macrocarpum</i> Rich.	- 43 -
3.2 Crecimiento de <i>Prosthechea crassilabia</i> Poepp & Endl.....	- 47 -
3.2.1. Número de Hojas.....	- 47 -
3.2.2. Tamaño de hojas.	- 49 -
3.2.3. Número de raíces.....	- 51 -

3.2.3 Tamaño de raíz	- 53 -
3.3 Crecimiento de <i>Sobralia setigera</i> Poepp & Endl.	- 54 -
3.3.1. Número de Hojas.....	- 54 -
3.3.2. Tamaño de Hojas.....	- 56 -
3.3.3. Número de raíz.....	- 58 -
3.3.4. Tamaño de raíz.....	- 60 -
3.4 Crecimiento de <i>Epidendrum macrocarpum</i> Rich.	- 62 -
3.4.1. Número de Hojas.....	- 62 -
3.4.2. Tamaño de Hojas	64
3.4.3 Número de raíces.....	- 66 -
3.4.4. Tamaño de raíces	68
3.2 Porcentaje de supervivencia de plántulas.	- 69 -
Discusiones	- 73 -
Conclusiones	- 75 -
Recomendaciones.....	- 76 -
BIBLIOGRAFÍA	- 77 -
ANEXOS.....	- 81 -

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Macronutrientes	- 28 -
Tabla 2. Micronutrientes	- 28 -
Tabla 3 Vitaminas	- 29 -
Tabla 4. tratamientos usados	- 31 -
Tabla 5 Análisis de varianza para el número de hojas.....	- 47 -
Tabla 6 Prueba de Tukey al 95% para tratamiento	- 47 -
Tabla 7. Prueba Tukey al 95 % para Tiempo (días) y Tratamiento	- 48 -
Tabla 8 Análisis de varianza para tamaño de hojas	- 49 -
Tabla 9 Prueba de Tukey al 95% para tratamiento	- 49 -
Tabla 10 Prueba Tukey para Tiempo (días) y Tratamiento	- 50 -
Tabla 11 Análisis de varianza número de raíz.....	- 51 -
Tabla 12 Prueba de Tukey al 95% para tratamiento	- 51 -
Tabla 13 Prueba Tukey al 95 % para Tiempo (días) y Tratamiento	- 52 -
Tabla 14 Análisis de varianza tamaño de raíz	- 53 -
Tabla 15 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento	- 53 -
Tabla 16 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento	- 53 -
Tabla 17 Análisis de varianza número de hojas.....	- 55 -
Tabla 18. Prueba tukey al 95% para tratamiento	- 55 -
Tabla 19 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento.....	- 55 -
Tabla 20 Análisis de varianza tamaño de hojas	- 56 -
Tabla 21 Prueba tukey al 95% para tratamiento	- 57 -

Tabla 22 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento	- 57 -
Tabla 23 Análisis de varianza número de raíz	- 58 -
Tabla 24 Prueba tukey al 95% para tratamiento	- 59 -
Tabla 25 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento	- 59 -
Tabla 26 Análisis de varianza para tamaño de raíz	- 60 -
Tabla 27 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento	- 61 -
Tabla 28 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento	- 61 -
Tabla 29 Análisis de varianza número de Hojas	- 62 -
Tabla 30 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento	- 63 -
Tabla 31 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento	- 63 -
Tabla 32 Análisis de varianza tamaño de hojas	- 64 -
Tabla 33 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento	- 65 -
Tabla 34 Prueba Tukey para Tiempo (días) y Tratamiento	- 65 -
Tabla 35 Análisis de varianza número de raíz	- 66 -
Tabla 36 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento	- 66 -
Tabla 37 Prueba Tukey para Tiempo (días) y Tratamiento	- 67 -
Tabla 38 Análisis de varianza tamaño de raíz	- 68 -
Tabla 39 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento	- 68 -
Tabla 40 Prueba Tukey al 95 % para Tiempo (días) y Tratamiento	- 68 -
Tabla 41 Porcentajes de supervivencia de Prosthechea crassilabia	- 69 -
Tabla 42 Porcentajes de supervivencia de Sobralia setigera Poepp & Endl.	- 70 -
Tabla 43 Porcentajes de supervivencia de Epidendrum macrocarpum Rich.	- 71 -

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva de crecimiento de número de hojas según tiempo y tratamientos. ..	- 48 -
Gráfico 2 Curva de crecimiento tamaño de hojas según tiempo (días) y tratamientos. -	50
-	
Gráfico 3 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos en número de raíces.	- 52 -
Gráfico 4 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos	- 54 -
Gráfico 5 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos	- 56 -
Gráfico 6 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos	- 58 -
Gráfico 7 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos	- 60 -
Gráfico 8. Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos	- 62 -
Gráfico 9 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos	- 64 -
Gráfico 10. Curva de crecimiento tamaño de hojas según tratamientos.	- 65 -
Gráfico 11 Curva de crecimiento según tratamientos	- 67 -
Gráfico 12 Curva de crecimiento según tratamientos	- 69 -
Gráfico 13 Supervivencia de Prosthechea crassilabia	- 70 -
Gráfico 14 Supervivencia de Sobralia setigera	- 71 -
Gráfico 15 Supervivencia de Epidendrum macrocarpum	- 72 -

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Prosthechea crassilabia</i>	- 4 -
<i>Figura 2, Sobralia setigera</i>	- 6 -
<i>Figura 3. Epidendrum macrocarpum</i>	- 8 -
Figura 4. Fotomicrografía, partes de una semilla de Epistephium duckei	- 9 -
Figura 5.Desarrollo in vitro de Laelia sp.	10-
<i>Figura 6.Mapa Político de Marcapata</i>	-24-
<i>Figura 7. Etiqueta de colecta de muestras</i>	-27-
<i>Figura 8.Rotulado de macro y micro nutrientes</i>	-28-
<i>Figura 9. Rotulo para vitaminas</i>	-29-
<i>Figura 10.Flujograma de preparación de Ms modificados</i>	-30-
<i>Figura 11.Flujograma de desinfección de capsulas</i>	-31-
<i>Figura 12. Flujograma de germinación in vitro</i>	-32-
<i>Figura 13. Flujograma crecimiento de plántulas</i>	-32-
<i>Figura 14 .Flujograma de repique de plantas</i>	-33-
<i>Figura 15, fotomicrografía ,semilla</i>	-35-
<i>Figura 15; fotomicrografía rompimiento de testa</i>	-35-
<i>Figura 16 , fotomicrografía protocormo</i>	-36-
<i>Figura 17, fotomicrografía primordio foliar</i>	-36-
<i>Figura 18, fotomicrografía desarrollo de hojas</i>	-37-
<i>Figura 19, fotomicrografía desarrollo de raíz</i>	-37-
Figura 20, Germinación in vitro de Prosthechea crassilabia Poepp & Endl.	-38-
<i>Figura 21, fotomicrografía a) semilla</i>	-39-
<i>Figura 22,fotomicrografía rompimiento de testa</i>	-39-
<i>Figura 23, fotomicrografía protocormo</i>	-40-
<i>Figura 24, fotomicrografía primordio foliar</i>	-40 -
<i>Figura 25, fotomicrografía desarrollo de hojas</i>	-41-
<i>Figura 26, fotomicrografía desarrollo de raíz</i>	-41
Figura 27, desarrollo in vitro de Sobralia setigera Poepp & End.	-42
<i>Figura 28, fotomicrografía a) semilla</i>	-43
<i>Figura 29,fotomicrografía rompimiento de testa</i>	-43
<i>Figura 30, fotomicrografía protocormo</i>	-43
<i>Figura 31,fotomicrografía primordio foliar</i>	-44
<i>Figura 32, fotomicrografía desarrollo de hojas</i>	-45
<i>Figura 33,fotomicrografía desarrollo de raíces</i>	-45
Figura 34, desarrollo in vitro de Epidendrum macrocarpum Rich.	-46

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias –UNSAAC, a partir de noviembre del 2016 a marzo 2019 con la finalidad de comparar dos formulaciones nutritivas del medio de cultivo Murashige & Skoog, (1962) modificado, enriquecido con agua de coco (MS AC) y Murashige & Skoog, (1962) modificado, enriquecido con plátano verde (MS PL) y un testigo (MS) para la micropropagación de orquídeas de las especies de *Prosthechea crassilabia* Poepp & Endl, *Sobralia setigera* Poepp & Endl y *Epidendrum macrocarpum* Rich, a partir de semillas en condiciones de cultivo in vitro.

Se siguió la metodología propuesta por (Barba, Luna, & Arredondo, 2002) describiéndose 6 etapas en la germinación: Imbibición, rompimiento de la testa, protocormo inicial, primordio foliar, desarrollo de hojas y desarrollo de raíces. En el crecimiento de las plántulas se evaluaron número, tamaño de hojas y raíces, realizándose las mediciones con un vernier. Las plántulas se aclimataron en los invernaderos de la UNSAAC, evaluándose el porcentaje de supervivencia durante 60 días.

En el crecimiento de las 3 especies en estudio, *Epidendrum macrocarpum* es la que mayor rendimiento de hojas obtuvo con 4.25 con un tamaño de 1.17cm, en las raíces 2.48 y un tamaño de 1.01 cm en promedio/plántula en el tratamiento II (PL) a los 273 días. Seguidamente *Sobralia setigera* obtuvo 3.21 hojas con un tamaño de 0.68cm, con 0.59 raíces con un tamaño de 0.45cm promedio/plántula. Finalmente *Prosthechea crassilabia* el tratamiento I (AC) es el de mayor rendimiento con 2.81 hojas con un tamaño de 0.68cm, con 2.21 raíces y un tamaño de 0.47cm promedio/plántula a los 273 días.

La aclimatación se realizó en sustrato de musgo sphagnum con turba, cascara de arroz, con fibra de coco y carbón. Obteniéndose un 65% de supervivencia para *Prosthechea crassilabia*, para *Sobralia setigera* 64% de supervivencia, para *Epidendrum macrocarpum* 64% de supervivencia a los 60 días de iniciado el proceso.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó a partir de noviembre del 2016 a marzo 2019.

La familia Orchidaceae, es la más diversa del grupo de las plantas con flores. Las estimaciones varían entre 25,000 y 35,000 especies. Hay numerosas especies terrestres, la familia alcanza la cúspide con las epífitas y las litófitas, y los dos grupos comparten adaptaciones similares (Christenson, 2003). El Perú ha sido reconocido como uno de los diecisiete países llamados megadiversos, por ser poseedores de más del 70% de la diversidad del planeta (MINAM, 2014). Se encuentran 3,000 especies distribuidas en 750 géneros, pueden crecer en hábitat de 100 a 4,600m de altitud. De acuerdo a la lista de especies amenazadas de flora silvestre, Estado De Conservación (Decreto Supremo N° 043-2006-AG), (MINAGRI, 2006) 62 especies de orquídeas están en peligro crítico, 19 en peligro y 220 en estado vulnerable.

El cultivo de tejidos o cultivo *in vitro*, es una técnica de reproducción en condiciones de asepsia, donde se usa un pequeño segmento de tejido, el cual se regenera en poco tiempo produciendo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, por lo que es necesario crear protocolos de propagación *in vitro* con la expectativa de ser aplicados en programas de multiplicación masiva de especies en peligro de extinción, y contribuir sustancialmente también a proyectos de conservación y posteriormente a planes de reintroducción al medio natural (Rodríguez et al., 2005)

El cultivo *in vitro* es una técnica, donde se utiliza sales para simular un medio natural de la planta. Los micronutrientes, macronutrientes y vitaminas propuestos por Murashige & Skoog, (1962) modificado, son medios altamente nutritivos. La regeneración de orquídeas es un logro importante en la conservación de germoplasma, llámese semillas o material vegetativo (brotes y/o meristemas). Sin embargo, las plantas no pueden permanecer *in vitro* infinitamente, el paso a condiciones de ambiente, llamado aclimatación puede ser la parte crítica en la recuperación de plantas (Seaton & Ramsay, 2005). Por lo que en el presente trabajo se comparan 2 formulaciones nutritivas en 3 especies de orquídeas a partir de semillas. Estableciendo sus requerimientos nutricionales y utilizando sustitutos orgánicos específicos como plátano verde y agua de coco en la formación de protocormos y desarrollo de sus órganos vegetativos, para lograr su adaptación, micropropagación, conservación y aclimatación.

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

En la naturaleza las semillas de orquídeas presentan un proceso lento de germinación debido a que presentan necesidades complejas como la presencia de hongos micorrizicos, siendo además un proceso lento y con pocas probabilidades de germinación por no desarrollar el endospermo.

Actualmente en nuestro país la familia Orquidácea está considerado dentro de los apéndices I Y II de CITES (Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre), siendo *Phragmipedium* y *Masdevallia* orquídeas consideradas en peligro de extinción, por lo que fomentar la propagación in vitro es una alternativa de conservación.

Por otro lado en la Región Cusco no se cuenta con instituciones que realizan esta biotecnología, de propagación de orquídeas, además los insumos usados no son de fácil acceso por lo que en el presente trabajo; se propone la micropropagacion de orquídeas utilizando sustancias orgánicas no convencionales por lo que nos planteamos las siguientes preguntas:

¿Cuál será el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) modificado óptimo para la germinación y crecimiento de las plántulas de *Prostechea*, *Sobralia* y *Epidendrum*?

¿Se podrán aclimatar las especies en estudio con altos porcentajes de supervivencia?

JUSTIFICACIÓN

Las semillas de orquídeas presentan dificultad para germinar en forma natural. Se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar por lo que es indispensable investigar cuál es el medio de germinación idóneo para cada una de ellas. (Ruíz et al., 2008)

En este sentido el trabajo de investigación busca contribuir al conocimiento de técnicas de micropropagación de cultivo *in vitro* con el uso alternativo de suplementos orgánicos como plátano verde y agua de coco, que sustituye a los fitorreguladores optimizando la germinación y crecimiento de orquídeas.

Es necesario promover la conservación y el manejo de las poblaciones nativas de orquídeas de la región del Cusco a través de la implementación de protocolos propios para éstas, e implementar centros de propagación artificial (viveros y laboratorios de cultivo *in vitro* de orquídeas). Asimismo, preservar colecciones científicas de plantas vivas e incentivar la investigación, enseñanza, difusión y propagación, el cual servirá en el manejo sostenible de especies nativas que se encuentren en peligro de extinción.

Un laboratorio de Biotecnología debe contar con una cámara de flujo laminar, una autoclave, una destiladora de agua y medios de cultivo para la preparación del medio de cultivo y la cámara de cultivo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la micropropagación de las especies *Prostechea crassilabia*, *Sobralia setigera*, y *Epidendrum macrocarpum* a partir de semillas en condiciones de cultivo in vitro.

Objetivos específicos

1. Comparar el efecto de 2 formulaciones nutritivas en medio de cultivo MS modificado con plátano verde y agua de coco, en el proceso de germinación y crecimiento de las especies en estudio.
2. Evaluar el porcentaje de supervivencia de plántulas en el proceso de aclimatación de las especies en estudio.

HIPÓTESIS

El medio Murashige & Skoog enriquecido con sustancias orgánicas es eficiente para la micropropagación de las especies *Prostechea crassilabia* Poepp & Endl, *Sobralia setigera* Poepp & Endl y *Epidendrum macrocarpum* Rich, a partir de semillas.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. INTERNACIONALES

De la Cruz, (2006), observó el cambio de fase de rompimiento de testa a protocormo en *Prostechea vitellina* (Lindl.) W.E. Higgin que se dio a los 110 días, en medio nutritivo de MS y todo el proceso de formación de la plántula comprendió 260 días.

(Sardi & Guzmán, 2007), determinaron que la fase de protocormo de *Epidendrum secundum* y *Oncidium excavatum* se dio a los 60 días en medio MS enriquecido con Agua de coco 30ml/L y plátano verde 150gr/L. *Epidendrum secundum* con 4 hojas con un tamaño 1.14cm, con 1 raíz promedio/plántula a los 240 días, en medio MS agua de coco y plátano verde. *Oncidium excavatum* fue en el testigo MS que tuvo mejor rendimiento con 3 hojas; con un tamaño de 2.08cm; con 1 raíz a los 160 días.

(Muñoz, 2011), determinó la germinación de *Epidendrum jameisonic* utilizando semillas de cápsulas maduras en el medio de cultivo MS enriquecido con 150gr/L de plátano con 2gr/L de carbón activado, se dio a los 90 días, y el tamaño de hojas alcanzo 2,72cm a los 150 días, y en *Cyrtochilum macronthum* germino a los 90 días, con un tamaño de hojas 1.17cm a los 120 días.

(Paredes, 2012), determinó el tiempo de adaptación para la aclimatación de *Epidendrum schistochilum* Schltr se dio a los 45 días, con un 93 % de supervivencia (41 plántulas) y en *Oncidium cultratum* Lindl. Se dio a los 30 días, con un 91 % de supervivencia (10 plántulas), en sustrato de musgo de Sphagnum más corteza de pino fina y Sphagnum con fibra de coco y piedra volcánica.

1.1.1 NACIONALES

(Gálvez, 2005), determinó para *Phragmipedium kovachii* el desarrollo de propagación in vitro duro 160 días, y el crecimiento de hojas en promedio fue de 3.27, con un tamaño de 5.24mm, y raíces de 0,8 y un tamaño de 0.53cm promedio/plántula en medio de MS enriquecido con agua de coco 200ml/l.

(Padilla, 2008), determinó la micropropagación en *Cattleya spp.* y *Oncidium lancerarum*, obteniendo el número de hojas en promedio es 4 para *Cattleya spp.*, con 2.58 raíces en promedio, para *Oncidium lancerarum*, un número de hojas 4 en promedio, con 2.95 raíces en promedio en MS enriquecido con 40 gr/L de plátano y 100ml de agua de coco.

1.1.2 LOCALES

(Ochoa, 1998), determino que el medio Kudson C modificado, en presencia o no de carbón activado, es el medio más adecuado para la germinación con 5,59 % y el medio de Murashige & Skoog con 4,098 % de germinación en el género *Masdevallia*.

Acurio, (1996), determinó en el género *Epidendrum* un 80% de viabilidad de semillas y el tiempo de germinación en *Epidendrum dichotomun* 45 días, en medio de cultivo knudson C.

(ACURIO et al., 2006), determinaron en *Bletia Catenulata* Ruiz & Pavon y, la aclimatación del 61.3% de esta especie en una mezcla de sustrato de 1;1;1 (arena, musgo y suelo agrícola) y para *Epidendrum secundum* Jacquin, la aclimatación en una mezcla de sustrato de 2;1;1 (musgo,suelo y arena).

1.2 Marco conceptual

1.2.1 Familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae es una de las más diversas dentro de las plantas vasculares, con alrededor de 30,000 especies que se distribuyen en todos los continentes, excepto en la Antártida, y los desiertos más secos de la tierra. La mayor riqueza se halla en el trópico, sobre todo en Centro y Sudamérica donde según catálogos florísticos y cálculos aproximados, países como Colombia, Ecuador, y Perú, superan ampliamente las 3,000 especies (Dressler, 1981).

El hábitat de las orquídeas son terrestres y epífitas, sus flores tienen formas color, tamaño y olor diversos, los que les atrae a sus polinizadores. Las flores presentan 3 sépalos y 3 pétalos del cual uno está diferenciado y se llama labelo; el ovario es ínfero puede ser unilocular y trilocular, el gineceo y androceo está fusionado mediante la columna, en la antera se originan los polinios. (Cavero et al., 1991)

Las semillas son muy pequeñas, se reproducen por miles y millones por cada fruto, las raíces son fasciculadas. La gran mayoría de especies tropicales poseen tejido esponjoso blanco cremoso, de nombre velamen que es una capa pluriestratificada, permitiéndole alta captación y retención de agua. Los tallos son simples y/o modificados en rizomas, tubérculos y pseudobulbos (estos 2 últimos para almacenar agua). Las hojas son alternas, envainadoras y principalmente paralelinervadas. La inflorescencia es en racimo, panícula o pueden presentar flores solitarias. (Cavero et al., 1991)

1.2.1.1 Genero *Prosthechea*

Su nombre deriva del griego Prostheke que significa protuberancia, el género cuenta con 120 especies de hábitat terrestre a litofitas, de tamaño pequeñas a medianas. De raíces gruesas con aspecto de esponja, los tallos erguidos, aplanados de hojas sésiles y terminales con inflorescencia apical paniculada en racimo con una espata en la base. Con sépalos casi iguales en longitud, con pétalos delgados. Distribuidos en América tropical. (Cavero et al., 1991).

1.2.1.2 *Prosthechea crassilabia* (Poepp. & Endl). Carnevali & I.Ramirez (2003).

Especie de hábito epífito, terrestre y/o semiterrestre, tamaño mediano, puede medir hasta 39cm, con aspecto robusto. Tiene de 1 a 4 pseudobulbos cilíndrico-elíptico, alargados, que lleva de 2 a 4 hojas erguidas, elíptico- lanceoladas a oblongo-lanceoladas; la inflorescencia racemosa

surge del ápice del pseudobulbo, la flor mide 2cm, tiene sépalos y pétalos de color verdes pálido con motas rojas a oscuras. Florece de febrero a mayo. Se distribuye en Centroamérica, Caribe, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. Se encuentra dentro de las especies CITES II.(Blas, 2015).

Clasificación taxonómica según: APG IV (2016)

Reino: Vegetal

Division: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Lilianae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Género: *Prosthechea*

Especie: *P. crassilabia*



Figura 1. Prosthechea crassilab

1.1.3 Género *Sobralia*

Este género fue dedicado al botánico español Sobral, cuenta con 35 especies, con flores muy hermosas, son conocidas como flor de un día. La mayoría proveniente de América tropical. De hábitats terrestres con tallos largos, delgados como cañas, de hasta 5.50m de altura, sin embargo, éstos son mucho más cortos en cultivo. Con hojas alternas, fuertemente nervadas, distribuidas a lo largo del tallo. Las flores son producidas en el ápice de los tallos y solamente duran de 2 a 3 días, pero para compensar esto, se da una rápida sucesión de flores desde cada tallo, pudiendo estar en floración por muchas semanas. Son muy similares en aspecto y forma general a las flores de las *Cattleyas*. En el Perú se reportan 14 especies, están distribuidas en Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Puno y San Martín. (Cavero et al., 1991).

1.1.3.1 *Sobralia setigera* Poepp. & Endl.(1836)

Es una especie nativa del Perú, se encuentra entre los 750 a 2600 m de altitud, epífita de crecimiento medio a grande, de cálido a frío, con bastones erectos, caespitosos envueltos completamente por vainas de hojas estriadas, bastante coriáceas, sus hojas pueden ser ovaladas, lanceoladas a elípticas, tiene una inflorescencia terminal, sus flores son blancas mide aproximadamente 5cm. Se encuentra dentro de las especies CITES II. (Blas, J. 2015).

❖ Clasificación taxonómica según: APG IV (2016)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Lillanae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Género: *Sobralia*

Especie: *S. setigera*

Nombre común: Flor de un
día, Buque de novia



Figura 2, *Sobralia setigera*

1.1.4 Género *Epidendrum*

Su nombre proviene del griego epi, que significa sobre y dendrom, árbol, por su hábito de la mayoría de las especies que viven sobre árboles. Es uno de los géneros más amplios de la familia, sobrepasando las 1000 especies. Distribuidos en centro y Sur América. Aunque la mayoría son epifitas, algunas son litofitas o terrestres. Generalmente presentan un tallo en forma de caña que puede llegar a medir hasta 2 metros de longitud. La inflorescencia es en racimo terminal, con un número variable de flores según la especie. Muy escasos individuos generan su inflorescencia lateralmente. Las flores son de color, tamaño y aroma muy variados. En el Perú se reporta aproximadamente 263 especies que se encuentran distribuidas en Amazonas, Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, La Libertad, Loreto, Madre de Dios, San Martín, Pasco, Piura, Puno, Ucayali. (Cavero et al., 1991).

1.1.4.1 *Epidendrum macrocarpum* Rich (1792)

Son terrestres epifitas, de hasta 80cm de largo erguida con tallo tipo caña. Las hojas son elípticas. La inflorescencia es tipo racimo terminal. Cada flor mide de 5 a 8 cm de largo, de color anaranjado intenso con la columna amarillo claro. Hábitat selva baja. Crece en lugares abiertos con abundante luz directa; en suelos secos con abundante vegetación circundante. Se distribuye de 600 a 650 m de altitud. Florece de julio a setiembre. Se encuentra dentro de las especies CITES II.

Clasificación Taxonómica según: APG IV (Vasquez & Rojas, 2016)

Reino: Plantae

Division: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Lilianae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Género: *Epidendrum*

Especie: *E. macrocarpum*.

Nombre común:
orquídea estrella



Figura 3. *Epidendrum macrocarpum*

1.3 Cultivo *in vitro*

Significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido, es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre; esto se puede lograr, mediante la aplicación de estímulos físicos y químicos controlados en un medio de cultivo a un tejido vegetal (Roca & Mroginski, 1993).

El cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico (temperatura, luz y humedad) como químico (composición del medio de cultivo, pH) en el que se sitúa el explante. Conviene, por tanto, conocer cuáles son los principales factores que conforman dicho entorno y que deberán ser controlados (Castillo, 2007).

1.3.1 Semillas.

Las semillas de orquídeas son únicas; en varios aspectos son extremadamente pequeñas, la mayoría de ellas tienen de 0.25- 1.2mm de largo y 0.09- 0.75mm de ancho, su peso es de 0.3- 14ug. En el interior de los frutos se encuentran miles de semillas. Son de diferentes formas

(filiforme) (fusiforme) (ovoide) en ocasiones presentan protuberancias. Consta de una cubierta y un embrión, no presentan endospermo. (Arditti, 1978).

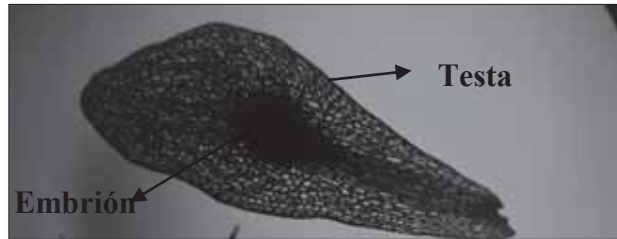


Figura 4. Fotomicrografía, partes de una semilla de Epistephium duckei

Fuente: propia, aumento de 10 X

1.4 Germinación

Se define como los estadios secuenciales del proceso de desarrollo del protocormo, termina cuando forman las hojas y raíces. Para que ocurra la germinación, las semillas deben absorber agua (imbibición) a través de la testa, esto hace que aumente de volumen el embrión, seguido por la división celular en la región anterior, provocando la ruptura de la testa, originando estructuras cónicas o esféricas llamadas protocormos, este se encuentra en la región apical donde formará una protuberancia llamada primordio foliar. En la parte inferior se encuentran los rizoides, que luego forman las raíces. A partir de los primordios foliares se desarrolla las hojas, formando así una planta completa. (Barba et al., 2002).

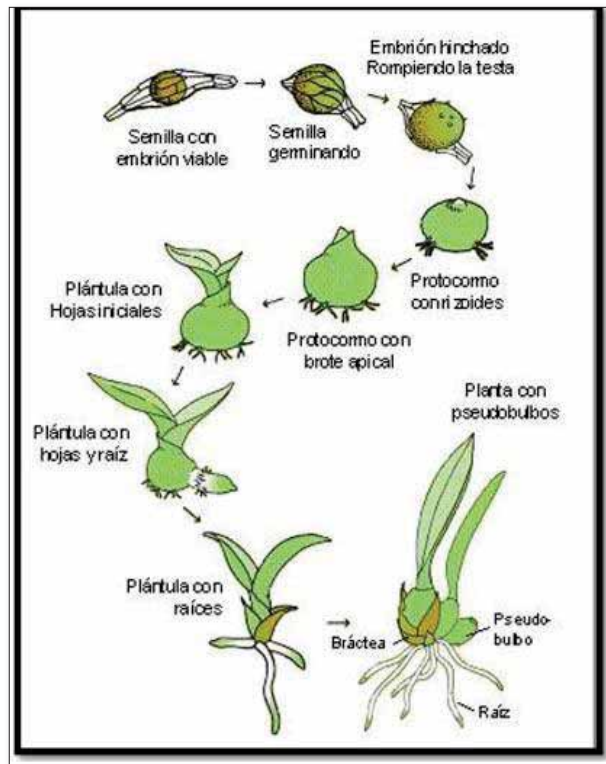


Figura 5. Desarrollo *in vitro* de *Laelia sp*

Fuente: Steaton & Ramsay, 2005

Manteniendo las condiciones adecuadas, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses e incluso años dependiendo de la especie, hasta que alcance la edad apropiada para producir una planta completa. En el caso de orquídeas terrestres es de vital importancia que la relación orquídea-hongo se conserve durante los estadios tempranos del ciclo de vida de la planta, los protocormos de orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento (McKendrick, 2000).

1.4.1 Germinación *in vitro*

En la germinación *in vitro* las semillas se colocan en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de cultivo nutritivo que contiene azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y desarrolle la planta (McKendrick, 2000).

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

Se ha encontrado que el rango de germinación *in vitro* de las orquídeas está entre 7 y 235 días después de haberlas colocado en un medio de cultivo y la obtención de plántulas tarda entre 50 y 724 días (Arditti, 1992).

Es importante tomar en cuenta que las especies silvestres de orquídeas, presentan lento crecimiento y en algunas ocasiones, necesitan más de 1 año en condiciones *in vitro* para alcanzar entre 3-5 cm de altura (Rodríguez et al 2010).

1.4.2 Germinación Asimbiótica *in vitro*

Knudson (1922) estableció un método, completamente controlado, estandarizado y simple, para la germinación de semillas de orquídeas; el cultivo asimbiótico. Demostró que para las orquídeas de los géneros *Cattleya*, *Laelia* y *Epidendrum*, germinaban fácilmente en ausencia del hongo al ser cultivadas sobre el medio de cultivo Pfeffer modificado (solución B) que después se le conocería con el nombre de Knudson B. Posteriormente realizó modificaciones al medio Knudson B, adicionando nuevos componentes y manteniendo la sacarosa como carbohidrato. A este medio de cultivo modificado le llamo Knudson C y en la actualidad es ampliamente utilizado de forma generalizada para la germinación asimbiótica de semilla de orquídeas *in vitro* (Arditti, 1978).

(Knudson, 1922) indica que las semillas de algunos géneros de orquídeas son capaces de germinar *in vitro*; sin embargo, cada especie de orquídeas tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar.

Existen varios factores complejos que influyen en la germinación y el crecimiento de las orquídeas como: temperatura, fotoperiodo y humedad. La composición del medio de cultivo también es un factor fundamental para el proceso de germinación como hormonas, agua, minerales, carbono y vitaminas que son componentes indispensables en los medios de germinación (Pierick, 1990).

1.5 Propagación por semillas

1.5.1. Por semilla Proveniente de Capsula Dehiscente

Las semillas son esterilizadas con una solución de Hipoclorito de sodio (lejía comercial) en concentración de 5% por 20 minutos. El tiempo depende del tipo de semillas que se esté

usando. La solución de hipoclorito de sodio es uno de los esterilizantes más usados, aunque puede emplearse también peróxido de hidrogeno al 3% por 30 minutos (Snow, 1986).

Luego de la esterilización las semillas son enjuagadas tres veces en agua destilada estéril, para posteriormente ser sembradas en los medios de cultivo.

1.5.2. Por Semillas de Capsulas no Dehiscente (Capsula cerrada)

La capsula es separada de la planta madre, eliminamos las partes que no se usaran o que pueden ser una fuente de contaminación (restos de pétalos), se enjuaga con agua y detergente y se sumerge por unos segundos en alcohol etílico al 75%. Luego se esteriliza sumergiéndola en una solución de Hipoclorito de sodio al 5% por 20 minutos.

La siembra se realiza directamente sin necesidad de enjuague. Para abrir la capsula se hacen dos cortes longitudinales a lo largo de la sutura de la dehiscencia, se retira el pedazo de capsula seccionado y se procede a la siembra.

1.6. Condiciones de cultivo

El estado del medio de cultivo (líquido o sólido) depende de la especie con la que se esté trabajando y debe ser determinado empíricamente. Generalmente la proliferación es mayor y más rápida en medio líquido y la diferenciación se ve favorecida en sustratos o soportes sólidos. Aun cuando es recomendable la agitación del medio líquido, se han obtenido éxitos con cultivos estacionarios (Arditti, 1993) y con medios líquidos agitados solo ocasionalmente (Arditti, 1993).

La intensidad de luz usada tanto para cultivo de semillas como para cultivo de meristemas o yemas van desde la oscuridad hasta los 3000 lux, generalmente obtenidos con fluorescentes y algunas veces complementados con lámparas incandescentes. Los fotoperiodos más adecuados para la mayoría de especies tropicales son aquellos de 12-18 horas luz. En general los fotoperiodos adecuados para germinación de semillas y cultivo de plántulas son también adecuados para el cultivo de meristemas (Arditti, 1993).

1.6.1. pH

Tanto para el cultivo de meristemas como para el cultivo de semillas el rango del pH más adecuado para el cultivo in vitro de orquídeas es de 4.8 a 5.5.

Cuando el pH del medio de cultivo es muy ácido antes del autoclavado, puede ocurrir la hidrólisis de algunos componentes del medio, lo que puede resultar en la formación de soluciones semisólidas y la producción de algunos compuestos tóxicos para el explante (Arditti, 1993).

1.6.2. Temperatura

Las temperaturas apropiadas para el cultivo in vitro van desde 24 a 26°C. Aunque temperaturas superiores también pueden ser toleradas por los cultivos; algunas especies pueden tener una menor tolerancia o requerimientos específicos.(Roca & Mroginski, 1993)

1.7 Área de incubación

Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado o en gabinetes o cámaras de crecimiento; éstas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental, pero son más costosas. El área de incubación o crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la temperatura (20-28 °C), de la iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa (<70%-80%). En el cuarto de incubación se instalan estanterías metálicas para colocar los cultivos.(Roca & Mroginski, 1993)

1.7.1. Esterilización

El calor es uno de los agentes que se utiliza con más frecuencia en la esterilización. Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor) o de calor seco (aire caliente); cuando se utiliza el calor húmedo, puede ser en forma de vapor abierto o de vapor bajo presión. Ocasionalmente se puede usar agua caliente pero no hirviendo Como es bien conocido, el éxito en el logro de esterilidad en cualquier preparación depende de muchos factores, como son la naturaleza de la sustancia que se esteriliza, el volumen contenido en cada unidad, el tamaño del recipiente y el número de unidades que se pueden manejar en una sola operación. Por consiguiente, no se pueden dar instrucciones específicas relacionadas con el método de esterilización que se utiliza para una preparación individual; en contraposición, se presentan sugerencias generales relacionadas con los procedimientos de esterilización.(Roca & Mroginski, 1993)

1.7.2. Calor seco

Los recipientes de vidrio se utilizan para operaciones estériles, éstos pueden esterilizarse por medio de aire caliente. Para el efecto se colocan en una estufa de aire caliente a una temperatura mínima de 170 °C, preferiblemente durante dos horas, pero nunca menos de una hora. El algodón (debidamente envasado) a menudo se esteriliza por intervalos más largos, ya que tiende a contener esporas altamente resistentes; puesto que tanto el algodón como el papel toman un color marrón a temperaturas de 190 °C o superiores, para estos materiales se debe usar una temperatura menor de 170 °C, manteniéndolos bajo ella por lo menos durante una hora. (Roca & Mroginski, 1993)

1.7.3. Vapor bajo presión (autoclave)

El vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias y hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo (siempre y cuando no contengan componentes termo- lábiles).

La autoclave más utilizada actualmente en el laboratorio es la contraparte de mayor tamaño de la olla de presión común. Al utilizarlo, es necesario extraer todo el aire antes de empezar el proceso de esterilización ya que, a presiones iguales, la temperatura de una mezcla de aire y vapor no es tan alta como la del vapor puro; la extracción del aire se logra automáticamente al permitir que el vapor expulse el aire del aparato, antes de cerrar la válvula correspondiente. (Roca & Mroginski, 1993)

1.8 Medios de Cultivo

Es muy fundamental para el cultivo in vitro, consiste en una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición de los cultivos.

1.8.1. Macronutrientes

Según (Mejia, 1994) los nutrientes que la planta requieren en mayor cantidad son principalmente: N, P, K, CA, Mg, S, Fe y Mn.

➤ El nitrógeno:

Influye en la tasa de crecimiento de la planta. Es el elemento esencial, componente de la clorofila, alcaloides y ácidos nucleicos. La escasez de nitrógeno está caracterizado por el amarillento de las hojas y el enanismo o achaparramiento de la planta. El exceso de nitrógeno, promueve el crecimiento vigoroso pero suprime el desarrollo del fruto.

Las fuentes de nitrógeno para los medios de cultivo son el amonio (NH_4) y el nitrato (NO_3) o en combinación de ambos iones.

➤ **El Fósforo:**

Está presente en los tejidos meristemáticos y en otros tejidos de rápido crecimiento, pero su rol exacto no es conocido. Su principal función parece ser de activador enzimático; cantidades pequeñas de fósforo, genera plantas anormales y enfermizas.

➤ **El Potasio:**

Es necesario para la normal división celular, para la síntesis de carbohidratos, proteínas y de la clorofila así como para el proceso de nitrógeno. La insuficiente cantidad de potasio ocasiona plantas débiles y anormales.

➤ **El Azufre:**

Está presente en algunas moléculas de proteínas. Impulsa el desarrollo radicular y el pigmento verde profundo de follaje que es suministrado en forma de sulfatos.

➤ **El Calcio:**

Se encuentra como pectato de calcio, que es una parte integrante de la pared celular de la planta y cumple el rol en la permeabilidad, esto facilita el movimiento de carbohidratos y de aminoácidos en toda la planta y promueve el desarrollo de la raíz.

➤ **Magnesio.**

Es el elemento central en la molécula de la clorofila, es importante también como activador enzimático. La deficiencia de magnesio causa follaje pálido y enfermizo y se adiciona al medio de cultivo como sulfato de magnesio.

➤ **Cloro:** Es esencial para estimular la fotosíntesis, aun su función en la planta no es conocida, la deficiencia de cloro en la planta se manifiesta con marchitez, amarillamiento y bronceado de las hojas y muerte. Es incluida en los medios de cultivo en pequeñas cantidades como cloruro de calcio.

1.8.2. Micronutrientes

Según (Mejia, 1994) los principales elementos requeridos por las plantas, hay otros elementos esenciales para un buen crecimiento, pero que se necesitan en cantidades extremadamente pequeñas, a los que se denominan como elementos traza, su función en la fisiología de las plantas aún no está bien comprendida, pero han sido reconocidos algunos síntomas con su deficiencia.

➤ **Hierro:**

Está involucrado en la síntesis de clorofila; también participa en la conversión de energía en la fotosíntesis y la respiración a medida que esto es reducido de estado férrico a ferroso. Las plantas deficientes en hierro son cloróticas, se agrega al medio como sulfato ferroso.

➤ **Boro.**

Es un elemento traza importante, se presume que tiene un importante rol en el movimiento del azúcar, la escasez de boro produce generalmente el deterioro de tejidos internos, el boro se incorpora al medio en pequeñas cantidades como ácido bórico.

➤ **Molibdeno:**

Se cree que participa en la conversión del nitrógeno a amonio, se requiere para el normal crecimiento de la planta y se le añade a los medios de cultivo como molibdeno de sodio.

➤ **Manganeso:**

Es uno de los micros elementos más importante en el medio de cultivo, este es el elemento esencial en las membranas de los cloroplastos, que se añade al medio de cultivo como sulfato de manganeso.

➤ **Cobalto.**

Es un elemento del complejo vitamínico B12 molecular, el cual es esencial para la fijación del nitrógeno, al medio de cultivo se le adiciona cloruro de cobalto.

➤ **Zinc:**

Es un elemento vital de varias enzimas involucradas en la formación de la clorofila, así como en la producción de auxinas como el ácido indol acético (AIA) en cultivo de tejidos se emplea el sulfato de zinc. Cantidades grandes son tóxicas para la planta.

➤ **Cobre:**

La deficiencia causa el achaparramiento de la planta, malformación manchas o pustulas.

➤ **Iodo:**

Se le adiciona al medio como yoduro de potasio (KI). No es comúnmente considerado como un elemento esencial, aun cuando se cree que es componente de algún amino ácido.

1.8.3. Vitaminas.

Las vitaminas que favorecen el desarrollo de cultivos in vitro, son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plántulas ellos son: tiamina (B1), piridoxina (B6), ácido

nicotínico (B3). (Bidwell, 2010) mencionan que la tiamina (B1), es un componente esencial en la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Sin esta vitamina las células vivas no pueden realizar sus funciones vitales. En las plantas las hojas son las responsables de producir tiamina. La vitamina B6 conocida como piridoxina, es importante para el metabolismo de los aminoácidos, su función es antioxidante.

La niacina o ácido nicotínico (B3) actúa directamente en la fisiología de los tallos, por ser componente de las coenzimas NAD y NADP (portadoras de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación) donde aparece como niacinamida. Durante la germinación de embriones de orquídeas y el desarrollo de plántulas jóvenes se obtienen respuestas favorables con el suministro exógeno de la niacina. En los medios de cultivo se han incluido varias vitaminas aunque generalmente se acepta que la tiamina (B1) es esencial para el crecimiento continuo (Murashige 1962). El mioinositol puede ser un componente esencial para el crecimiento y la diferenciación de callos.

1.8.4. Fuentes de carbono.

Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. El azúcar es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo y es esencial para el crecimiento y desarrollo in vitro, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en la oscuridad. Los tejidos verdes no son lo suficientemente autótrofos in-vitro. También la concentración de CO₂ en el frasco puede ser una limitante para la fotosíntesis (Gibson 1967), citado en (Pierick, 1990)).

Los azúcares son de extrema importancia como fuente de energía y como regulador osmótico. La sacarosa, llamada también sucrosa (C₁₂ H₂₂ O₁₁), es el azúcar empleado universalmente. El aporte de glúcidos tiene por objeto optimizar el crecimiento de los tejidos igualmente, puede orientar la organogénesis ya que la falta de azúcares, con frecuencia es un factor limitante.

1.8.5. Agente gelificante.

El agar es un derivado de algas Rhodophytas de las especies de *Gelidium* en menor escala de *Gracilaria* e *Hypnea*. Se extrae de las paredes de la célula y de los espacios intercelulares de estas algas. El agar es insoluble en agua fría, pero si en agua caliente disuelta, solidifica a 30°-

50 °C. El agar bacteriológico es el de mejor calidad por su bajo contenido de sulfato y la alta dureza del gel.(Acleto, 1986).

1.8.6. Carbón activado

El carbón activado utilizado en cultivos de tejidos es el carbón resultante de la combustión de tejidos vegetales (madera, residuos de madera, papel, lignina, etc). Actualmente es incluido con frecuencia en la formulación de medios de cultivo in vitro de orquídeas, tanto para la siembra de plántulas como de protocormos obtenidos a partir de semillas o de meristemas (Yam, Van Staden, Thompson, & Edwards, 1990).

Algunos solutos de una solución son adsorbidos por el carbón activado cuando entran en contacto con este. El grado de adsorción depende de la temperatura, del pH, y la composición química de la sustancia adsorbida, siendo mayormente adsorbidos los compuestos moderadamente polares y poco solubles, como fenoles, fitohormonas y vitaminas, en comparación con los muy polares o los apolares: azúcares, sorbitol, manitol, inositol, etc que no son adsorbidos (Weatherhead, Burdon, & Henshaw, 1978).

Varios mecanismos se han propuestos para explicar el efecto beneficio del carbón activado en el cultivo de orquídeas en primer lugar la contribución de minerales en forma de impurezas estaría enriqueciendo el medio de cultivo. Segundo la capacidad para absorber metabolitos fitotóxicos que estarían siendo liberados al medio de cultivo por los tejidos (fenoles y sus oxidados, hidroquinonas, ácido para-hidrobenczoico). Tercero la adsorción de sustancias producidas durante la esterilización en el medio de cultivo, como en el hidroximetil-furfural, resultado de la deshidratación de las hexosas que afectan el crecimiento y desarrollo de las plántulas. Cuarto, La adsorción de etileno que inhibe el crecimiento y la diferenciación de las plántulas y protocormos.(Ernst, 1976).

Para el cultivo de orquídeas se utiliza carbón activado en medios de germinación de semillas y en medios de desarrollo como para etapas posteriores (replante) a una concentración de 2g/l. Por su capacidad para adsorber hormonas vitaminas y nutrientes poco solubles no debe ser usado en los medios de cultivo a excesivas concentraciones (Yam et al., 1990). Puesto que el carbón activado se asienta debe ser agitado antes que el medio se solidifique.

1.9 Sustancias orgánicas usadas en la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas.

Un gran número de aditivos se usan para favorecer la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas y el subsecuente desarrollo y diferenciación de los protocormos (Arditti, 1967) y (Staden & Stewart, 1975). Los de uso frecuente son endospermo líquido de coco y fruto de plátano.

1.9.1. Nutrientes del plátano verde

(Staden & Stewart, 1975) encontraron que el fruto de plátano contiene pequeñas cantidades de compuestos inductores de la división celular (zeatin-ribosido y 6-(isopentilamino) purina). Sin embargo, existen evidencias del efecto del plátano sobre el desarrollo de orquídeas puede deberse a la presencia de otros compuestos distintos a las citoquinas, pues se ha reportado la presencia de compuestos afines a la giberelinas y auxinas en el mismo. (Khalifah, 1966) y (Roca & Mroginski, 1993).

1.9.2. Nutrientes de agua de coco

En 1942, se inició el cultivo *in vitro* utilizando endospermo líquido de coco (*Cocos nucifera*) como suplemento de medio de cultivo estándar, posteriormente aparecieron otros usos. El agua de coco muy raras veces resulta tóxica o deficiente a causa de los microelementos; es un medio complejo, tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) no es raro encontrar sales minerales en ella. El agua de coco es muy rica en Magnesio y Fósforo, contiene alrededor de 2,5% de azúcar. Las hormonas vegetales que posee el agua de coco son auxinas, giberelinas, 1,3-Difenilurea, Zeatina, Ribosido de Zeatina (Roca & Mroginski, 1993). Mientras que su combinación con extractos de plátano resulta en un buen desarrollo de raíces y tallos.

1.10. Aclimatación de orquídeas

Finalizado el proceso de multiplicación y crecimiento de las plántulas, se procede a la aclimatación proceso que consiste en la adaptación de las plántulas a condiciones óptimas, es decir similares a las del cultivo *in vitro* y poco a poco a las condiciones naturales del medio ambiente (Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini, 2007).

En los frascos las plántulas se han desarrollado en un ambiente cerrado y aséptico, por lo que, deben acostumbrarse de una manera gradual y progresivo al medio externo antes de ser trasplantadas a las macetas. La humedad en los frascos es alta y las plantas están protegidas de ataques de hongos y bacterias. En el medio natural la temperatura y la luz varían constantemente. Las nuevas plantas deben estar protegidas de manera especial de la fuerte luz

solar, ya que una pequeña cantidad de ésta podría quemar las hojas de orquídeas que usualmente crecen en la sombra. Además las plántulas que han crecido en condiciones de alta humedad, tendrán cutículas débiles, por esta razón, necesitan acostumbrarse gradualmente a medios más secos antes de ser trasplantadas. Finalmente tanto en la fase de aclimatación como en la de trasplante, las plántulas deben ser cuidadas diariamente para evitar inconvenientes (McKendrick, 2000).

(Hágsater et al., 2005) menciona que las hojas en las orquídeas tienen la función principal de realizar la fotosíntesis y por tanto, el contar con una gran superficie foliar expuesta a la luz, sobre todo en lugares sombreados y en situaciones bastante húmedas, es de importancia para el buen desarrollo de la planta en condiciones de aclimatación.

1.10.1. Invernadero

Se define como una construcción especial donde la cubierta y las paredes son transparentes y dejan pasar la luz; se emplean para cultivar plantas mediante el control del clima en el que se desarrollan. Presenta como ventajas: el aumento de rendimientos, productos sanos, limpios, homogéneos, control del medio ambiente (temperatura, humedad relativa y ventilación), y la menor incidencia de plagas y enfermedades (Tapia, 2009).

1.10.2. Sustratos para Aclimatación de orquídeas

El sustrato es el material sobre el cual la planta desarrollará sus raíces y eventualmente crecerá y florecerá. Un buen sustrato debe ser muy poroso a la vez retentivo de humedad, proveer de buena ventilación a las raíces y ser inerte (tener poca o ninguna capacidad de liberar nutrientes en el medio). Se puede usar corteza de pino, musgo (*Sphagnum*) mezclados con trozos de carbón. En consecuencia el material no es muy importante pero si lo es el tamaño de los trozos del material (Portilla, 2007).

1.10.3. Musgo Blanco

Sphagnum sp tiene gran capacidad de retención de agua, debido a la presencia de poros en las células hialinas ubicadas en los caulidios y filidios, que pueden absorber rápidamente el agua a través de sus poros (de diámetros de 5-20 m). Estas células pueden contener mucha agua y abarcar alrededor del 80% del volumen del musgo.

1.10.4. Fibra de coco

Actúa como base perfecta para el desarrollo de la planta, que permite un crecimiento perfecto de las raíces y su desarrollo, una humedad controlada y un pH estable que asegura la permanente salud del cultivo.

1.10.5. Principales características de la fibra de coco

- ✓ Material Orgánico 100%. La fibra de coco está compuesta principalmente por lignina en un 45% demás es muy estable que proporciona buenas características físicas durante un largo periodo.
- ✓ Alta Porosidad: Hasta el 95% que le confiere una excelente distribución del aire y agua. El paso del aire sigue siendo superior al 20% aun saturado de agua favoreciendo la salud de las raíces.
- ✓ Alta capacidad de almacenar agua y nutrientes. La fibra de coco puede retener 8 o 9 veces su peso en agua.

1.10.5.1. Cascarrilla de arroz. Le confiere alta porosidad, ayuda a que no se compacte el sustrato.

1.10.5.2. Desinfección del Sustrato

Antes de realizar el trasplante es recomendable esterilizar el sustrato en autoclave a una temperatura de 120°C por 15min-20min (dependerá mucho a la cantidad de sustrato). Esto reducirá la incidencia de patógenos. (Hurtado & Manzanares, 1987).

1.11. Factores para el desarrollo de las orquídeas.

Existen 5 factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las orquídeas: agua, luz (artificial o natural), temperatura, ventilación y fertilización.

1.11.1. Luz

Es uno de los requerimientos fundamentales de las orquídeas, estas varían en función de las especies. Especies del género *Cattleya* y *Epidendrum*, requieren una cantidad de luz 70 – 80% y en algunos casos luz directa. Mientras que otras especies de orquídeas requieren menos intensidad tal es el caso de *Phalaenopsis*, *Gongora*, etc. Las quemaduras por exceso de luz causan daños irreversibles en la hoja y esta puede llegar a secarse.

1.11.2. Temperatura

Las orquídeas de clima frío toleran 18°C- 29°C.

Las orquídeas de clima cálido toleran más de 21°C.

Las orquídeas de clima intermedios toleran temperaturas altas y bajas.

1.11.3. Riego

Las orquídeas prefieren abundante agua pero no crecen bien en sustratos permanentes

húmedos o saturados. Es recomendable realizarlo por las mañanas para que las plantas tengan tiempo de secarse en el transcurso del día. Regar en la tarde o noche favorece la aparición de pudriciones y enfermedades causadas por hongos y bacterias.

1.11.4. Preparación del material a aclimatar

La plántula dentro del frasco se encuentra bajo condiciones de esterilidad y con alta humedad relativa, esta última deberá reducirse eliminando el papel parafilm o cinta selladora (si se usa). Unos cinco días antes del trasplante al suelo lo que dará a la planta mayor tolerancia a la baja humedad relativa del medio ambiente, facilitándole su posterior adaptación a condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua. Para realizar el trasplante de plántulas de los frascos se destapan totalmente y se sacan las plantas, debiendo lavarse cuidadosamente con agua, de manera que no quede agar adherido en las raíces. (Hurtado & Manzanares, 1987).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 Lugar de procedencia de la muestra

- ❖ *Prosthecheae crassilabia* Poepp & Endl, y *Sobralia setigera* Poepp & Endl, provienen del Centro Poblado de San Miguel del distrito de Marcapata, Provincia Quispicanchis, Región Cusco.
- ❖ *Epidendrum macrocarpum* Rich proviene del Instituto de Innovación de la Amazonia INIBICO - TARAPOTO.

2.1.2 Ubicación del Material de Colecta

Las muestras biológicas fueron colectadas del centro poblado de San Miguel, distrito Marcapata, Provincia de Quispicanchis, Región Cusco a una altitud de 1187m, a una longitud de 70°54 05.2" O y latitud de 13°24 27.2" S.

Ubicación del Centro Poblado de San Miguel, Distrito de Marcapata - Quispicanchi

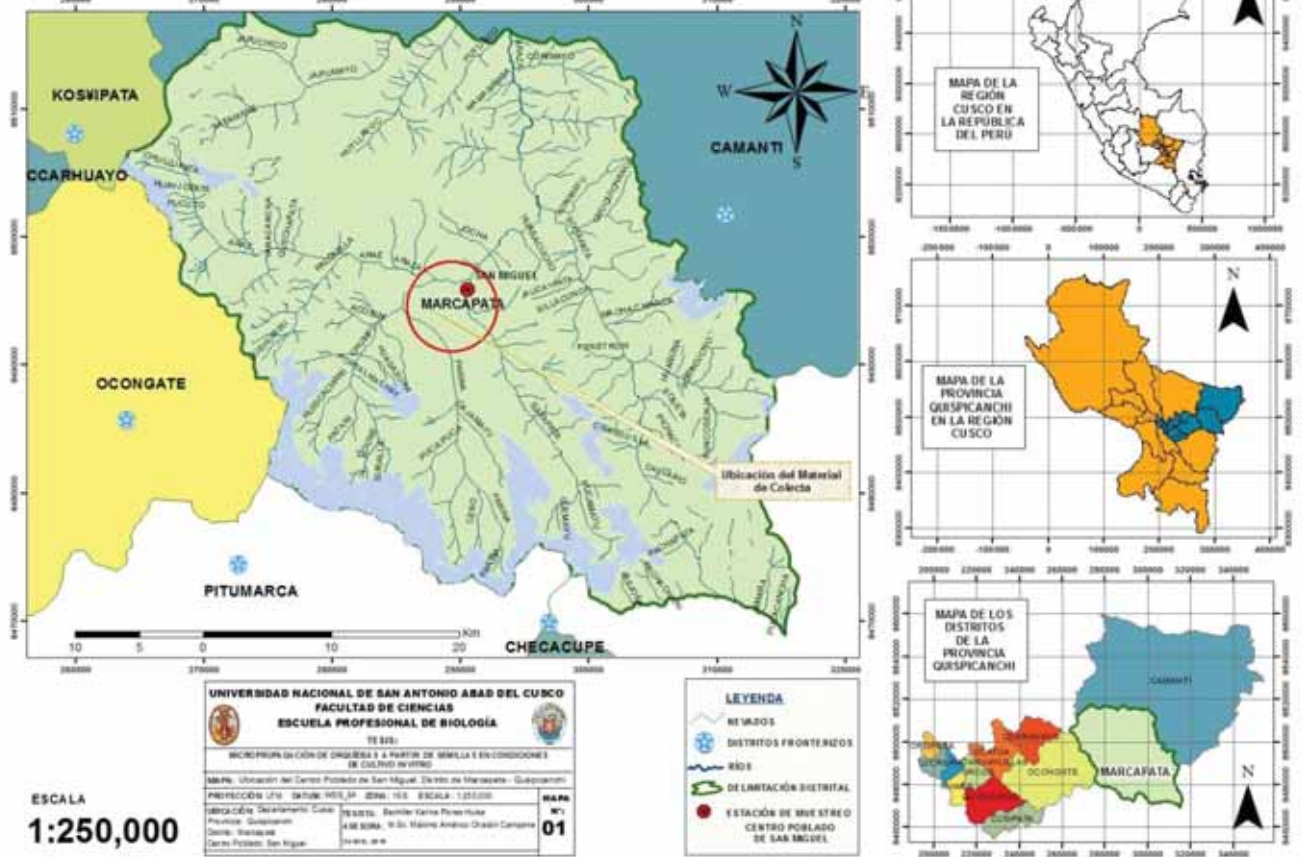


Figura 6. Mapa Político de Marcapata

2.2 Materiales

2.2.1 Biológico

Cápsulas de orquídeas *Sobralia setigera*, *Prostechea crassilabia*, y *Epidendrum macrocarpum*.

2.2.2. De Campo

- ✓ Libreta de apuntes
- ✓ Tijera de podar
- ✓ Bolsas de papel
- ✓ Etiquetas
- ✓ Cámara fotografía.

2.2.3. Equipos de Laboratorio

- ✓ Autoclave vertical serie AV – 10064 de 80 Lt
- ✓ Frio bar marca IGLU
- ✓ Horno Microondas marca Electrolux
- ✓ Microscopio
- ✓ Esteroscopio
- ✓ Horno Pasteur marca Binder
- ✓ Balanza analítica marca AND G.R 200
- ✓ Cámara de flujo laminar vertical marca Telstar Bio-II-A
- ✓ Destilador de agua marca AC-L8 Destiller

2.2.4. Material de vidrio

- ✓ Pipetas de 1ml, 5ml, 10ml
- ✓ Probeta de 100ml, 1000ml
- ✓ Baguetas
- ✓ Frascos de 150ml

2.2.5. De acero quirúrgico

- ✓ Pinzas de disección
- ✓ Mangos de bisturí N° 3 y 4
- ✓ Bisturi N°11 y 23
- ✓ Platos de acero quirúrgico

2.2.6. Medios de cultivo

- ✓ Medio murashige & skoog basal (MS)
- ✓ Agar agar

2.2.7. Vitaminas

- ✓ Glicina
- ✓ Tiamina
- ✓ Piridoxina
- ✓ Ácido nicotínico
- ✓ Myo- inositol

2.2.8. Suplementos Orgánicos

- ✓ Agua de coco
- ✓ Jugo de plátano verde

2.2.9. Materiales de Desinfección

- ✓ Hipoclorito de sodio al 5%
- ✓ Detergente
- ✓ Agua destilada esterilizada
- ✓ Alcohol 70%
- ✓ Fungicida Humai W.P

2.2.10. Otros materiales

- ✓ Mechero bunsen
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Parafilm
- ✓ Etiquetas y marcadores
- ✓ Bolsa de papel
- ✓ Papel craft
- ✓ Barbijo

2.2.11. Materiales de Invernadero

- ✓ Aspersor
- ✓ Bandejas de aclimatación
- ✓ Frascos de plásticos transparentes
- ✓ Musgo blanco (Spagnum sp)

- ✓ Turba
- ✓ Cascara de Arroz
- ✓ Fibra de Coco
- ✓ Carbón vegetal

2.2.12. Estructura de invernadero. Se construyó un área de 3 X 4 m², protegido con malla rachel y plástico de invernadero en donde se acondicionó los requerimientos ambientales como son temperatura y humedad acondicionadas dentro de las instalaciones del invernadero de la UNSAAC.

2.3 METODOLOGÍA

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal C-328 de la Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Biología, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

2.3.1. Colecta de la muestras

Se colectó cápsulas cerradas de coloración verde claro maduras sin ningún tipo de daño, en bolsas de papel por separado con su respectivo rotulo para el mejor manejo en laboratorio, en el mes de noviembre del 2016.

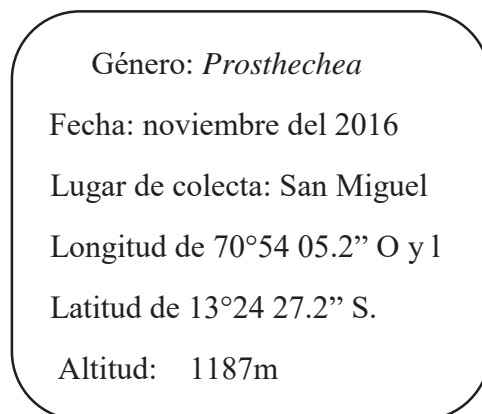


Figura 7. Etiqueta de colecta de muestras

Fuente: propia

2.3.2 Preparación de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) stock para macronutrientes y micronutrientes.

Se siguió el procedimiento establecido por (Murashige & Skoog, 1962) Primero se preparó un stock de las sales de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas.

Se pesó las cantidades de todas las sales de macronutrientes y micronutrientes que se detallan en la tabla 1 y tabla 2, disolviendo cada componente con agua destilada, mezclándolas y aforando en una probeta de 1000 ml. Este stock preparado se conservó en un frasco de 1 litro con tapa rosca refrigerándose, con su respectivo rotulo donde indica la cantidad de solución que se debe usar para la preparación de 1 Litro de medio de cultivo que es 100ml/L.

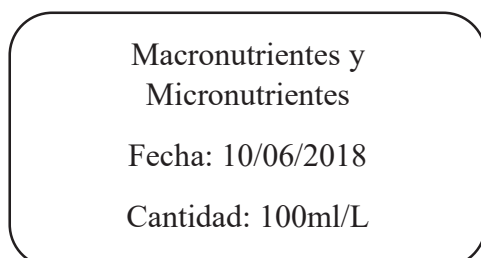


Figura 8. Rotulado de macro y micro nutrientes

Fuente: elaboración propia

Tabla 1. Macronutrientes

N°	Macronutrientes	10 X (gr)
1	NH ₄ NO ₃	16.5
2	KNO ₃	19
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
5	KH ₂ PO ₄	1.7

Fuente: Murashige & Skoog 1962.

Tabla 2. Micronutrientes

N	Micronutrientes	10 X (gr)
1	MnSO ₄ .H ₂ O	0.084
2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.086
3	H ₃ BO ₃	0.062
4	KI	0.0083
5	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0025
6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00025
7	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00025
8	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.278
9	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.373

} preparar aparte

Fuente: Murashige & Skoog 1962

El componente de hierro se prepara por separado del resto de los componentes disolviendo primero el Na₂EDTA.2H₂O en la cantidad indicada llevando a baño maría, seguidamente se

mezcló con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disuelto en agua destilada, es de vital importancia seguir este orden para que el Fe no precipite.

Este stock se guarda en la refrigeradora en un frasco de 1 litro cubierto con papel aluminio (en oscuridad), es necesario esto para que el Fe no se oxide. Se rotula con la fecha de preparación y la cantidad a usar por cada 1ltro de medio a preparar en este caso es 1000ml/L.

2.4 Preparación de vitaminas

- ✓ Se pesó las cantidades de todas las vitaminas, que se detallan en la tabla 3. procediendo a disolver la glicina y ácido nicotínico cada uno independientemente con agua destilada, aforamos en una probeta a 100ml.
- ✓ En el caso de la piridoxina y tiamina se disuelve en ácido clorhídrico (HCl). Cada vitamina se vierte en un frasco de 100ml se guarda en la refrigeradora, rotulando con fecha de preparación, nombre y cantidad a usar que en este caso es 10ml/L.

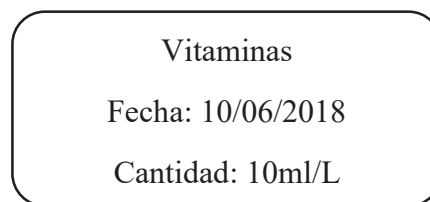


Figura 9. Rotulo para vitaminas

Fuente: elaboración propia

Tabla 3 Vitaminas

Vitaminas	100 X (gr/L)
Glicina	0.2
Acido nicotínico	0.05
Piridoxina (disolver en HCl)	0.05
Tiamina (disolver en HCl)	0.01

Fuente Murashige & Skoog 1962

2.2.4 Preparación de MS modificado: seguimos el siguiente procedimiento para cada MS modificado

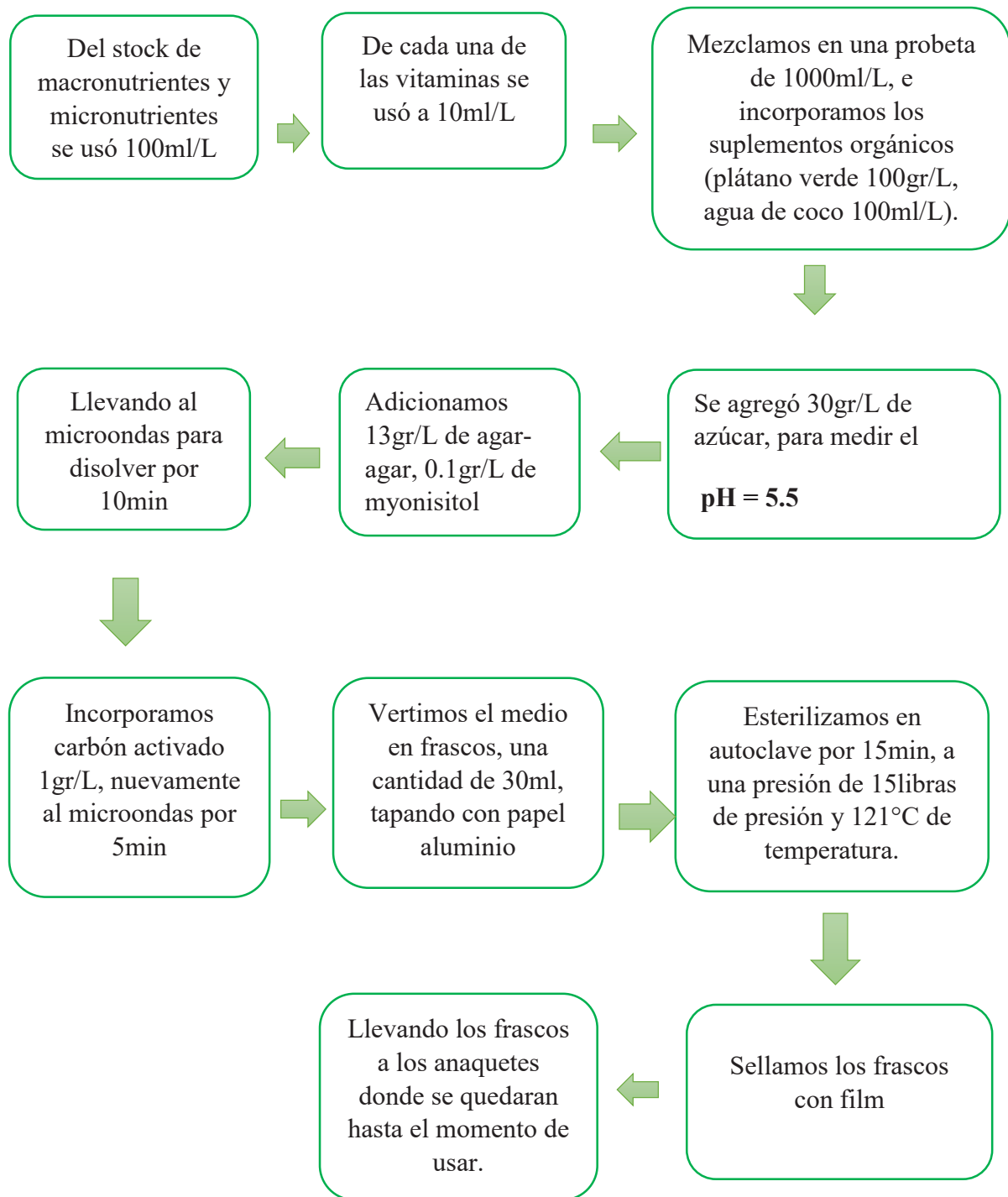


Figura 10. Flujograma de preparación de Ms modificados

Tabla 4. tratamientos usados

Tratamiento	Componente	Abrev.	Frascos usados	N° de plántulas
Tratamiento I	MS enriquecido con agua de coco	MS AC	5 frascos	5 plántulas
Tratamiento II	MS enriquecido con plátano verde	MS PL	5 frascos	5 plántulas
Testigo	Murashige & Skoog	MS	5 frascos	5 plántulas

Fuente: propia

2.2.4.1 Protocolo de Desinfección de Cápsulas cerradas

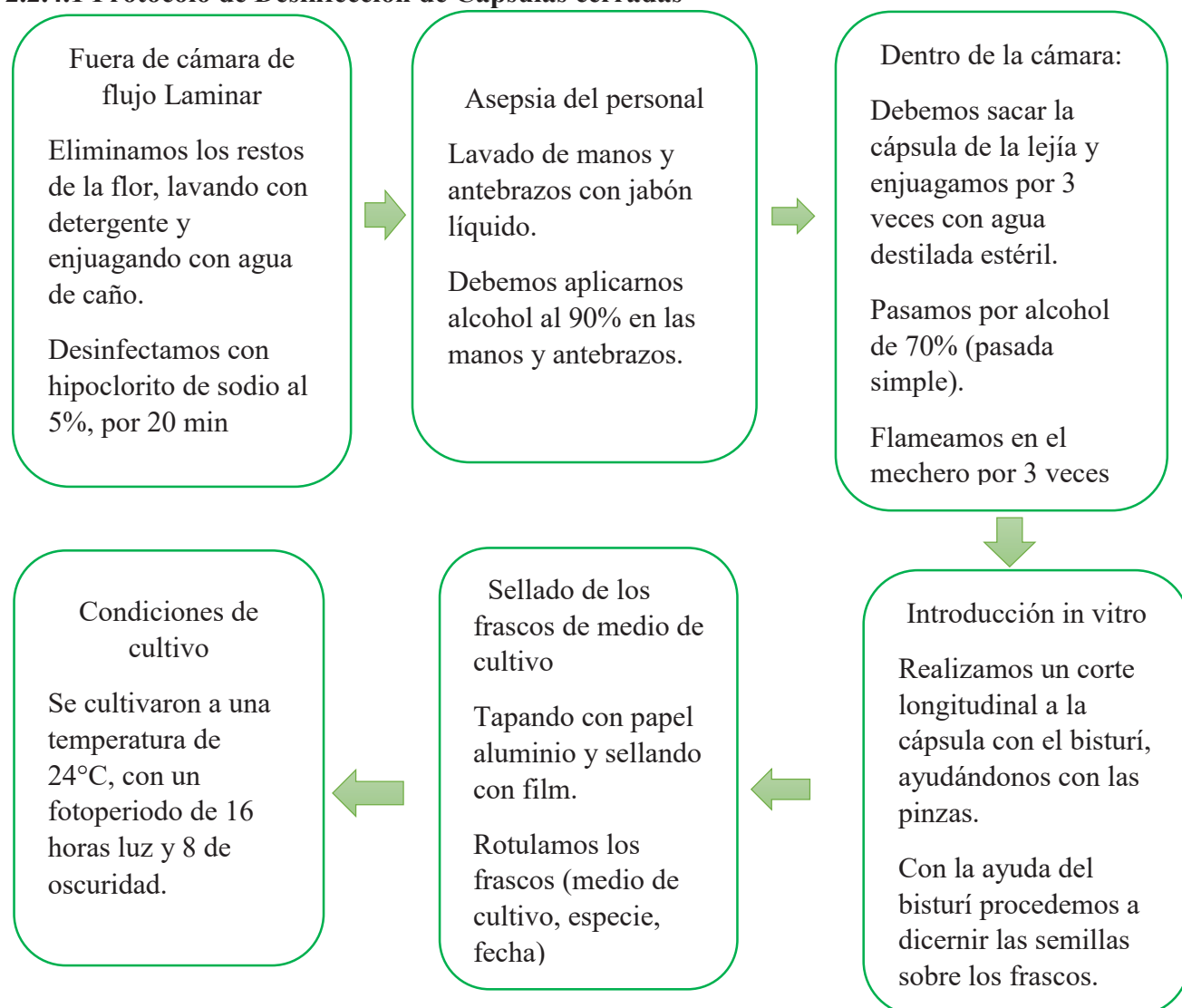


Figura 11. Flujograma de desinfección de capsulas

2.5 Procedimiento de germinación in vitro

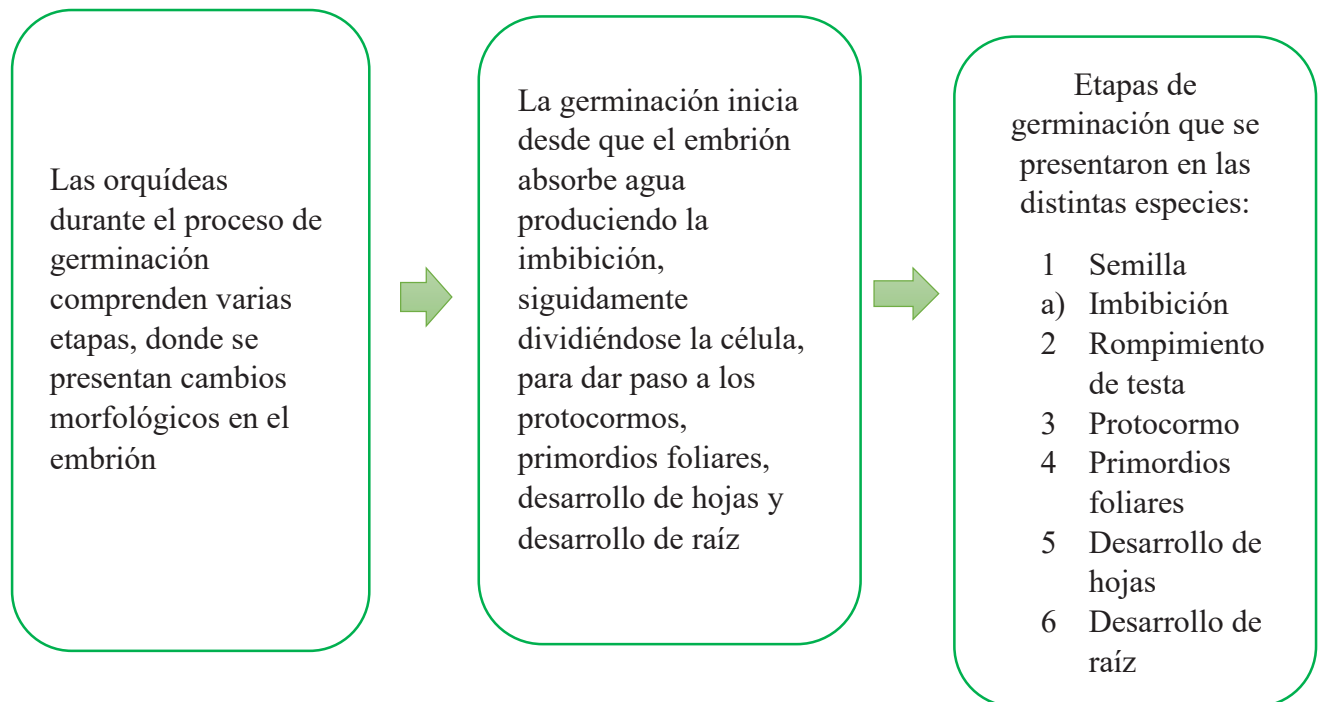


Figura 12. Flujograma de germinación in vitro

2.6 Procedimiento de crecimiento de plántulas

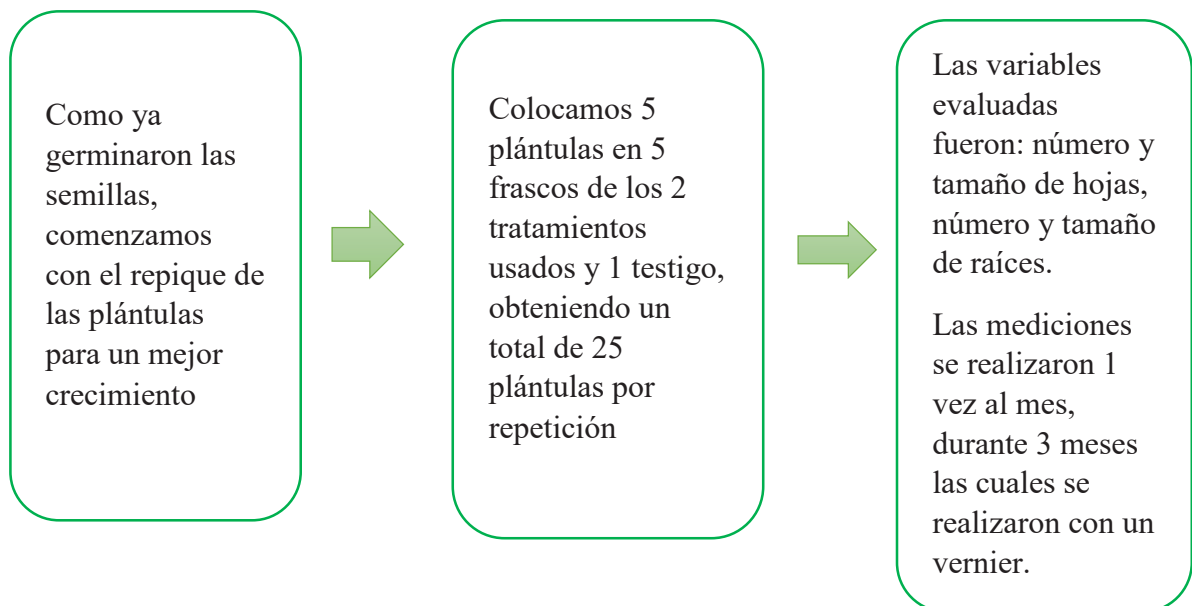


Figura 13. Flujograma crecimiento de plántulas

2.7 Procedimiento de repique de plántulas

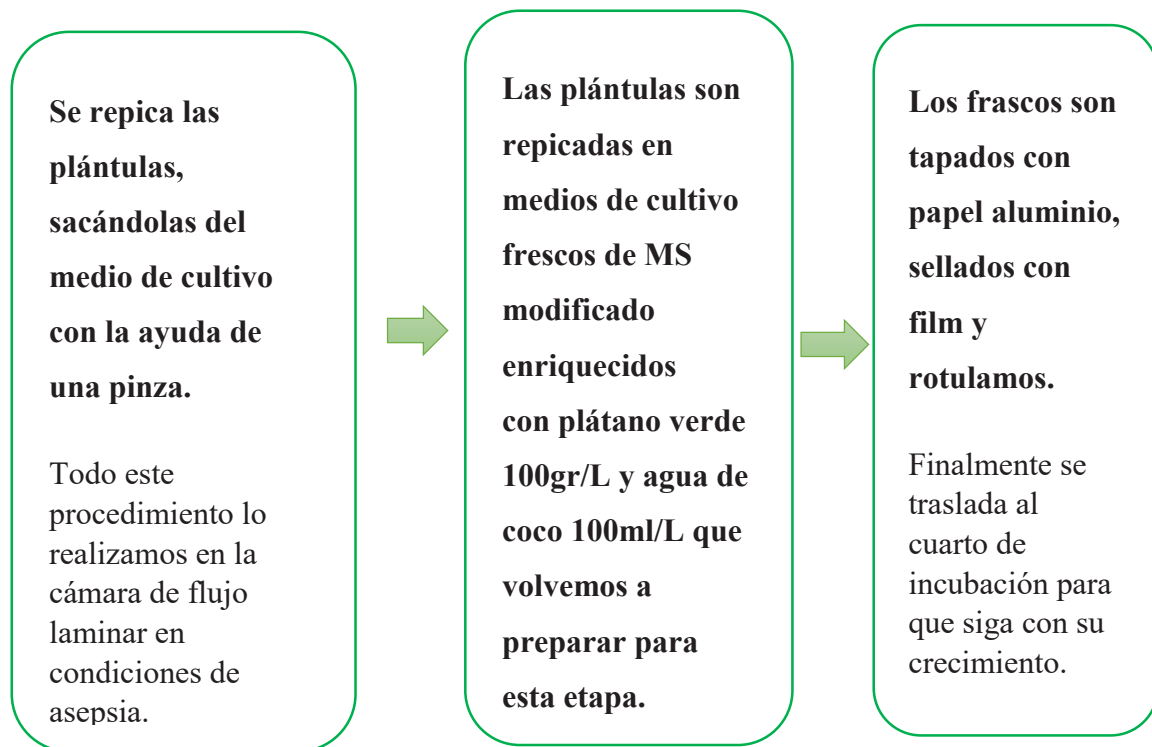


Figura 14. Flujograma de repique de plantas

2.8 Procedimiento para el proceso de aclimatación

Las plantas tienen que alcanzar en promedio 2.5cm de tamaño en hojas y en raíces 3cm, en promedio además de tener un buen número de hojas y un buen sistema radicular.

2.8.1 Preparación de las plántulas

Las plántulas fueron retiradas de los frascos, quitándolas el agar de las raíces con agua corriente a chorro moderado con mucho cuidado evitando maltratarlas. Sumergiendo en 1gr/L de fungicida (Humai) por 30 minutos, enjuagando con agua destilada para después seleccionarlas en tamaños: grandes medianos y pequeñas.

2.8.2 Preparación del sustrato de aclimatar

El sustrato fue una mezcla de musgo spagnum, turba, fibra de coco, cascara de arroz y pequeños trozos de carbón (3 partes de musgo, 1 de turba, 1 de fibra de coco, 1 de cascara de arroz, 1 de carbón vegetal). Usando 20 plántulas de *Prosthechea crassilabia*, 22 plantulas de *Sobralia setigera*, y 25 plántulas de *Epidendrum macrocarpum*, evaluándolas el porcentaje de supervivencia por 60 días.

2.8.2 Aclimatación

Las plántulas se transplantarán en frascos transparentes con varios orificios y cubetas de aclimatación donde colocamos la tercera parte del sustrato preparado dependiendo al tamaño de las plántulas. Colocando 1 a 3 plántulas por frasco, las plántulas pequeñas de (1cm) fueron colocadas en bandejas de aclimatación. Para ser llevadas al invernadero donde se acondiciono una cama de aclimatación, estas fueron tapadas con polietileno de doble densidad de color transparente.

2.9 Procesamiento de datos

2.9.1 Diseño Experimental

El diseño fue al azar. La evaluación en el proceso de germinación se realizó observando al microscopio, con la toma de fotografías de cada una de las etapas de desarrollo en los 2 tratamientos usados (PL y AC).

En el crecimiento de plántulas se usó 5 repeticiones por tratamientos (frascos) con 5 plántulas por frasco, por tanto nuestra unidad experimental fue 25 plántulas, realizando 1 medición por mes durante 3 veces, utilizando un vernier para la medición.

En el proceso de aclimatación usamos 20 plántulas de *Prosthechea*, 22 plántulas de *Sobralia*, y 25 plántulas de *Epidendrum*, observando la supervivencia durante 60 días.

2.9.2 Análisis de Datos

Los datos obtenidos en la etapa de crecimiento número de hojas, tamaño de hojas, número de raíces, tamaño de raíces para cada tratamiento propuestos, fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una Prueba de Tukey a un $P \leq 0.05$ con el paquete estadístico SSPS versión 23.

2.9.3 Variables Utilizadas.

Variables Dependientes

- ❖ Adaptación al medio de cultivo
- ❖ Desarrollo de órganos vegetativos

Variables Independientes

Medio Murashige & Skoog modificado

CAPÍTULO III

Resultados y Discusiones

3.1 Efecto de las 2 formulaciones nutritivas en medio de cultivo MS modificado

3.1.1 Germinación de *Prosthechea crassilabia* Poepp & Endl.

- 1) **Imbibición:** después de 19 días de cultivo, se observó el hinchamiento pronunciado y aumento de tamaño en las semillas con un color verde claro.

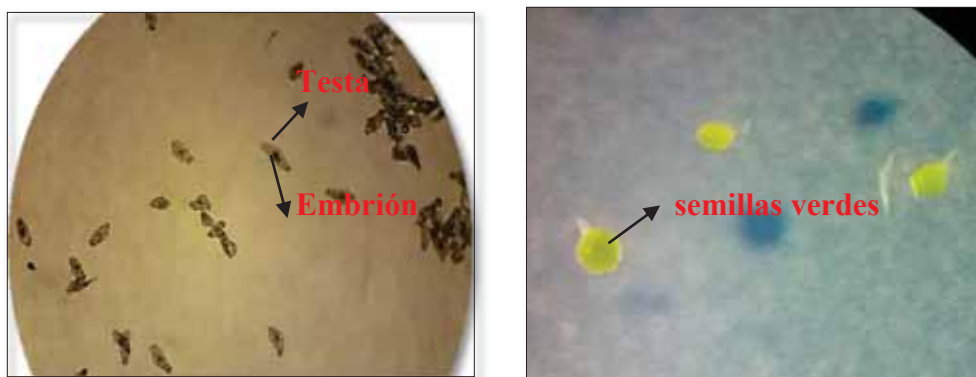


Figura 15, fotomicrografía a) semilla

b) imbibición

Observación a un aumento de (100X)

Observación a un aumento (100X)

- 2) **Rompimiento de la testa:** el embrión aumento su circunferencia y longitud, ocupando un mayor espacio rompiendo la testa y dando inicio a la germinación, a los 32 días en ambos tratamientos (PL,AC), posteriormente a los 55 días en el testigo (MS).



Figura 15; fotomicrografía rompimiento de testa

Vista al esterescopio con un aumento de (200 X)

- 3) **Protocormo:** el embrión incrementa más su tamaño, formando una protuberancia en su polo apical, esta etapa se presentó a los 62 días en ambos tratamientos finalmente en el testigo (MS) el protocormo inicial se dio a los 85 días

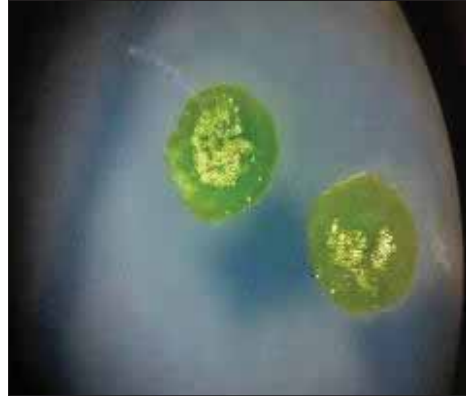


Figura 16, fotomicrografía protocormo

Visto al esteroscopio a un aumento de (200X)

- 4) **Primordios foliares:** precursor de las hojas verdaderas, se desarrolló a los 92 días en ambos en el tratamientos (PL, AC) finalmente a los 115 días en el testigo (MS).



Figura 17, fotomicrografía primordio foliar

Visto al esterescopio aun aumento de (200X)

- 5) **Desarrollo de hojas:** las hojas se desarrollaron en ambos tratamientos a los 122 días, mientras que en el testigo se presentó a los 145 días.



Figura 18, fotomicrografía desarrollo de hojas

- 6) **Desarrollo de raíces:** las raíces se desarrollaron a los 152 días en ambos tratamientos (PL, AC), sin embargo en el testigo (MS) se dio a los 175 días.

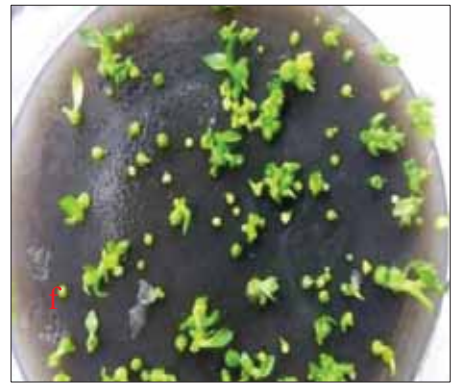


Figura 19, fotomicrografía desarrollo de raíz

El tratamiento I AC y el tratamiento II PL mostraron un tiempo de germinación de 152 días, no existiendo diferencia entre ambos tratamientos, lo cual indica que la utilización de ambas sustancias orgánicas es eficaz para el proceso de germinación en *Prosthechea crassilabia*, de las tres especies estudiadas esta es la que menos tiempo tarda en la germinación.

Figura 20, Germinación *in vitro* de *Prosthechea crassilabia* Poepp & Endl

- a) Semilla; b) imbibición; c) rompimiento de testa; d) protocormo; e) primordio foliar; f) desarrollo de hojas; g) desarrollo de raíces.



3.1.2. Germinación de *Sobralia setigera* Poepp & Endl.

1. **Imbibición:** los embriones se hincharon aumentando su tamaño y teniendo un color verde a los 18 días de haber iniciado la siembra.

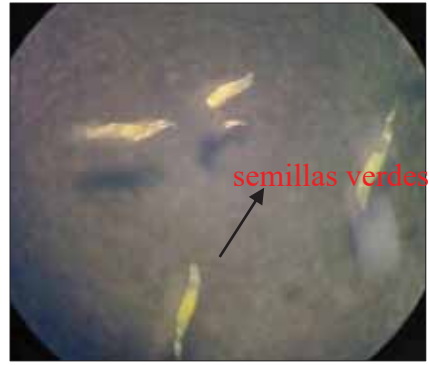


Figura 21, fotomicrografía a) semilla

b) imbibición

Observación a un aumento de (100X)

observación a un aumento de (100X)

- 2) **Rompimiento de la testa:** el embrión aumento su circunferencia y longitud, ocupando un mayor espacio rompiendo la testa y dando inicio a la germinación, a los 36 días en el tratamiento II (PL), a los 56 días en el tratamiento I (AC), a los 70 días en el testigo (MS).



Figura 22, fotomicrografía rompimiento de testa

Visto al estereoscopio a un aumento de (200 X)

- 3) **Protocormo:** el embrión incrementa más su tamaño, formando una protuberancia en su polo apical, esta etapa se dio a los 66 días en el tratamiento II (PL), Este etapa se observó a los 86 días en el tratamiento I (AC), mientras que el protocormo se observó a 100 días en el testigo (MS).



Figura 23, fotomicrografía protocormo

Visto al estereoscopio a un aumento (de 200 X)

- 4) **Primordios foliares:** es un precursor de las hojas verdaderas, esta etapa se dio a los 66 días en el tratamiento I (PL).), Este estadio se observó a los 116 días en el tratamiento I (AC), mientras que en el testigo (MS). Se dio a los 130 días.



Figura 24, fotomicrografía primordio foliar

Visto al estereoscopio a un aumento de (200X)

- 5) **Desarrollo de hojas:** el desarrollo de las hojas, se observó a los 126 días en el tratamiento II (PL). Esta etapa se observó a los 146 días en el tratamiento I (AC), posteriormente se observó a los 160 días en el testigo (MS).



Figura 25, fotomicrografía desarrollo de hojas

Visto al estereoscopio a un aumento de (200X)

- 6) **Desarrollo de raíces:** el desarrollo de las raíces, se dio a los 156 días en el tratamiento II (PL), a los 176 días en el tratamiento I (AC) mientras que el testigo se observó a los 190 días en el testigo (MS).

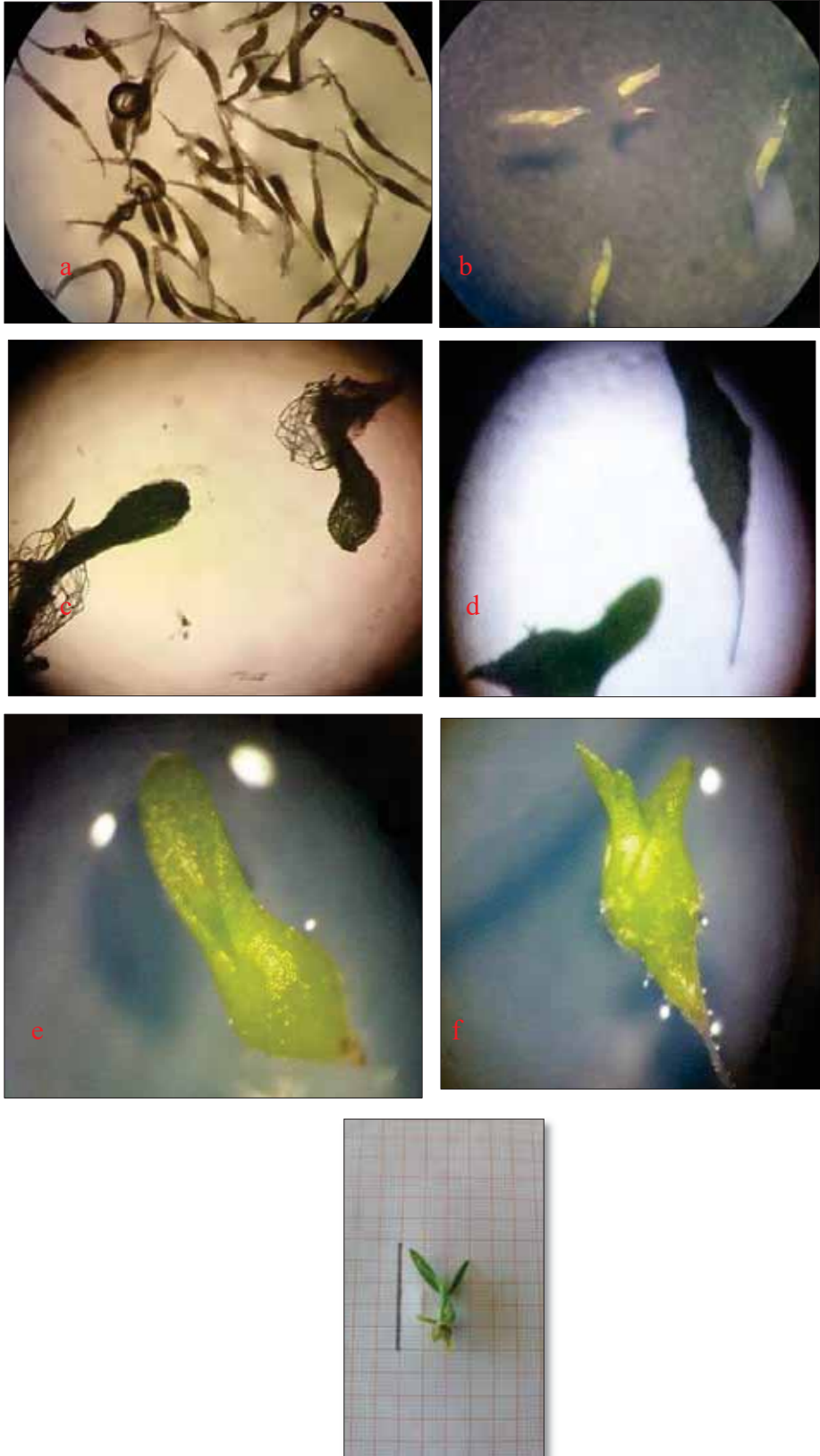


Figura 26, fotomicrografía desarrollo de raíz.

El tratamiento II (PL), resulto eficaz con 156 días en todo el proceso de germinación de *Sobralia setigera*, seguido del tratamiento I AC que duro 176 días, siendo esta especie la que más tiempo demoro en el proceso de germinación.

Figura 27, desarrollo *in vitro* de *Sobralia setigera* Poepp & End.

- a) Semilla; b) imbibición; c) rompimiento de testa; d) protocormo; e) primordio foliar; f) desarrollo de hojas; g) desarrollo de raíces.



3.1.3. Germinación de *Epidendrum macrocarpum* Rich.

1) **Imbibición:** el embrión absorbe agua produciendo el hinchamiento pronunciado y aumento de tamaño de las semillas con un color verde, esto se observó a los 10 días.

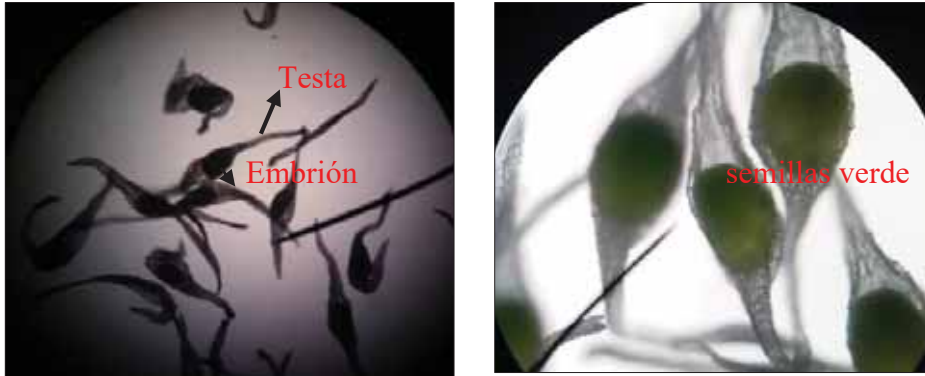


Figura 28, fotomicrografía a) semilla

b) imbibición

Observación a un aumento de (100 X)

Observación a un aumento (100 X)

2) **Rompimiento de la testa :** el embrión aumento su circunferencia y longitud, ocupando un mayor espacio rompiendo la testa y dando inicio a la germinación esta etapa se dio a los 21 días en el tratamiento II (PL), en el tratamiento I (AC) se dio a los 28 días, finalmente a los 55 días en el testigo (MS).

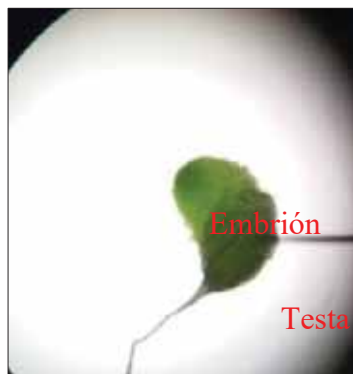


Figura 29, fotomicrografía rompimiento de testa a un amento de (100X)

3) **Protocormo:** el embrión incrementa más su tamaño, formando una protuberancia en su polo apical en el tratamiento II (PL) se dio a los 51 días, en el tratamiento I (AC), se dio a los 58 días, finalmente a los 85 días en el testigo (MS).

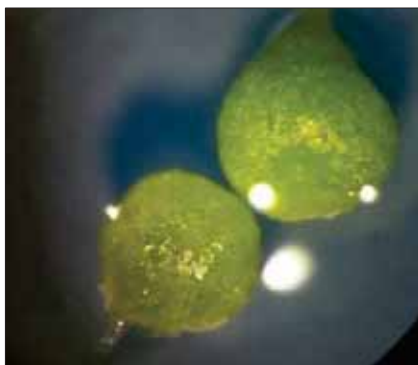


Figura 30, fotomicrografia protocormo

Visto al estereoscopio a un aumento de (200X)

- 4) **Primordios foliares:** es el precursor de las hojas verdaderas, se dio a los 81 días en el tratamiento II (PL), posteriormente a los 88 días en el tratamiento I(AC), mientras que en el testigo (MS) se dio a los 115 días.



Figura 31, fotomicrografia primordio foliar aumento de (100X)

- 5) **Desarrollo de hojas:** el desarrollo de las hojas se dio a los 111 días en el tratamiento II (PL), en el tratamiento I (AC), se dio a los 118 días, en el testigo (MS) se dio a los 145 días.

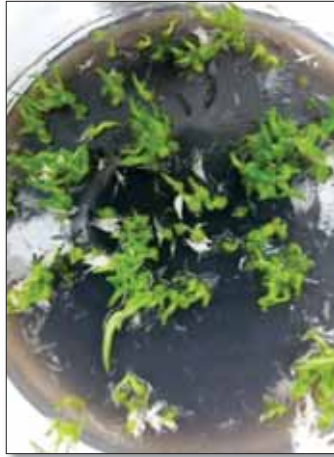


Figura 32, fotomicrografía desarrollo de hojas

- 6) **Desarrollo de raíces:** el desarrollo de las raíces se dio a los 141 días en el tratamiento II (PL), posteriormente a los 148 días en el tratamiento I (AC), mientras que en el testigo se dio a los 175 días.

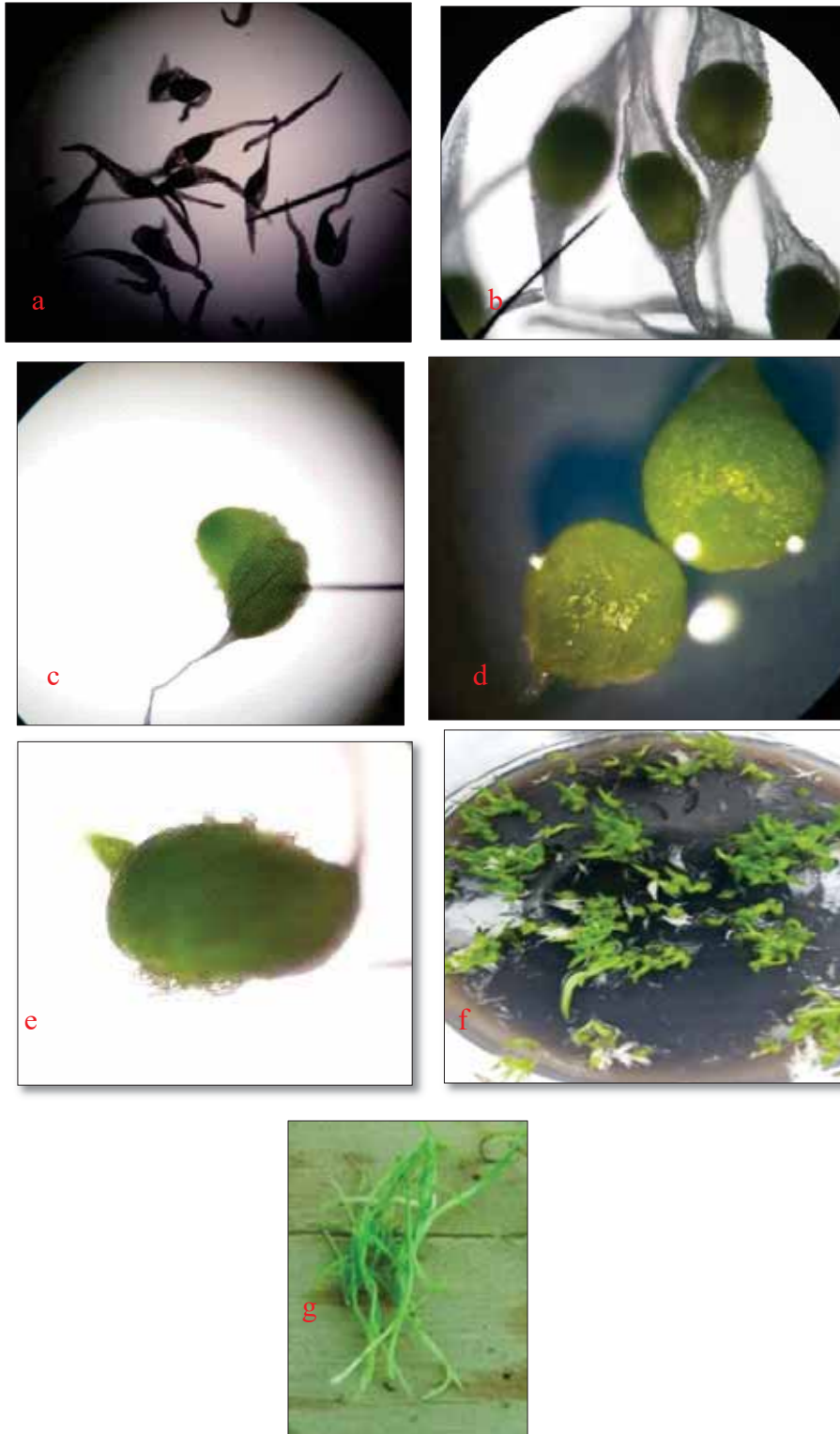


Figura 33, fotomicrografía desarrollo de raíces

El tratamiento II (PL) y tratamiento I (AC) muestran una pequeña diferencia, entre las especies, de *Epidendrum macrocarpum*, esta especie es la que menos tiempo necesito en el proceso de germinación en comparación con las demás especies, esto puede deberse a que el género *Epidendrum* no es exigente en cuanto a requerimientos nutricionales.

Figura 34, desarrollo *in vitro* de *Epidendrum macrocarpum* Rich

- a) Semilla; b) imbibición; c) rompimiento de testa; d) protocormo; e) primordio foliar;
f) desarrollo de hojas; g) desarrollo de raíces



3.2 Crecimiento de *Prosthechea crassilabia* Poepp & Endl.

3.2.1. Número de Hojas

En total se evaluó 225 plántulas, donde se determinó el número de hojas registradas durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos y un testigo. Utilizando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 5 Análisis de varianza para el número de hojas

F.V	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	5.56	2	2.78	5.69	<0.0001
Mes	4.52	2	2.26	4.63	0.01
Tratamiento*mes	1.62	4	0.4	0.83	0.51
Error	105.36	216	0.49		
Total	117.05	224			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$, con respecto al número de hojas. Si existe diferencia significativa en el número de hojas debido al tiempo de medición.

Variable	N	R ² ajustado	CV
#hojas	225	0.07	25.85

Tabla 6 Prueba de Tukey al 95% para tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E
MS	2.48	75	0.08 A
AC	2.81	75	0.08 B
PL	2.81	75	0.08 B

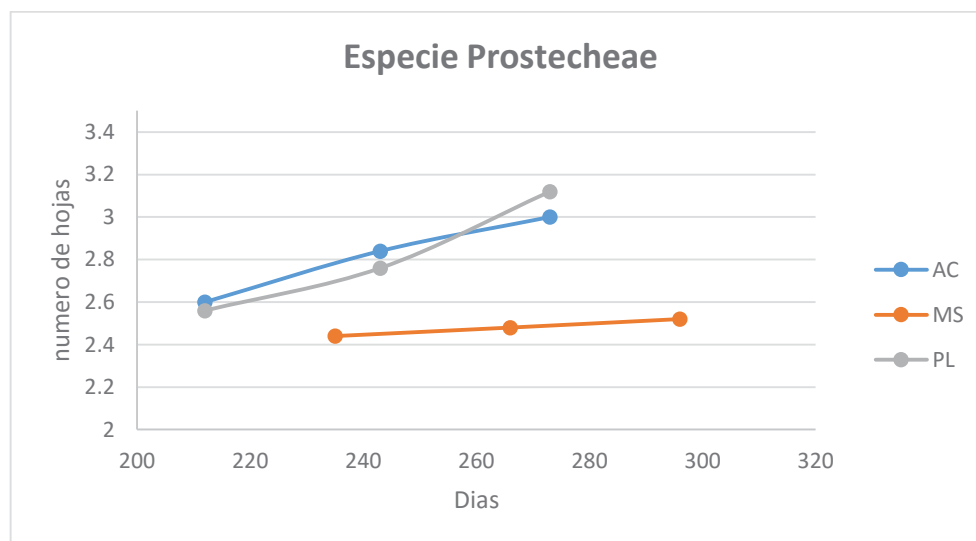
En la tabla 6, se observa que no existe diferencias significativas en ambos tratamientos I (AC) y II (PL), siendo los dos medios óptimos para el desarrollo de hojas en *Prosthechea crassilabia*, esto nos indica que la adición de suplementos orgánicos en el medio MS resulta favorable en formación de hojas.

Tabla 7. Prueba Tukey al 95 % para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	235	2.44	25	0.14	A
MS	266	2.48	25	0.14	A
MS	296	2.52	25	0.14	A B
PL	212	2.56	25	0.14	A B
AC	212	2.6	25	0.14	A B
PL	243	2.76	25	0.14	A B
AC	243	2.84	25	0.14	A B
AC	273	3	25	0.14	A B
PL	273	3.12	25	0.14	B

La tabla 7 nos muestra los promedios de rendimiento de cada medio de cultivo en cuanto al tiempo, donde los tratamientos I (AC) y II (PL) obtuvieron mejor rendimiento de hojas por cada mes de medición, indicándonos que el tiempo si influye en el desarrollo de hojas.

Gráfico 1 Curva de crecimiento de número de hojas según tiempo y tratamientos.



En el gráfico 1, se observa que el tratamiento I (AC) y tratamiento II (PL) durante las 2 primeras mediciones Tuvieron igualdad en el desarrollo de hojas, sin embargo en la tercera medición el tratamiento II (PL) presenta un ligero incremento en el desarrollo de las hojas, esto puede deberse a que en el tratamiento I (AC) hubo descenso de hojas originados por alguna deficiencia del medio de cultivo, ambos tratamientos resultaron eficaz frente a nuestro testigo donde la producción de plantas existe pero de manera lenta, demostrándonos que la adición de suplementos orgánicos resulta favorable para el crecimiento de las orquídeas.

3.2.2. Tamaño de hojas.

Se evaluó un total de 608 hojas donde se determinó su tamaño registrado durante los 3 tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Usando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 8 Análisis de varianza para tamaño de hojas

F.V	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	3.06	2	1.53	15.14	<0.0001
Mes	7.92	2	3.96	39.17	<0.0001
Mes*Tratamiento	0.31	4	0.08	0.76	0.55
Error	60.56	599	0.1		
Total	72.26	607			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos, con respecto al tiempo de mediciones $p \leq 0.05$, durante el desarrollo de las hojas.

Variable	N	R ² ajustado	CV
Tamaño hoja	608	0.15	53.27

Tabla 9 Prueba de Tukey al 95% para tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E
MS	0.5	186	0.02 A
PL	0.58	211	0.02 B
AC	0.68	211	0.02 C

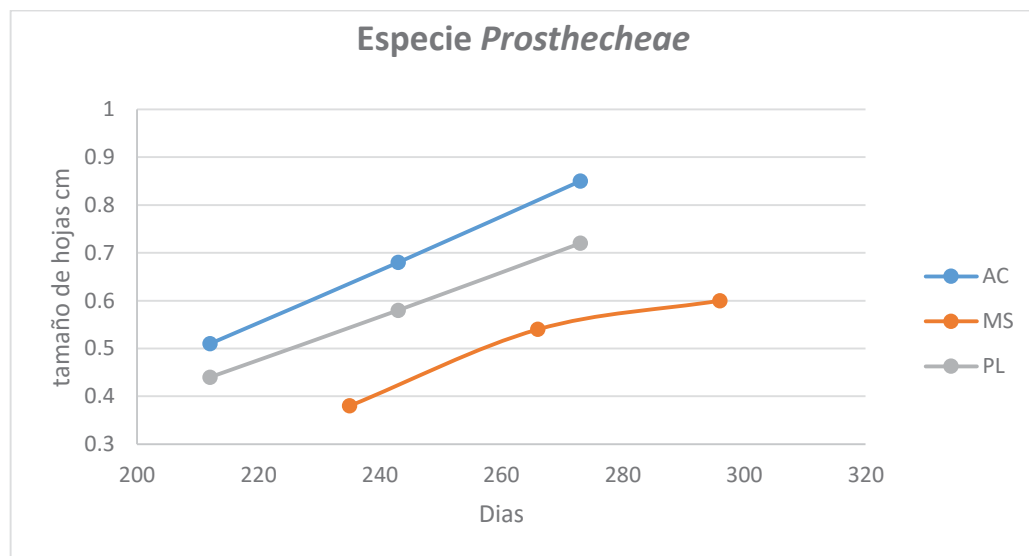
Existe diferencia significativa entre los tratamientos, siendo el tratamiento I (AC) de mejor rendimiento durante el crecimiento de hojas con 0.68cm en promedio esto nos indica que la adición del agua de coco resultado de manera eficiente, esto puede deberse a su composición el agua de coco presentan auxinas y giberelinas.

Tabla 10 Prueba Tukey para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	235	0.38	61	0.04	A
PL	212	0.44	64	0.04	A B
AC	212	0.51	65	0.04	A B C
MS	266	0.54	62	0.04	A B C
PL	243	0.58	69	0.04	B C D
MS	296	0.6	63	0.04	B C D
AC	243	0.68	71	0.04	C D
PL	273	0.72	78	0.04	D E
AC	273	0.85	75	0.04	E F

La tabla N 10, nos muestra los promedios por cada mes de medición, el cual evidencia el mejor rendimiento en el crecimiento de hojas el tratamiento I (AC), seguidamente del tratamiento II (PL), esto nos indica que es favorable la adición de complementos orgánicos durante el crecimiento de hojas, encontramos que a mayor tiempo mayor tamaño de las hojas.

Gráfico 2 Curva de crecimiento tamaño de hojas según tiempo (días) y tratamientos.



En el gráfico 2 observamos que el tratamiento I (AC) resultó más eficiente en cuanto al tamaño de hojas con un promedio de 0.68cm, durante las 3 veces de medición, seguido del tratamiento II (PL), siendo el más idóneo para el crecimiento de hojas la adición de agua de coco, mientras que el tratamiento II (PL), presenta un proceso lento en cuanto a crecimiento de hojas.

3.2.3. Número de raíces

En total se evaluó 225 plántulas donde se determinó el número de raíces registrado durante los tres tiempos de medición y los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Utilizando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 11 Análisis de varianza número de raíz

F.V	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	5.15	2	2.57	3.51	<0.0001
Mes	13.63	2	6.81	9.3	0.03
Tratamiento*mes	0.99	4	0.25	0.34	0.85
Error	158.24	216	0.73		
Total	178	224			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$, sin embargo se observa que no existe diferencia significativa respecto al número de raíces con respecto al tiempo, lo cual nos indica que el tiempo no es determinante para el desarrollo de raíces.

Variable	N	R ² ajustado	CV
#raíz	225	0.08	42.8

Tabla 12 Prueba de Tukey al 95% para tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E
PL	1.88	75	0.1 A
MS	1.91	75	0.1 A B
AC	2.21	75	0.1 B

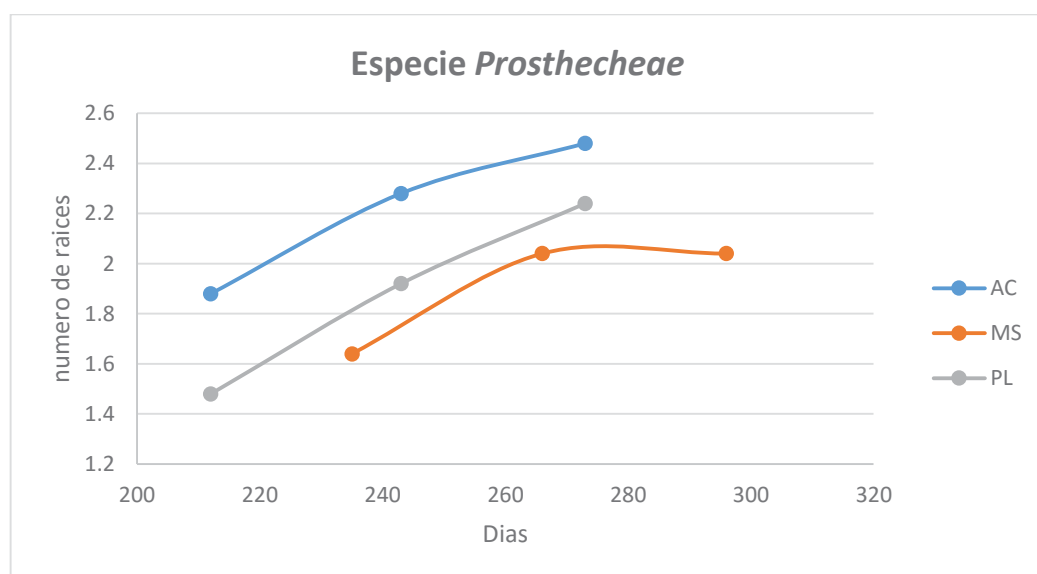
El tratamiento I (AC) es el que presenta mayor desarrollo de raíces con un promedio de 2.21, mientras que el tratamiento II (PL) solo presenta 1.91 raíces en promedio por cada mes de mediciones. Siendo el agua de coco un suplemento orgánico recomendado para producción de raíces.

Tabla 13 Prueba Tukey al 95 % para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
PL	212	1.48	25	0.17	A
MS	235	1.64	25	0.17	A B
AC	212	1.88	25	0.17	A B C
PL	243	1.92	25	0.17	A B C
MS	266	2.04	25	0.17	A B C
MS	296	2.04	25	0.17	A B C
PL	273	2.24	25	0.17	B C
AC	243	2.28	25	0.17	B C
AC	273	2.48	25	0.17	C

En la tabla 13 podemos observar el promedio de las medias por cada tratamiento y mes de medición en donde el tratamiento I (AC) es el que tiene mayor rendimiento en la producción de raíces, seguido del tratamiento II (PL), existiendo un claro aumento de raíces entre el primer mes y segundo mes, esto evidencia que la adición de complejos orgánicos resulta favorable para el número de raíces.

Gráfico 3 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos en número de raíces.



En el gráfico 3 observamos que el tratamiento I (AC) es el de mejor rendimiento en el número de raíces y tiempo de producción a los 273 días después de la siembra, seguido del tratamiento II (PL). Podemos observar también que en el testigo en la tercera medición ocurre un descenso en la curva de crecimiento esto puede deberse a la composición del medio de cultivo, y que pudo haber existido una variación en el pH del medio de cultivo.

3.2.4. Tamaño de raíz

En total se evaluó 447 raíces donde se determinó el tamaño, registrados durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Usando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 14 Análisis de varianza tamaño de raíz

FV	SC	GL	CM	F	P-valor
tratamiento	0.89	2	0.45	11.56	<0.0001
Mes	2.51	2	1.26	32.6	<0.0001
Tratamiento*mes	0.29	4	0.07	1.9	0.11
Error	16.88	438	0.04		
Total	20.77	446			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos; $p \leq 0.05$, con respecto al tiempo de medición.

Variable	N	R ² ajustado	CV
Tamaño raíz	447	0.17	45.71

Tabla 15 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E
MS	0.36	140	0.02 A
PL	0.41	141	0.02 A
AC	0.47	166	0.02 B

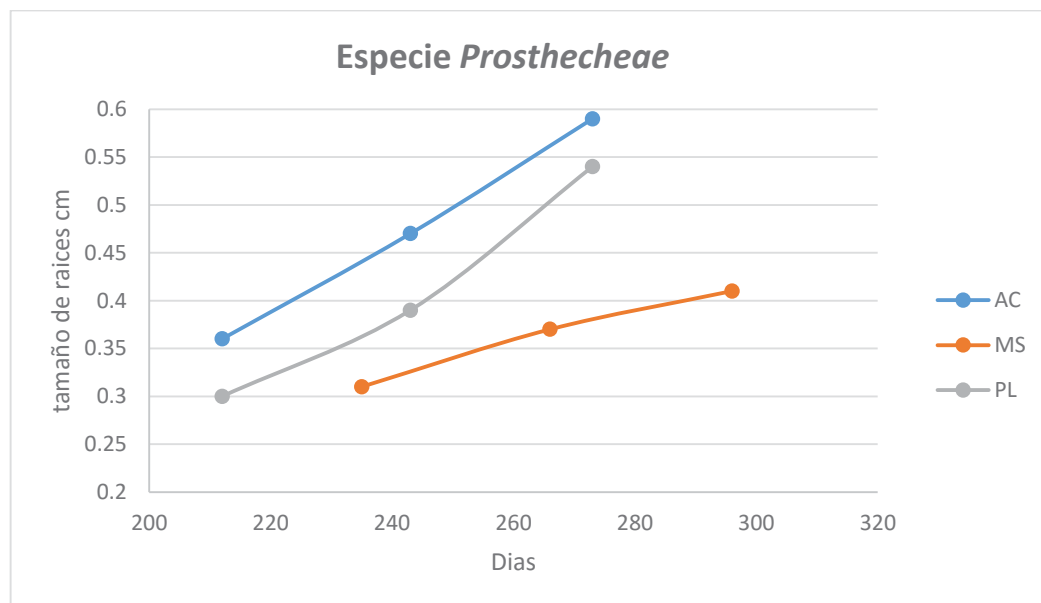
La tabla 15 nos muestra que existe diferencias significativas entre los tratamientos, el tratamiento I (AC) es el de mayor rendimiento para el tamaño de raíces con un promedio de 0.47cm en promedio durante los 3 tiempos de mediciones, seguido del tratamiento II (PL) siendo el tratamiento I (AC) el más óptimo para tamaño en la especie *Prosthechea crassilabia*.

Tabla 16 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
PL	212	0.3	37	0.03	A
MS	235	0.31	38	0.03	A
AC	212	0.36	47	0.03	A B
MS	266	0.37	51	0.03	A B
PL	243	0.39	48	0.03	A B
MS	296	0.41	51	0.03	A B
AC	243	0.47	57	0.03	B
PL	273	0.54	56	0.03	C
AC	273	0.59	62	0.03	C

En la tabla 16, podemos observar el promedio de las medias por cada medición realizada durante nuestras evaluaciones, en donde el tratamiento I (AC), es el que obtuvo mayor rendimiento respecto a los demás tratamientos, seguidamente del tratamiento II (PL), indicando que el tiempo es un factor importante a mayor tiempo mayor tamaño de las raíces esto nos indica que la adición de complementos orgánicos en el crecimiento del tamaño de la raíz resulta de manera positiva para el crecimiento de las raíces.

Gráfico 4 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos.



En el gráfico 4 observamos que el tratamiento I (AC) es el más óptimo para el crecimiento de las raíces a los 273 días después de la siembra, seguidamente del tratamiento II (PL), observando que en la tercera medición existe una ligera diferencia entre ambos tratamientos, sin embargo en el testigo existe una marcada diferencia en cuanto al crecimiento y al tiempo de *Prosthechea*.

3.3 Crecimiento de *Sobralia setigera* Poepp & Endl.

3.3.1. Número de Hojas

En total se evaluó 225 plántulas donde se determinó el número de hojas registrado durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Usando el diseño experimental ANOVA para bloque tiempo y tratamiento.

Tabla 17 Análisis de varianza número de hojas

F.V.	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	6.01	2	3	10.11	<0.0001
Mes	3.66	2	1.83	6.16	<0.0001
Tratamiento*mes	0.1	4	0.02	0.08	0.99
Error	64.16	216	0.3		
Total	73.93	224			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$ con respecto al tiempo de mediciones.

Variable	N	R ² ajustado	CV
#hojas	225	0.1	18.06

Tabla 18. Prueba tukey al 95% para tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.
MS	2.81	75	0.06 A
AC	3.03	75	0.06 B
PL	3.21	75	0.06 B

En la tabla 18, observamos que existe diferencias significativas entre los tratamientos, el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento para número de hojas en *Sobralia setigera*, seguido del tratamiento I (AC), resultando de manera positiva la aplicación de complementos orgánicos mientras que en el testigo existe una producción muy lenta de hojas.

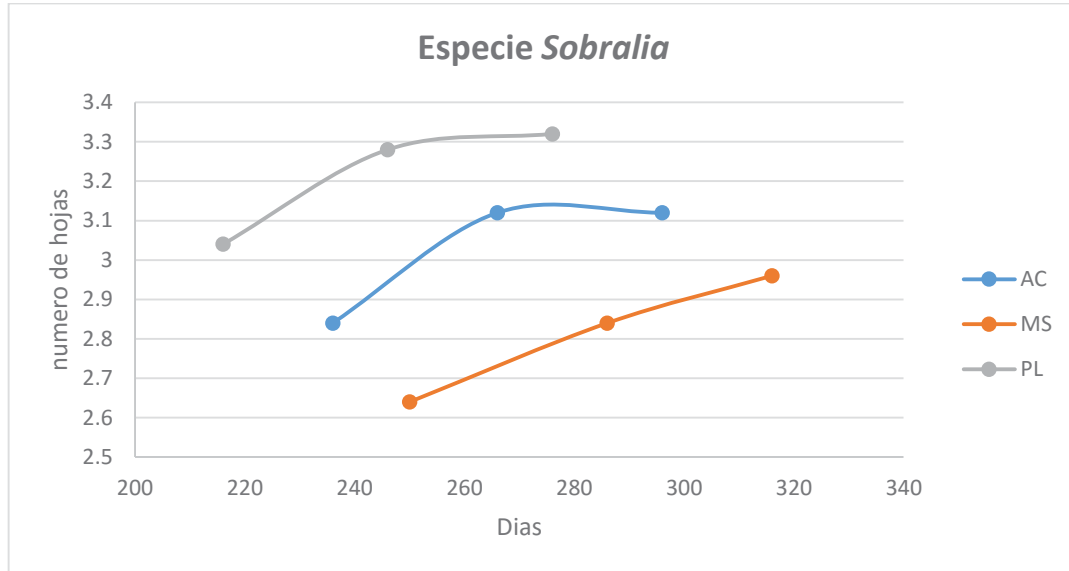
Tabla 19 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	250	2.64	25	0.11	A
AC	236	2.84	25	0.11	A B
MS	286	2.84	25	0.11	A B
MS	316	2.96	25	0.11	A B C
PL	216	3.04	25	0.11	A B C
AC	266	3.12	25	0.11	B C
AC	296	3.12	25	0.11	B C
PL	246	3.28	25	0.11	B C
PL	276	3.32	25	0.11	C

La tabla 19 nos demuestra los promedios de las medias por mes de medición en donde el tratamiento II (PL), es el de mayor rendimiento para el número de hojas, seguida del

tratamiento I (AC), también se observa que si influye el tiempo a mayor tiempo más hojas. Existiendo diferencias entre los tratamientos con respecto al testigo.

Gráfico 5 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos.



En el gráfico 5, se observa que el tratamiento II (PL) y tratamiento I (AC) en los 2 tiempos de mediciones existe producción de hojas, sin embargo en la tercera medición existe un pequeño descenso de hojas, esto puede deberse a que el medio de cultivo sufrió cambios en su composición, también se observa que en el testigo la curva de crecimiento es lineal.

3.3.2. Tamaño de Hojas

En total se evaluó 679 hojas donde se determinó el tamaño de hojas durante las tres mediciones realizadas en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Utilizando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 20 Análisis de varianza tamaño de hojas

F.V.	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	0.62	2	0.31	2.53	0.08
Mes	15.12	2	7.56	61.25	<0.0001
Tratamiento*mes	0.06	4	0.01	0.12	0.98
Error	82.68	670	0.12		
Total	98.48	678			

No existe diferencia significativa entre los tratamientos $p > 0.05$, sin embargo existe diferencia significativa en el tamaño de hojas debido al tiempo de medición.

Variable	N	R ² ajustado	CV
Tamaño hoja	679	0.15	54.51

Tabla 21 Prueba tukey al 95% para tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.
AC	0.6	227	0.02 A
MS	0.64	211	0.02 A
PL	0.68	241	0.02 A

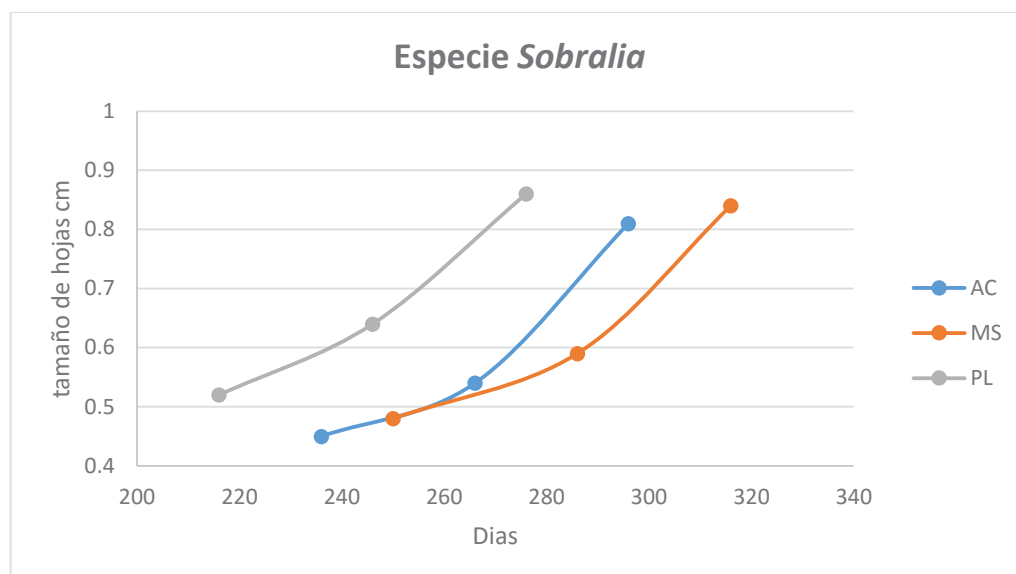
La tabla 21 nos muestra que existe una ligera diferencia entre los tratamientos I (AC) y tratamiento II (PL), en cuanto al tamaño de las hojas para *Sobralia*, la diferencia significativa esta con el testigo, esto se puede deber a que cada especie de orquídea es distinta en cuanto a los requerimientos para su desarrollo.

Tabla 22 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
AC	236	0.45	71	0.04	A
MS	250	0.48	66	0.04	A B
PL	216	0.52	76	0.04	A B
AC	266	0.54	78	0.04	A B
MS	286	0.59	71	0.04	A B
PL	246	0.64	82	0.04	B C
AC	296	0.81	78	0.04	C D
MS	316	0.84	74	0.04	D E
PL	276	0.86	83	0.04	D E F

En la tabla 22 observamos el promedio de las medias por cada mes de medición, siendo el tratamiento II (PL) el de mejor rendimiento, sin embargo el tratamiento I(AC) no muestra mucha diferencia con respecto al tratamiento II(PL), evidenciando que esta orquídea es muy exigente en cuanto a requerimientos nutricionales.

Gráfico 6 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos.



En el gráfico 6 se observa que el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento para el crecimiento de hojas, seguido del tratamiento I (AC), sin embargo el testigo muestra un crecimiento marcado en el tercer mes de medición, lo cual implica que este medio MS a pesar de no tener ningún tipo de suplemento orgánico se muestra favorable para el crecimiento de las hojas en *Sobralia setigera*.

3.3.3. Número de raíz

En total se evaluó 225 plantas de las cuales se determinó el número de raíces registrado durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Haciendo uso del diseño experimental ANOVA para bloque tiempo y tratamiento.

Tabla 23 Análisis de varianza número de raíz

F.V.	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	8.86	2	4.43	11.98	<0.0001
Mes	1.32	2	0.66	1.78	0.17
Tratamiento*mes	0.28	4	0.07	0.19	0.94
Error	79.92	216	0.37		
Total	90.38	224			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$, sin embargo no existe diferencia significativa en el número de raíces debido al tiempo de medición.

Variable	N	R ² ajustado	CV
#raiz	225	0.08	164.89

Tabla 24 Prueba tukey al 95% para tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.
MS	0.11	75	0.07 A
AC	0.41	75	0.07 B
PL	0.59	75	0.07 B

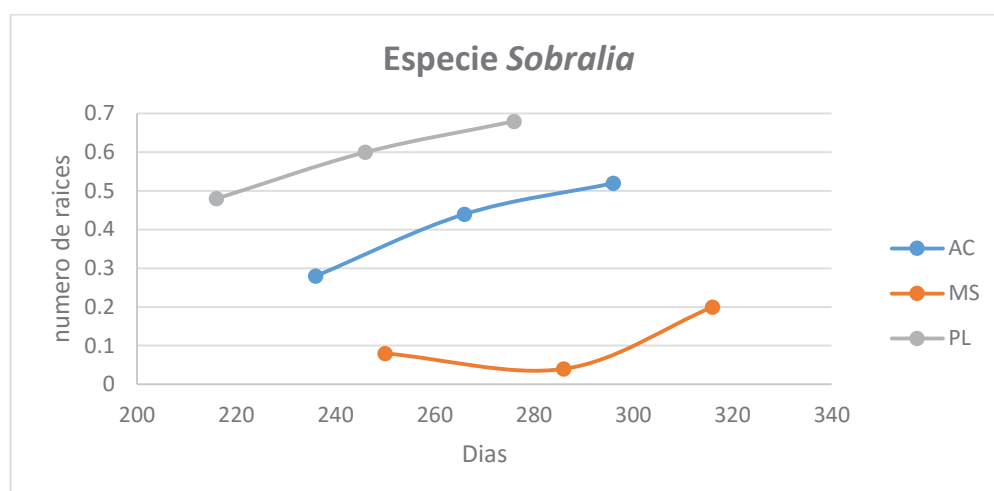
Existe diferencias significativas entre los tratamientos, el tratamiento II (PL), es el de mejor rendimiento en el desarrollo de raíces, seguido del tratamiento I (AC) lo cual nos indica que el suplementar al medio de cultivo con plátano resulta favorable para *Sobralia setigera*.

Tabla 25 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	250	0.04	25	0.12	A
MS	286	0.08	25	0.12	A B
MS	316	0.2	25	0.12	A B C
AC	236	0.28	25	0.12	A B C
AC	266	0.44	25	0.12	A B C
PL	216	0.48	25	0.12	A B C
AC	296	0.52	25	0.12	A B C
PL	246	0.6	25	0.12	B C
PL	276	0.68	25	0.12	C

En la tabla 25 observamos que existe diferencias entre el promedio de las medias por cada mes de medición, siendo el tratamiento II (PL) el que mejor rendimiento obtuvo respecto al tratamiento I (AC), sin embargo debemos indicar que esta especie es muy exigente en cuanto a requerimientos nutricionales para el desarrollo de raíces y el tiempo no hace que el número de raíces aumente.

Gráfico 7 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos.



En el gráfico 7, se observa que el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento en los tres tiempos de medición, seguido del tratamiento I (AC), observamos también que no hubo un aumento significativo de las raíces durante los tres mediciones realizadas, se observa también que el tratamiento III (MS), presenta un declive en el segundo mes de medición esto significa que hubo pérdida de las raíces, que pudo deberse a la composición del medio de cultivo.

3.3.4. Tamaño de raíz

En total se evaluó 81 raíces donde se determinó el tamaño de las raíces registrado durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Utilizando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 26 Análisis de varianza para tamaño de raíz

F.V.	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	0.16	2	0.08	2.39	0.10
Mes	0.44	2	0.22	6.63	<0.0001
Tratamiento*mes	0.24	4	0.06	1.82	0.13
Error	2.37	72	0.03		
Total	3.78	80			

No existe diferencia significativa entre los tratamientos $p > 0.05$, sin embargo existe diferencia significativa en el tamaño de raíces con respecto al tiempo de medición.

Variable	N	R2 ajustado	CV
Tamaño raíz	81	0.3	42.34

Tabla 27 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.
AC	0.35	31	0.03 A
MS	0.41	8	0.08 A
PL	0.45	42	0.03 A

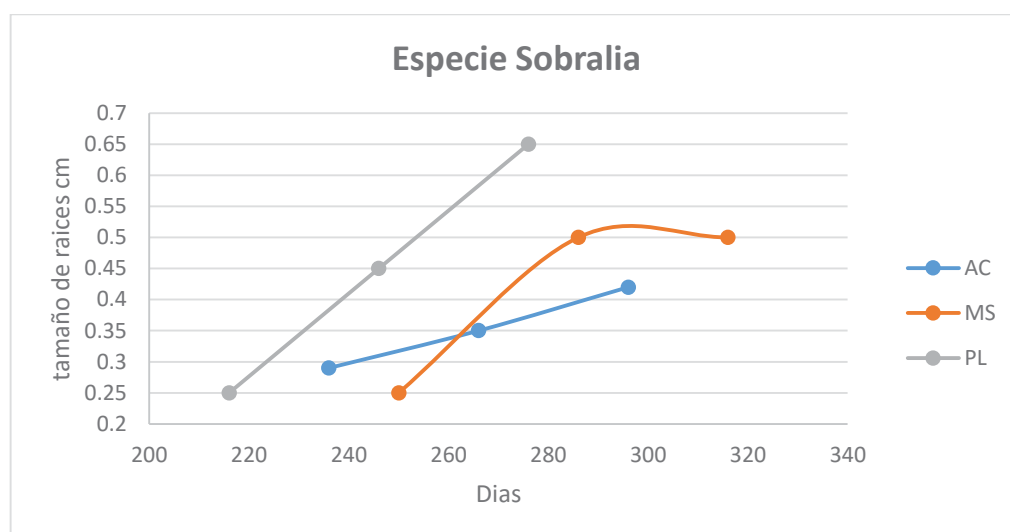
En la tabla 27, observamos que el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento, seguido del tratamiento I (AC), sin embargo debemos indicar que no existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos en cuanto al tamaño de raíces, lo que significa que *Sobralia setigera* es muy exigente en cuanto a requerimientos nutricionales para poder desarrollar raíces y por ende su crecimiento. También esta especie es la que menos raíces produce en comparación con las otras especies.

Tabla 28 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	250	0.25	2	0.13	A
PL	216	0.25	10	0.06	A
AC	236	0.29	7	0.07	A
AC	266	0.35	11	0.05	A
MS	286	0.4	5	0.08	A
AC	296	0.42	13	0.05	A
PL	246	0.45	15	0.05	A
MS	316	0.5	1	0.18	A
PL	276	0.65	17	0.04	A

En la tabla 28, observamos el promedio de las medias por cada mes de medición donde el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento, seguidamente del tratamiento I (AC), sin embargo no existe una marcada diferencia entre los tratamientos con respecto al tamaño de las raíces.

Gráfico 8. Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos.



En el gráfico 8, observamos que el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento para el tamaño de raíces, en los tres tiempos de mediciones, se observa también que el testigo (MS) evidencia un claro crecimiento en el tamaño de raíces durante la segunda medición estableciéndose en la tercera medición, esto nos indica a pesar de que este medio no contiene ningún tipo de suplemento orgánico estimula el crecimiento de las raíces.

3.4 Crecimiento de *Epidendrum macrocarpum* Rich.

3.4.1. Número de Hojas

En total se evaluó 225 plántulas donde se determinó el número de hojas registrado durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Utilizando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 29 Análisis de varianza número de Hojas

F.V	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	56.33	2	28.16	43.23	<0.0001
Mes	3.24	2	1.62	2.48	0.09
Tratamiento*mes	1.03	4	0.26	0.4	0.81
Error	140.72	216	0.65		
Total	201.32	224			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$, sin embargo no existe diferencia significativa respecto al tiempo de mediciones.

Variable	N	R ² ajustado	CV
#hojas	225	0.28	22.64

Tabla 30 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
MS	3.08	75	0.09	A
AC	3.36	75	0.09	A
PL	4.25	75	0.09	B

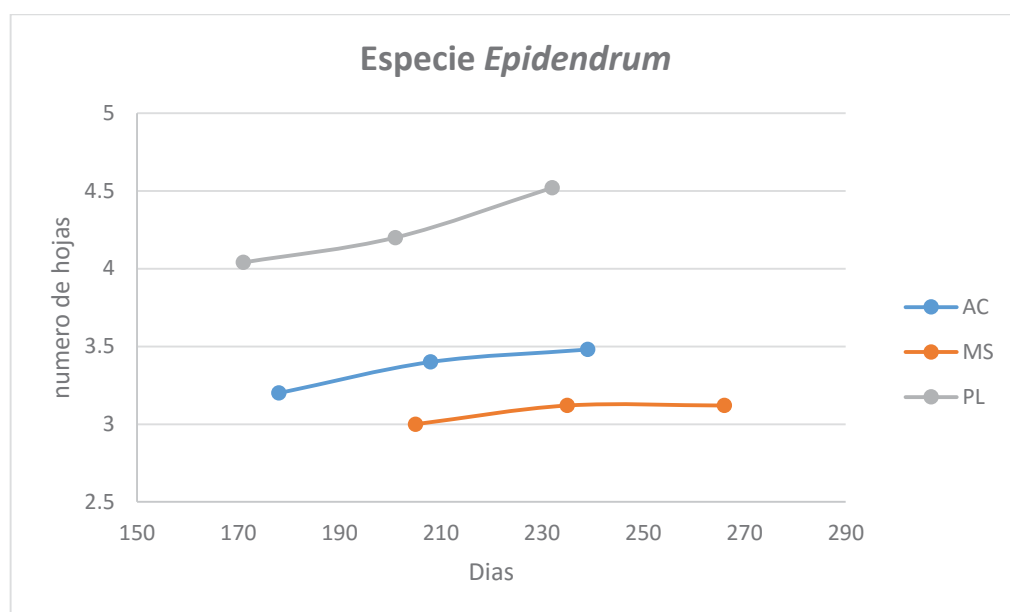
En la tabla 30, se observa que el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento en el número de hojas, siendo el plátano el suplemento orgánico favorable para esta especie; sin embargo entre el tratamiento I (AC) y el testigo (MS) existe una ligera diferencia esto demuestra que esta especie no es exigente en cuanto a requerimientos nutricionales.

Tabla 31 Prueba Tukey al 95% para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	205	3	25	0.16	A
MS	235	3.12	25	0.16	A
MS	266	3.12	25	0.16	A
AC	178	3.2	25	0.16	A
AC	208	3.4	25	0.16	A B
AC	239	3.48	25	0.16	A B
PL	171	4.04	25	0.16	B C
PL	201	4.2	25	0.16	C
PL	232	4.52	25	0.16	C

En la tabla 31 se muestra los promedios de las medias por cada mes de medición, existiendo diferencias entre los tratamientos; el tratamiento II(PL), es el de mejor rendimiento, seguido del tratamiento I(AC), evidenciando que al añadir suplementos orgánicos resulta de manera favorable en la producción de hojas para esta especie. Debemos indicar que el tiempo de crecimiento no es el factor más resaltante para el número de hojas en esta especie el sustrato de crecimiento es más importante.

Gráfico 9 Curva de crecimiento según tiempo (días) y tratamientos.



En el gráfico 9 se observa que los tratamientos presentan un crecimiento lineal, siendo el tratamiento II (PL) el que mayor rendimiento obtuvo en los tres tiempos de medición, seguido del tratamiento I (AC), y el testigo lo cual nos indica que al suplementar complejos orgánicos es favorable para esta especie, siendo esta especie la que mejor producción de hojas presenta respecto a las demás especies.

3.4.2. Tamaño de Hojas

En total se evaluó 802 hojas en las cuales se determinó el tamaño de hojas registrado durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo.

Tabla 32 Análisis de varianza tamaño de hojas

F.V.	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	14.9	2	7.45	32.12	<0.0001
Mes	23.21	2	11.6	50.02	<0.0001
Tratamiento*mes	0.2	4	0.05	0.23	0.93
Error	183.95	793	0.23		
Total	223.34	801			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$, con respecto al tiempo de medición.

Variable	N	R2 ajustado	CV
Tamaño hojas	802	0.17	47.83

Tabla 33 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
MS	0.87	231	0.03	A
AC	0.91	252	0.03	A
PL	1.17	319	0.03	B

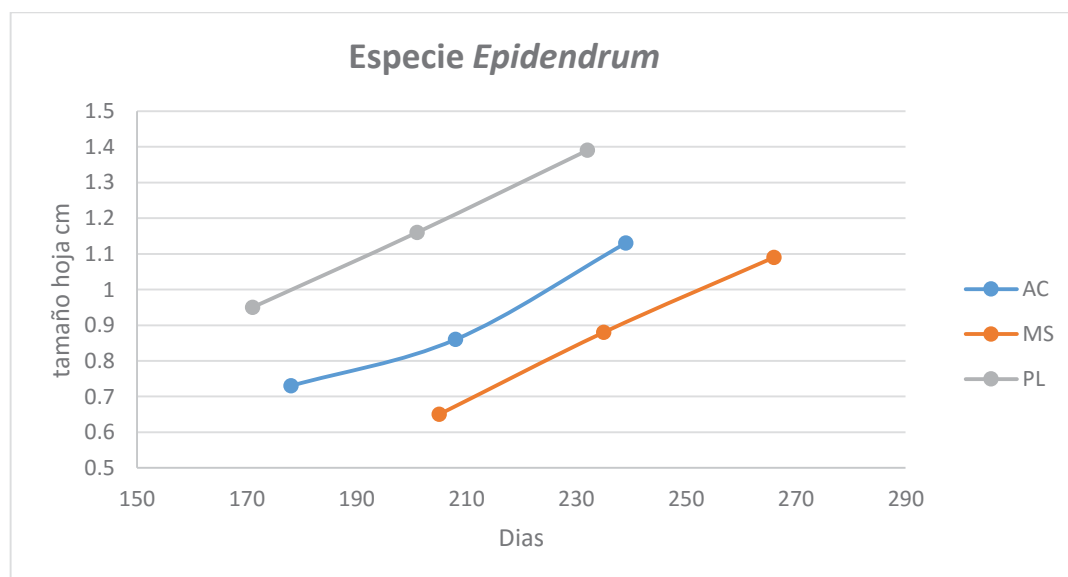
La tabla 33 nos muestra que el tratamiento II (PL) es el de mejor rendimiento con respecto al tratamiento I(AC), Para el tamaño de hojas durante las mediciones realizadas en los tres tiempos.

Tabla 34 Prueba Tukey para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	205	0.65	75	0.05	A
MS	235	0.88	78	0.05	A B C
MS	266	1.09	78	0.05	C D
AC	178	0.73	80	0.05	A B
AC	208	0.86	85	0.05	A B C
AC	239	1.13	87	0.05	D
PL	171	0.95	101	0.05	B C D
PL	201	1.16	105	0.05	D E
PL	232	1.39	113	0.05	E

La tabla 34, nos muestra el promedio de las medias durante las tres evaluaciones realizadas, en donde el tratamiento II(PL) es el de mejor rendimiento para el tamaño de las hojas, seguido del tratamiento I (AC), esto nos indica que la adición de suplementos orgánicos resulto favorable para esta especie.

Gráfico 10. Curva de crecimiento tamaño de hojas según tratamientos.



En el gráfico 10, observamos que los tratamientos y testigo presentan un crecimiento lineal durante los tres tiempos de mediciones, siendo el tratamiento II (PL) el de mejor rendimiento, seguido del tratamiento I (AC), resultando favorable la adición de suplementos orgánicos, siendo esta especie la que mejor desarrollo de hojas y tamaño presenta respecto a las otras especies.

3.4.3 Número de raíces

En total se evaluó de 225 plantas en las cuales se determinó el número de raíces registrado durante los tres tiempos de medición y en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Utilizando el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 35 Análisis de varianza número de raíz

F.V	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamiento	16.7	2	8.35	15.4	<0.0001
Mes	2.46	2	1.23	2.27	0.11
Tratamiento*mes	1.27	4	0.32	0.59	0.67
Error	117.12	216	0.54		
Total	137.56	224			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$, sin embargo no existe diferencia significativa en el número de raíces debido al tiempo de medición.

Variable	N	R ² ajustado	CV
#raíz	225	0.12	34.16

Tabla 36 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.
AC	1.81	75	0.09 A
MS	2.17	75	0.09 B
PL	2.48	75	0.09 C

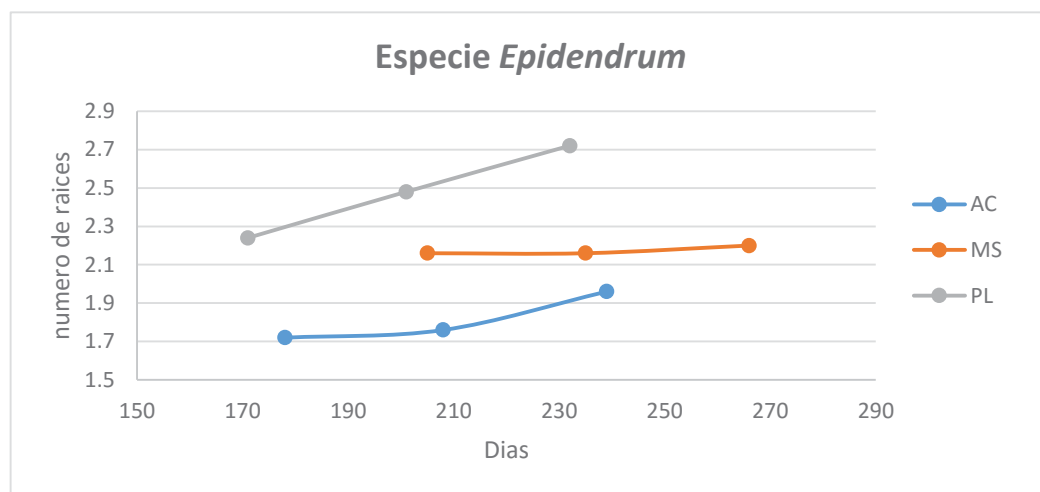
En la tabla 36 nos demuestra que existe diferencias significativas respecto a los tratamientos el de mejor rendimiento es el tratamiento II (PL), seguido del tratamiento I (AC), el cual resulta de manera favorable la adición de suplementos orgánicos en el desarrollo de raíces.

Tabla 37 Prueba Tukey para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
AC	178	1.72	25	0.15	A
AC	208	1.76	25	0.15	A
AC	239	1.96	25	0.15	A B
MS	205	2.16	25	0.15	A B C
MS	235	2.16	25	0.15	A B C
MS	266	2.2	25	0.15	A B C
PL	171	2.24	25	0.15	A B C
PL	201	2.48	25	0.15	B C
PL	232	2.72	25	0.15	C

En la tabla 37 , observamos los promedios de las medias durante las tres evaluaciones realizadas durante el estudio, siendo el tratamiento II(PL) el que mejor rendimiento obtuvo, seguido del tratamiento I(AC), observamos que el tiempo de crecimiento no es el factor más resaltante para el numero de raíces indicando que en esta especie el sustrato del tratamiento es más importante que el tiempo de medición, para esta especie es más favorable la adición de suplementos orgánicos para el desarrollo de raíces.

Gráfico 11 Curva de crecimiento según tratamientos.



En el grafico 11 observamos que el tratamiento II(PL) es el de mejor rendimiento , seguido de nuestro testigo esto demuestra que esta especie no es exigente en requerimientos nutricionales , el tratamiento I(AC) no resulto efectivo para el desarrollo de las raíces.

3.4.4 Tamaño de raíces

En total se evaluó 485 en las cuales se determinó el tamaño de las raíces registrado durante los tres tiempos de medición en los 2 tratamientos propuestos y un testigo. Utilizaremos el diseño experimental ANOVA para bloque tratamiento y tiempo.

Tabla 38 Análisis de varianza tamaño de raíz

F.V.	SC	GL	CM	F	P-valor
Tratamientos	12.34	2	6.17	67.51	<0.0001
Mes	14.8	2	7.4	80.95	<0.0001
Tratamientos*mes	0.23	4	0.06	0.63	0.64
Error	43.5	476	0.09		
Total	71.53	484			

Existe diferencia significativa entre los tratamientos $p \leq 0.05$. con respecto al tiempo de medición.

Variable	N	R2 ajustado	CV
Tamaño raíz	485	0.38	36.75

Tabla 39 Prueba Tukey al 95% para Tratamiento

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
MS	0.64	163	0.02	A
AC	0.76	163	0.03	B
PL	1.01	186	0.02	C

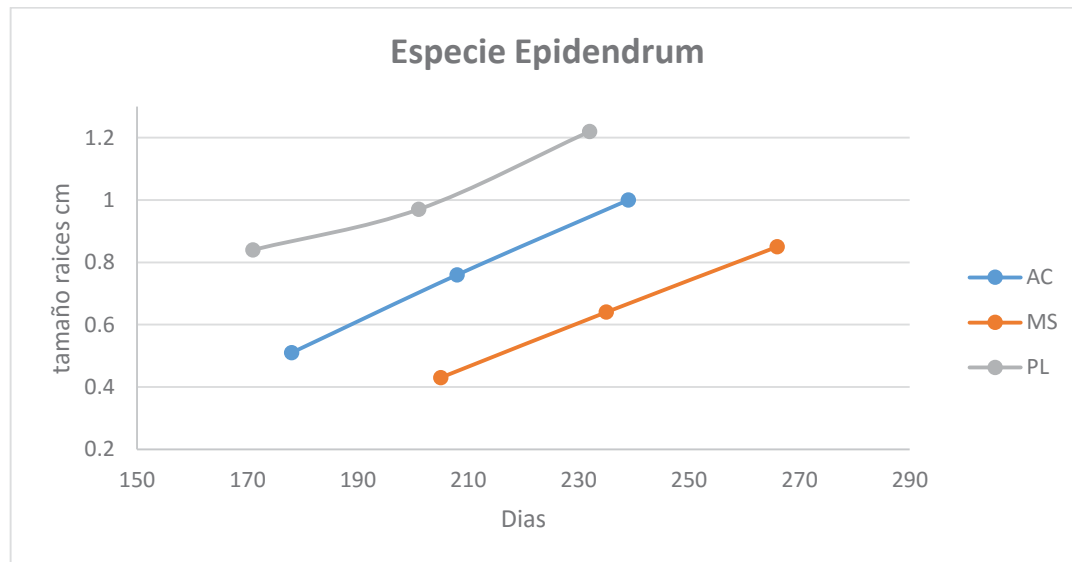
La tabla 39 nos muestra que el tratamiento II(PL) es el de mejor rendimiento siendo este el más idóneo para el tamaño de las raíces, seguido del tratamiento I(AC), resultando con mucha eficacia la adición de suplementos orgánicos.

Tabla 40 Prueba Tukey al 95 % para Tiempo (días) y Tratamiento

Tratamiento	Días	Medias	N	E.E.	Grupos
MS	205	0.43	54	0.04	A
AC	178	0.51	43	0.05	A B
MS	235	0.64	54	0.04	B C
AC	208	0.76	44	0.05	C D
PL	171	0.84	56	0.04	D E
MS	266	0.85	55	0.04	D E
PL	201	0.97	62	0.04	E
AC	239	1	49	0.04	E
PL	232	1.22	68	0.04	F

En la tabla 40 se observa el promedio de las medias de las tres evaluaciones realizadas durante el estudio realizado, siendo el tratamiento II (PL) el de mejor rendimiento, seguido del tratamiento I(AC), en esta especie el tiempo de crecimiento es un factor importante a mayor tiempo mayor tamaño de las raíces, lo que significa que el tiempo es importante el aumento de tamaño de las raíces.

Gráfico 12 Curva de crecimiento según tratamientos.



En el gráfico 12 observamos que los tres tratamientos muestran un crecimiento lineal, siendo el tratamiento II(PL) el de mejor rendimiento durante los tres tiempos de evaluación seguido del tratamiento I(AC) y el testigo, esto nos demuestra que esta especie no es exigente en cuanto a requerimientos nutricionales.

3.2 Porcentaje de supervivencia de plántulas.

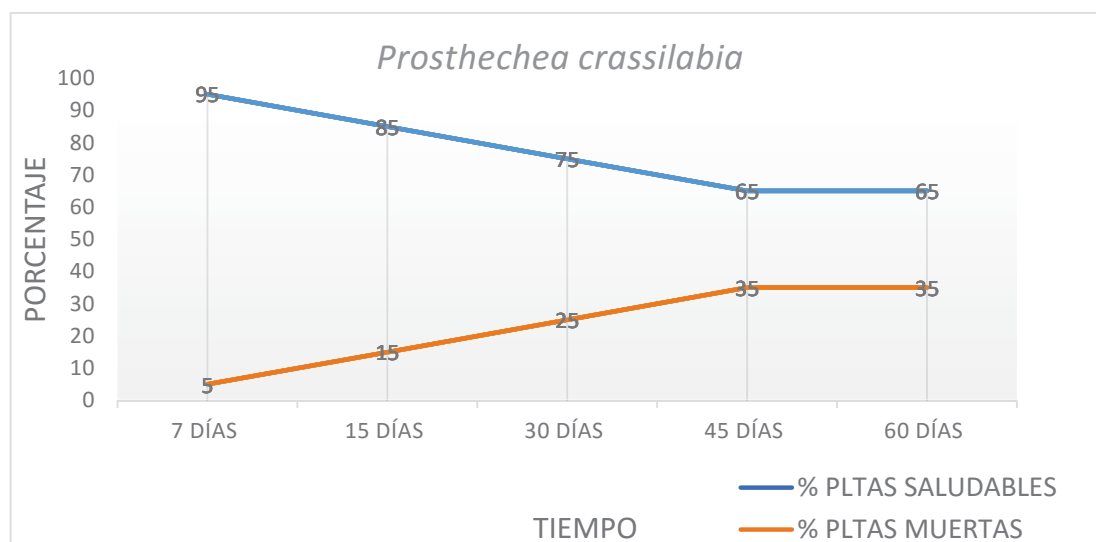
Tabla 41 Porcentajes de supervivencia de *Prosthechea crassilabia*

Tiempo Variable	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
% Plántulas saludables	95	85	75	65	65
% Plántulas muertas	5	15	25	35	35

La tabla N 41 muestra un total de 20 plántulas trasplantadas, en donde a los 7 días se tenía un porcentaje de 95% de plántulas saludables (19 plántulas), murieron 5 % (1 plántula). A los 60

días se obtuvo 65% de plántulas saludables (13 plántulas) que lograron aclimatarse; murieron 35 % (7 plántulas)

Gráfico 13 Supervivencia de *Prosthechea crassilabia*



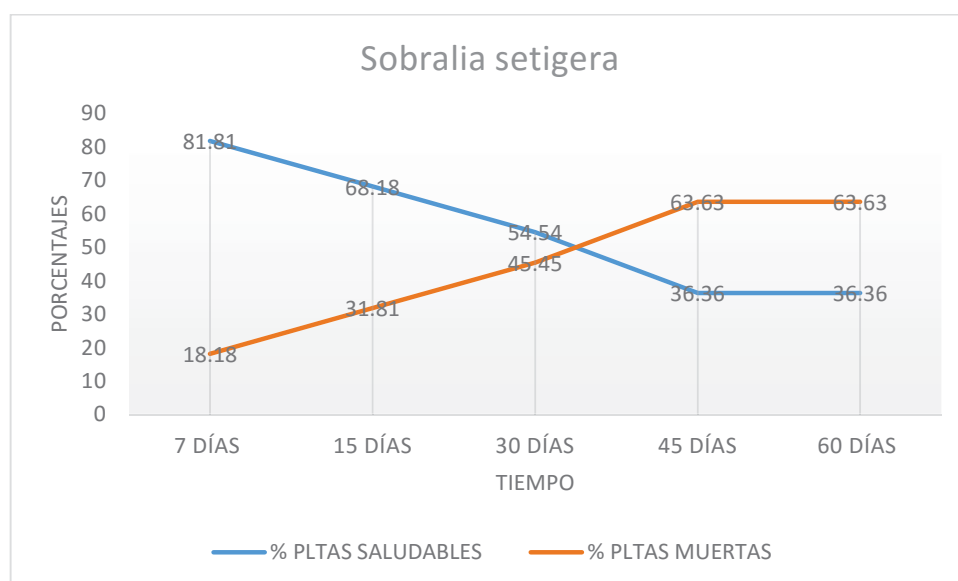
En el gráfico N 13 observamos que aun inicio se tenía un 95% de plántulas saludables y en el transcurso de la aclimatación a partir de los 45 días las plántulas mantienen un estado constante llegando a los 60 días con un 65% de plántulas saludables que representa (13 plántulas).

Tabla 42 Porcentajes de supervivencia de *Sobralia setigera* Poepp & Endl.

Tiempo Variable	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
% Plántulas saludables	81.81	68.18	54.54	36.36	36.36
% Plántulas muertas	18.18	31.81	45.45	63.63	63.63

En la tabla N 42, se observa un total de 22 plántulas trasplantadas, a los 7 días se tenía un 81.81% de plántulas saludables (18 plántulas) murieron 18.18 (4 plántula). A los 60 días se obtuvo 36.36% de plántulas saludables (8 plántulas) que lograron aclimatarse; murieron 63.63% (14 plántulas).

Gráfico 14 Supervivencia de *Sobralia setigera*



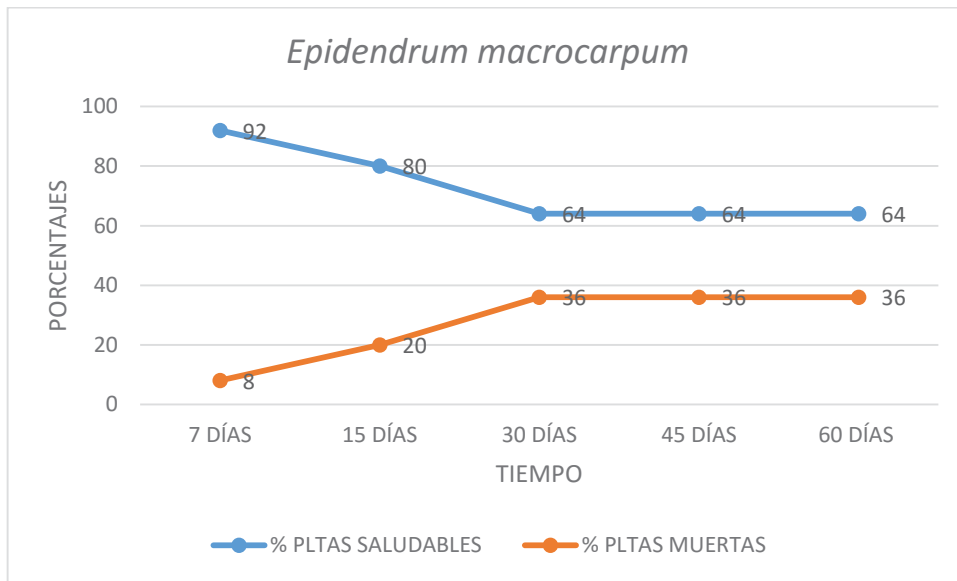
En el gráfico N 14 observamos que aun inicio se tenía un 81.81% de plántulas saludables y en el transcurso de la aclimatación a partir de los 45 días las plántulas mantienen un estado constante llegando a los 60 días con un 36.36% de plántulas saludables que representa (8 plántulas).

Tabla 43 Porcentajes de supervivencia de *Epidendrum macrocarpum* Rich.

Tiempo	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
Variable					
% Plántulas Saludables	92	80	64	64	64
% Plántulas Muertas	8	20	36	36	36

En la tabla N 44, se observa un total de 25 plántulas trasplantadas, a los 7 días se tenía un 92% de plántulas saludables (23 plántulas) murieron 8% (2 plántula). A los 60 días se obtuvo 64% de plántulas saludables (16 plántulas) que lograron aclimatarse; murieron 36% (9 plántulas).

Gráfico 15 Supervivencia de *Epidendrum macrocarpum*



En el gráfico N 15 observamos que aun inicio se tenía un 92% de plántulas saludables y en el transcurso de la aclimatación a partir de los 30 días las plántulas mantienen un estado constante llegando a los 60 días con un 64%.

Discusiones

Arditti (1992) menciona que el rango de germinación en semillas de orquídeas esta entre los 7 y 235 días, en nuestro investigación los rangos de germinación en *Prosthechea* fue de 152 días; en *Sobralia* fue de 156 días; en *Epidendrum* fue de 141 días, esto concuerda con lo mencionado por Arditti.

De la Cruz, (2006) observo en *Prosthechea vitellina* que el proceso de germinación el cambio de fase de rompimiento de testa a protocormo se dio a los 110 días, en medio MS, en la presente investigación se dio a los 62 días en *Prosthechea crassilabia*, esta diferencia se debe a que en esta investigación se usó suplementos orgánicos, que promueven una rápida diferenciación del protocormo.

Sardy & Guzmán, (2007) observaron que el crecimiento de *Epidendrum secundum* se dio a los 240 días, en MS enriquecido con agua de coco 30ml/L y en medio plátano verde 150gr/L; con un desarrollo de 4 hojas y un crecimiento de 1,14cm y 1 raíz. Nuestros resultados superan mencionado por Sardy & Guzmán en *Epidendrum macrocarum* el crecimiento se dio a los 232 días; con 4 hojas y un tamaño de 1,17cm; en el desarrollo de raíces y tamaño se supera a lo mencionado por dichas autoras con 2 raíces y un tamaño de 1.01cm, estas diferencias puede ser a la cantidad de componentes orgánicos usados en el presente trabajo se usó 100g/L de plátano verde y 100ml/L de agua de coco.

Muñoz, (2011) observó en el proceso de germinación de *Epidendrum jameisonic* que la fase de protocormos se dio a los 90 días, utilizando medio de cultivo MS con 100gr/L de plátano verde adicionado 2gr/L de carbón activado, usando capsula maduras, y el tamaño de las hojas alcanzo 2,72 cm en la presente investigación para *Epidendrum macrocarum* se dio a los 51 días, en medio de cultivo MS con 100gr/L de plátano verde adicionado 1gr/L de carbón activado, el tamaño de las hojas fue de 1.17cm, esta diferencia puede deberse a que las distintas orquídeas tienen requerimientos nutricionales distintas y el tiempo que demora en germinar es muy variado.

Padilla, (2008) observó en *Cattleya ssp*, presentan 4 hojas en promedio y 2.58 raíces en promedio, en *Oncidium lancerarum*, presenta 4 hojas en promedio con 2.95 raíces en promedio, en MS enriquecido con 40gr/L de plátano y 1000ml de agua de coco. En la presente investigación *Sobralia setigera*, presenta 3.21 hojas en promedio con 0.59 raíces en promedio y para *Epidendrum macrocarum*, presenta 4.25 hojas en promedio con 2.48 raíces en promedio,

nuestros resultados que más se asemeja es *Oncidium lancerarum* con *Epidendrum macrocarum*, lo que nos demuestra que la adición de complejos orgánicos al medio de cultivo resulta de manera positiva para el desarrollo de órganos vegetativos.

Paredes, (2012) observa que el tiempo de adaptación para la aclimatación de *Epidendrum schistochilum* se dio a los 45 días, con un 93% de supervivencia; y para *Oncidium cultratum* se dio a los 30 días con un 91% de supervivencia, en sustrato de musgo de sphagnum, más corteza de pino fino, con fibra de coco y piedra volcánica, en la presente investigación para *Prosthechea crassilabia* obtuvimos 65% de sobrevivencia, para *Sobralia setigera* obtuvimos 36.3% de sobrevivencia, para *Epidendrum macrocarum* obtuvimos 64% a los 60 días de haber iniciado la aclimatación en sustrato de *sphagnum*, con fibra de coco y cascara de arroz con carbón, nuestros resultados difieren con lo mencionado por Paredes , esto se debe a que cada especie de orquídea tiene diferentes aspectos nutricionales y ambientales.

Conclusiones

- 1) En la germinación de las 3 especies el tratamiento II (PL) es el de mayor rendimiento para *Sobralia setigera* y *Epidendrum macrocarpum*, sin embargo en *Prosthechea crassilabia* los tratamientos I (AC) Y II (PL) resulto de mayor rendimiento; entonces la adición de productos naturales para esta etapa resulto de manera positiva.

En el crecimiento de las plántulas de *Prosthechea crassilabia* el tratamiento I (AC) y II (PL) tuvieron mejor rendimiento para el número de hojas; sin embargo para el tamaño fue el tratamiento I (AC). Para las raíces y tamaño el tratamiento I (AC) resulto de mayor rendimiento. En *Sobralia setigera* el tratamiento de mayor eficacia es el tratamiento II (PL) en hojas y raíces, debemos indicar que esta especie es la que menos desarrollo de raíces presento, podemos concluir que en esta especie la adición de productos orgánicos para la fase de enraizamiento no tuvo resultados positivos. En *Epidendrum macrocarpum* el tratamiento II (PL) obtuvo mayor rendimiento tanto para hojas y raíces.

- 2) En el proceso de aclimatación se obtuvo el mejor porcentaje de supervivencia en *Prosthechea crassilabia* durante los 60 días de evaluación, seguido de *Epidendrum macrocarpum*. La especie *Sobralia setigera* es la que menos porcentaje de supervivencia presento durante este proceso.

Recomendaciones

- 1) Se recomienda promover la prologación masiva de orquídeas que se encuentran en peligro de extinción con la finalidad de seguir con investigaciones y poder conservarlas.
- 2) Se recomienda en el proceso de aclimatación, primero pasen por un pre aclimatación y sea en épocas de lluvias para poder controlar de mejor manera la humedad.
- 3) Se recomienda que la UNSAAC, a partir de su Laboratorio de Biotecnología Vegetal promueva trabajos de investigación en cultivo *in vitro* de orquídeas, así obtener Bancos de Germoplasma para evitar la pérdida de diversidad de orquídeas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acleto, C. (1986). *Algas Marinas del Perú de Importancia Económica*. Lima, Perú: UNMSM.
- ACURIO, Madera, Muñiz, Mariaca, Quispe, Ponce, & Yabarrena. (2006). PROPAGACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Bletia catenulata* Ruiz & Pavon y *Epidendrum secundum* Jacquin y SU CULTIVO EN INVERNADERO. In *REVISTA UNIVERSITARIA N° 139* (EDITORIAL). CUSCO-PERÚ.
- Arditti, J. (1967). *Factors Affecting the Germination of Orchid Seed* (Vol. 33). usa: The Botanical Review.
- Arditti, J. (1978). Clonal propagation of orchids by means of tissue culture a manual. *Reviews and Perspectives*, Vol. 1, pp. 203–293. New York: University Press.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology* (J. Wiley & I. Sons, Eds.). USA.
- Arditti, J. (1993). *Micropropagation of orchids* (J. Wiley & Sons, Eds.). USA.
- Barba, A., Luna, B., & Arredondo, J. (2002). *Orquideología Básica*. <https://doi.org/0083-11-2017DPFESZ-A4>
- Bidwell, R. (2010). *Fisiología vegetal*. <https://doi.org/10.4995/WRS.2010.7744>
- Blas, J. (2015). *Diversidad, Rescate, y Conservación de Orquídeas*. Lima, Perú: Centro de Producción Fondo Editorial, UNMSM.
- Castillo, A. (2007). *Propagación de plantas por cultivo*. Las Brujas -USA.
- Cavero, M., Collantes, B., & Patroni, C. (1991). *Orquídeas del peru* (1° PARTE CDC-LIMA, Ed.). Lima, Perú: Centro de Datos para la Conservación.
- Christenson, E. A. (2003). *Machu Picchu: orquídeas, manual de las orquídeas del Santuario Histórico de Machu Picchu*. Lima, Perú: Fondo Nacional para Areas Naturales Protegidas por el Estado.

Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini. (2007). *Biologia*. [https://doi.org/Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini. \(2007\). Biología Curtis., 857.](https://doi.org/Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini. (2007). Biología Curtis., 857.)

De la Cruz, R. M. (2006). *Micropropagación y adaptación a condiciones ambientales de: Prosthechea vitellina (Lindl.) W. E. Higgins (Orchidaceae)*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Mexico.

Dressler, J. (1981). *The Orchids Natural History and Classification*.
<https://doi.org/10.2307/1219717>

Ernst, R. (1976). Asymbiotic Seed Germination in Orchids: Role o Organic Additives. *International Advance Research Journal in Science*, 3(5).

Gálvez, R. (2005). *DESARROLLO DE PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE Phragmipedium Kovachii Atwood Dalstrom & Fernandez (Orchidaceae) A PARTIR DE SEMILLAS*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN- TARAPOTO-PERÚ.

Hágsater, E., Soto, A., Salazar, G., Jimenéz, R., Dressler, L., & López, A. (2005). *Las Orquideas de Mexico*. Mexico: Acta Botanica Mexicana.

Harrison, C., & Arditti, J. (1978). *Physiological Changes During the Germination of Cattleya aurantiaca (Orchidaceae)*. 139, 180–189. Retrieved from
<https://www.jstor.org/stable/24731>

Hurtado, M., & Manzanares, M. (1987). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Mexico: Editorial Trillas.

Khalifah, R. (1966). Gibberellin-like Substances from the Developing Banana Fruit. *Plant Physiology*, 41(5), 771–773. <https://doi.org/10.1104/pp.41.5.771>

Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic Germination of Orchid Seed. *The University of Chicago Press*, 73, 1–25.

McKendrick, S. (2000). Manual Para La Germinacion in Vitro De Orquideas.

Mejia, R. (1994). *Propagación Comercial- 312 especies de plantas por cultivo in vitro*. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA LIMA-PERU.

- MINAGRI, M. de A. y R.-. (2006). *DECRETO SUPREMO N° 43-2006-AG*.
- MINAM. (2014). *La Estrategia Nacional de Diversidad Biológica al 2021 y su Plan de Acción 2014-2018* (MINAM, Ed.). Lima.
- MINAM. (2015). *GUÍA DE IDENTIFICACIÓN DE ORQUÍDEAS CON MAYOR DEMANDA COMERCIAL*. Lima.
- Muñoz, M. (2011). *EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN “ IN VITRO ” DE LAS ORQUÍDEAS *Cyrtorchilum macranthum* Y *Epidendrum jameisoni* Rchb . F*. Universidad Técnica de Ambato- Ecuador, Facultad de Ingeniería Agronomica.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.231753>
- Ochoa, M. (1998). *VIABILIDAD Y GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE CUATRO ESPECIES DEL GENERO MASDEVALLIA (ORCHIDACEAE) DE LA PROVINCIA DE URUBAMBA*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO.
- Padilla, E. (2008). *EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS DE LAS ESPECIES *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum* EN TARAPOTO*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN- TARAPOTO, FACULTAD DE CIENCIA AGRARIAS.
- Paredes, E. (2012). *DETERMINACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PARA CULTIVO IN VITRO DE LAS ESPECIES *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium cultratum**. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO-ECUADOR.
- Pierick, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid - España: Morata.
- Portilla, J. (2007). *Manual de Cultivo de las Orquídeas*. Ecuador: Ecuagenera Cia.Ltda.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cali- Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- Rodríguez, L., Gonzales, R., Diaz, A., Fajardo, E., Sanchez, E., Hernandez, J., ... Gonzales, J. (2005). *Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas* (pp. 1–14). pp. 1–14. Cuba.
- Ruíz, B. C., Laguna, C. A., Iglesias, A. L. G., Damon, A., Marín, H. T. N. J., Azpíroz, R. H. S., & Moreno, M. J. L. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton*, 77(964), 203–215.
- Sardi, L., & Guzmán, S. (2007). *ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LA TASA DE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS ORQUIDEAS *Epidendrum secundum* y *Oncidium excavatum* A TRAVÉS DE MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES COMBINADOS CON NATURALES*. UNIVERSIDAD DEL AZUAY, FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, CUENCA-ECUADOR.
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2005). *Growing orchids from seed*. Retrieved from <http://shop.kew.org/growing-orchids-from-seed>
- Snow, R. (1986). *Improvements in methods for the germination of orchid seeds*. 54(2), 178–181.
- Staden, J., & Stewart, J. (1975). *Cytokinins in Banana Fruit*. 76(3), 280–283. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/50044-328X\(75\)80024-9](https://doi.org/10.1016/50044-328X(75)80024-9)
- Tapia, M. (2009). *Fundamentos de Producción de Cultivos en Invernaderos*. Retrieved from <https://ucampus.uchile.cl>
- Vasquez, R., & Rojas, R. (2016). *Gymnospermae y Angiospermae del Perú*. Texas- USA.
- Weatherhead, M., Burdon, G., & Henshaw, G. (1978). Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, 89(2), 141–147. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/50044-328X\(78\)80054-3](https://doi.org/10.1016/50044-328X(78)80054-3)
- Yam, J., Van Staden, J., Thompson, D., & Edwards, T. (1990). Charcoal in Orchid Seed Germination and Seedling Culture. *Plant Growth Regulation*, 49(2–3), 269–284.

ANEXOS



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

SERFOR

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año de la Lucha Contra la Corrupción y la Impunidad"

Lima, 11 FEB 2019

CARTA N° 059 -2019-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

Señora
KARINA FLORES HUISA
Investigadora
Av. Túpac Amaru N° 748
San Jerónimo
Cusco.-


Asunto: Remito Resolución de Dirección General N° **048-2019-MINAGRI-SERFOR DGGSPFFS**

Tengo el agrado de dirigirme a usted, para remitirle adjunto copia fechada de la Resolución de Dirección General N° **048-2019-MINAGRI-SERFOR DGGSPFFS**, para su conocimiento y fines, mediante el cual se resuelve, **OTORGAR** la autorización con fines de investigación de flora silvestre, con coesta, con fines de conservación, fuera de Áreas Naturales Protegidas a la señora **KARINA FLORES HUISA**, correspondiéndole el Código de Autorización N° **AUT-IFL-2019-003**.

Es propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi consideración.

Atentamente,




Miriam Mercedes Cerdán Quilliano
Directora General
Dirección General de Gestión Sostenible del
Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre
Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR

C.I.T: 47883-0016

Av. Javier Prado Oeste N° 7440
Jib. Oriental, Magdalena del Mar - Lima 17
T: (511) 225 9001
www.serfor.gob.pe
www.minagri.gob.pe

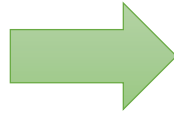
EL PERÚ PRIMERO

Muestras biológicas

Capsulas de *Prostechea crassilabia* Poepp & Endl.



Capsulas de *Sobralia setigera* Poepp & Endl.



Capsula de *Epidendrum macrocarpum* Rich



Preparación de Medios de Cultivo.

Pesando los reactivos



Soluciones stock



Medición de MS



medición de vitaminas



Medición del pH



Distribución de medios de cultivo

Protocolo de Desinfección de *Prostechea crassilabia*



Lavado con detergente



Desinfección con lejía 5%



Desinfección de la capsula dentro de cámara



Proceso de flameado por 3 veces

Introducción in vitro de las semillas



Corte longitudinal a la capsula
medos de cultivo



Dicernir las semillas en los

Protocolo de desinfección de *Sobralia setigera* Poepp & Endl

Lavado con detergente



desinfección con lejía al 5 %



Desinfección dentro de cámara



flameado de la cápsula



corte longitudinal de la semilla



dicernir las semillas

Protocolo de Desinfección de *Epidendrum macrocarpum* Rich.

Lavado de capsulas



Desinfección de capsulas



Desinfección dentro de cámara de flujo laminar



Dicernir las semillas en el medio

Diferentes medios utilizados MS modificados



Murashige & Skoog agua de coco



Murashige & Skoog agua de coco



Murashige & Skoog plátano verde

Desarrollo de *Prostechea crassilabia*





plántulas de *Prosthechea crassilabia*



raíces de *Prosthechea crassilabia*

Desarrollo de *Sobralia setigera*



Plántulas de *Sobralia setigera*



Plántulas de *Sobralia setigera*

Desarrollo de *Epidendrum macrocarpum*



Plántulas de *Epidendrum macrocarpum*



Raíces de *Epidendrum macrocarpum*

Sustratos Para Aclimatación



turba



fibra de coco



cascara de arroz

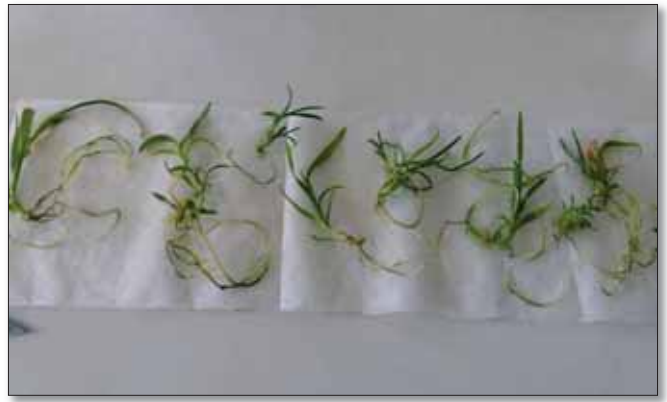


musgo

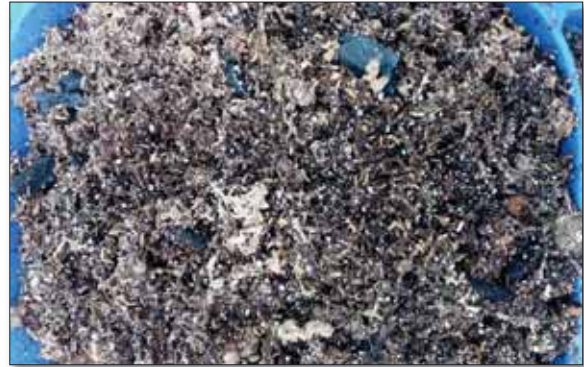
Instalación del invernadero



Preparación de Plántulas para Aclimatar



Preparación de sustrato para Aclimatar



Aclimatación de Plántulas



Desarrollo de nuevas hojitas en aclimatación

