



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL



“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS DE LAS
ESPECIES *Cattleya* spp. Y *Oncidium lanceanum* EN TARAPOTO”

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

ENGELS DARWIN PADILLA GÓMEZ

TARAPOTO - PERÚ

2008

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS DE LAS
ESPECIES *Cattleya* spp. Y *Oncidium lanceanum* EN TARAPOTO”

T E S I S

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

ENGELS DARWIN PADILLA GÓMEZ

TARAPOTO - PERÚ

2008

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

AREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

T E S I S



**“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS DE LAS
ESPECIES *Cattleya* spp. Y *Oncidium lanceanum* EN
TARAPOTO”**

PRESENTADO POR:

ENGELS DARWIN PADILLA GÓMEZ

Miembros del Jurado



Ing. M.Sc. Armando D. Cueva Benavides
Presidente



Ing. Eybis José Flores García
Miembro



Ing. Elías Torres Flores
Miembro



Ing. María E. Ruiz Sánchez
Asesor

DEDICATORIA

Con todo cariño, respeto y amor a mi familia.

A mi madre **EDMITH ISABEL GÓMEZ SANTILLAN** por el impulso que me brinda en todo momento para salir adelante en mi futuro profesional.

A **LEYLITH, ROSÁLIA Y HEGEL**, mis hermanos, compañeros y grandes amigos desde mi niñez.

A mis queridos **ABUELOS, TIOS y PRIMOS**, Que siempre me brindan su apoyo moral en todo momento.

DEDICATORIA ESPECIAL

Este esfuerzo constituye para mí la voluntad de superación, de humildad y ejemplo digno...

Por eso se lo dedico a mis queridas tías **MARIA LUISA MADUELL Y MARICARMEN FIGUEROA Y TODOS LOS MIEMBROS DE LOS MISIONEROS DE JESÚS** por sus enseñanzas que me brindan en todo momento y las ganas de superación que me inculca siempre a seguir para ser una persona de bien y dirigirme por el camino de la responsabilidad y del trabajo.

DEDICATORIA ESPECIAL

Un agradecimiento al **DOCTOR CARLOS NOLTE CAMPOS Y AL INGENIERO AGUSTÍN CERNA MENDOZA** por brindarme sus enseñanzas sobre la vida profesional que ahora comienzo y las oportunidades que no debo desaprovechar durante mi vida como profesional.

AGRADECIMIENTO

A la **Ing. María Emilia Ruiz Sánchez**, por su apoyo incondicional como asesora de la presente tesis.

Mi agradecimiento especial al **Biólogo Marco León Martínez**, por las enseñanzas que me brindó durante la realización de mi tesis.

Al **Ing. Henri Delgado Haya**, por las enseñanzas y el tiempo que ocupó en impartirme parte de su conocimiento en la realización de mi trabajo de tesis.

A mis compañeros tesisistas del laboratorio, **Juan Carlos Guerrero Abad** y **Henry Manuel Vera Tudela Ramírez**, por todo el apoyo brindado en todo momento durante la tesis en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos vegetales.

A todos los docentes de la FCA – UNSM – T, a quienes considero como pilares para mi formación en mi formación profesional.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	01
II. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General.	02
2.2 Objetivos Específicos.	02
III. REVISIÓN DE LITERATURA	
3.1. Aspectos Históricos del Cultivo de orquídeas.	03
3.2. Propagación <i>in Vitro</i> de orquídeas.	06
3.2.1. Propagación por semillas.	06
a. Por semillas provenientes de cápsula dehiscente.	06
b. Por semillas provenientes de cápsula no dehiscente (Cápsula verde).	07
3.3. Medios de cultivo.	07
3.4. Sustancias orgánicas complejas usadas en la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas.	08
3.5. Carbón activado.	09
3.6. Experiencias en cultivo <i>In Vitro</i> de orquídeas con medios de cultivo casero.	11
3.6.1 Medios de cultivo para siembra de semillas y meristemas.	11
3.6.2 Receta de un medio de cultivo para cultivar semillas.	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Ubicación de los experimentos.	13
4.2 Materiales	14
4.3 Metodología.	16

4.3.1. Proceso de la propagación <i>in Vitro</i> de orquídeas.	16
a. Preparación y desinfección de cápsula indehiscente (Cerrada).	16
a.1. Preparación de los materiales.	16
a.2. Trabajo en cámara de flujo laminar.	17
a.3. Proceso de siembra.	18
b. Multiplicación de protocormos.	19
4.4 Diseño experimental.	20
4.5 Tratamientos en estudio.	20
4.5.1 Medios de Cultivo.	21
a. Medios de cultivo para germinación.	21
b. Medios de cultivo para desarrollo y enraizamiento.	24
4.5.2 Procedimiento para la preparación del medio de cultivo.	26
4.5.3 Especies.	29
4.5.4 Análisis de Varianza.	29
4.5.5 Modelo matemático.	30
4.6 Evaluaciones realizadas.	30
4.6.1. Establecimiento de las semillas.	30
a. Viabilidad.	30
b. Contaminación.	31
c. Porcentaje de Germinación.	31
d. Rompimiento de testa.	31
e. Vitrificación.	32
f. Fenolización.	32
4.6.2. Etapa de Desarrollo y Enraizamiento.	32

a. Número de hojas.	32
b. Altura de plántulas.	33
c. Número de raíces.	33
4.63. Análisis de costos.	33
V. RESULTADOS	
5.1 Establecimiento de semillas.	37
5.2 Multiplicación de protocormos.	38
5.3 Evaluación del establecimiento de las semillas.	39
5.4 Evaluaciones en la etapa de desarrollo y enraizamiento de plántulas.	50
VI. DISCUSIÓN	58
VII. CONCLUSIONES	74
VIII. RECOMENDACIONES	76
IX. RESUMEN	78
X. SUMMARY	80
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	81
XII. ANEXOS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

N°	Págs.
1. Materiales e insumos para un medio de cultivo casero.	11
2. Obtención de semillas de cápsulas verdes.	17
3. Esterilización.	18
4. Siembra.	18
5. Dispersión.	18
6. Tapado.	18
7. Esterilización.	19
8. Sellado.	19
9. Transferencia de protocormos para su multiplicación.	20
10. Filtrado de agua de coco.	28
11. Preparación del homogenizado de plátano.	28
12. Medición del pH.	28
13. Esterilización del medio de cultivo.	28
14. Enfriado del medio de cultivo.	29
15. Rompimiento de testa visto a : 10 X (T ₀).	38
16. Rompimiento de testa visto a : 10 X (T ₁).	38
17. Rompimiento de testa visto a : 10 X (T ₂).	38
18. Rompimiento de testa visto a : 10 X (T ₃).	38
19. Rompimiento de testa visto a : 10 X (T ₄).	38
20. Rompimiento de testa visto a simple vista.	38
21. Protocormos a (10X).	39
22. Diferenciación.	39
23. plántulas en desarrollo de <i>Cattleya maxima</i> T ₃ .	50
24. plántulas en desarrollo de <i>Oncidium lanceanum</i> T ₄ .	50
25. plántulas en desarrollo de <i>Cattleya maxima</i> T ₄ .	51
26. plántulas en desarrollo de <i>Oncidium lanceanum</i> T ₀ .	51
27. plántulas en desarrollo de <i>Cattleya maxima</i> T ₀ .	51
28. plántulas en desarrollo de <i>Oncidium lanceanum</i> T ₃ .	51

ÍNDICE DE CUADROS

N°		Págs.
1	Tratamientos en estudio	20
2	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₀ para germinación.	22
3	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₁ para germinación.	22
4	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₂ para germinación.	23
5	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₃ para germinación.	23
6	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₄ para germinación.	23
7	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₀ para la fase de enraizamiento y desarrollo.	24
8	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₁ para la fase de enraizamiento y desarrollo.	25
9	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₂ para la fase de enraizamiento y desarrollo.	25
10	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₃ para la fase de enraizamiento y desarrollo.	26
11	Componentes y dosis del medio de cultivo T ₄ para la fase de enraizamiento y desarrollo.	26
12	Análisis de varianza del experimento en la fase I y II.	30
13	Costos de 1 litro de medio de cultivo M&S (T ₀).	34
14	Costos de 1 litro de medio de cultivo T ₁ .	34
15	Costos de 1 litro de medio de cultivo T ₂ .	35
16	Costos de 1 litro de medio de cultivo T ₃ .	35
17	Costos de 1 litro de medio de cultivo T ₄ .	36
18	Viabilidad de las semillas de <i>Cattleya</i> spp, expresado en porcentajes antes de la siembra.	39
19	Viabilidad de las semillas de <i>Oncidium lanceanum</i> , expresado en porcentajes antes de la siembra.	40
20	Número de botellas con <i>Cattleya</i> spp. contaminadas en medio de cultivo (Germinación), primer momento de siembra: 07/08/07; después de 2 semanas.	41

21	Número de botellas con <i>Oncidium lanceanum</i> contaminadas en medio de cultivo (Germinación), segundo momento de siembra: 09/08/07; después de 2 semanas.	42
22	Análisis de Varianza para el porcentaje de germinación de semillas de <i>Cattleya</i> spp. en un medio de germinación a 30 días de la siembra.	42
23	Análisis de Varianza para el porcentaje de germinación de semillas de <i>Oncidium lanceanum</i> en un medio de germinación a 30 días de la siembra.	43
24	Velocidad de rompimiento de testa de semillas de <i>Cattleya</i> spp., en un medio de germinación durante 4 evaluaciones expresado en cantidad.	44
25	Velocidad de rompimiento de testa de semillas de <i>Oncidium lanceanum</i> , en un medio de germinación durante 4 evaluaciones expresadas en cantidad.	45
26	Cuadro de observación del número de protocormos verdes y vitrificados de <i>Cattleya</i> spp. a los 75 días después de la siembra.	46
27	Cuadro de observación del número de protocormos verdes y vitrificados de <i>Oncidium lanceanum</i> a los 75 días después de la siembra.	47
28	Cuadro de observación del número de protocormos vivos y fenolizados de <i>Cattleya</i> spp. a los 90 días después de la siembra.	48
29	Cuadro de observación del número de protocormos vivos y fenolizados de <i>Oncidium lanceanum</i> a los 90 días después de la siembra.	49
30	Análisis de varianza para determinar el número de hojas de <i>Cattleya maxima</i> en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.	51
31	Análisis de varianza para determinar el número de hojas de <i>Oncidium lanceanum</i> en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.	52
32	Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas en mm de <i>Cattleya maxima</i> en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.	53

- 33 Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas en mm de *Oncidium lanceanum* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra. 54
- 34 Análisis de varianza para determinar el número de raíces de *Cattleya maxima* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra. 55
- 35 Análisis de varianza para determinar el número de raíces de *Oncidium lanceanum* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra. 56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

N°	Págs.
1. Viabilidad de las semillas <i>Cattleya</i> spp.	40
2. Viabilidad de las semillas de <i>Oncidium lanceanum</i> .	41
3. Siembra 1 y siembra 2.	42
4. Prueba de DUNCAN al 0.01% para el porcentaje de germinación de semillas de <i>Cattleya</i> spp. en un medio de germinación a 30 días de la siembra.	43
5. Prueba de DUNCAN al 0.01% para el porcentaje de germinación de semillas de <i>Oncidium lanceanum</i> en un medio de germinación a 30 días de la siembra.	44
6. Velocidad de rompimiento de testa en <i>Cattleya</i> spp.	45
7. Velocidad de rompimiento de testa en <i>Oncidium lanceanum</i> .	46
8. Protocormos vivos y vitrificados en <i>Cattleya</i> spp.	47
9. Protocormos vivos y vitrificados en <i>Oncidium lanceanum</i> .	48
10. Protocormos vivos y fenolizados (marrón) en <i>Cattleya</i> spp.	49
11. Protocormos vivos y fenolizados (marrón) en <i>Oncidium lanceanum</i> .	50
12. Prueba de Duncan para determinar el número de hojas de <i>Cattleya maxima</i> a 24 semanas después de la siembra.	52
13. Prueba de Duncan para determinar el número de hojas de <i>Oncidium lanceanum</i> a 24 semanas después de la siembra.	53
14. Prueba de Duncan al 0.01% para determinar la altura de plántulas en mm de <i>Cattleya maxima</i> a 24 semanas después de la siembra.	54
15. Prueba de Duncan al 0.01% para determinar la altura de plántulas en mm de <i>Oncidium lanceanum</i> a 24 semanas después de la siembra.	55
16. Prueba de Duncan para determinar el número de raíces de <i>Cattleya maxima</i> a 24 semanas después de la siembra.	56
17. Prueba de Duncan para determinar el número de raíces de <i>Oncidium lanceanum</i> a 24 semanas después de la siembra.	57

I. INTRODUCCIÓN



La gran mayoría de especies de orquídeas que se comercializan en nuestro país, son producto de recolecciones ilegales e indiscriminadas de nuestros bosques tropicales. Consecuentemente la tala del bosque, junto a la recolección no controlada con fines comerciales, viene produciendo una rápida disminución de las poblaciones naturales de orquídeas, algunas de las cuales se encuentran en peligro de desaparecer. Es el caso de *Cattleya rex* O'brien en el departamento de San Martín. Cientos de plantas de esta especie recolectadas anualmente son comercializadas en Lima, gran parte son exportadas, o donde generalmente mueren. **LEÓN (1995)**.

Nuestras especies nativas de orquídeas, amenazadas o en peligro de desaparecer, pueden protegerse utilizando las técnicas de propagación masiva in Vitro, siempre y cuando se asegure su reproducción en cantidades adecuadas (**OSPINA, 1968**).

Las orquídeas producidas in Vitro a escala comercial podrían distribuirse a los viveros comerciales, disminuyendo la dependencia de éstos por obtener orquídeas extraídas de su hábitat original. Sin embargo la composición del medio nutritivo para esta técnica es compleja y con costos relativamente altos, es por ello que con el presente trabajo de investigación se determinó un medio de cultivo de bajo costo y eficiente para la germinación, desarrollo y enraizamiento de plántulas de orquídeas de las especies *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*, utilizando insumos disponibles localmente.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Determinar los medios de cultivo alternativos, de bajo costo, utilizando insumos disponibles localmente, para la germinación y crecimiento in Vitro de orquídeas con fines de producción comercial.

2.2. Objetivos específicos.

2.2.1 Evaluar el efecto de la composición mineral y de suplementos orgánicos complejos, de diferentes medios de cultivo, en la germinación, desarrollo y enraizamiento in vitro de *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*.

2.2.2 Determinar el análisis de costos de producción de los medios de cultivo en estudio.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Aspectos históricos del cultivo de orquídeas.

Los primeros intentos de germinación de semillas de orquídeas fueron realizadas en Europa por Moore (1849) al sembrarlas en compost o sustratos que habían sido utilizados para cultivar plantas adultas, práctica que fue adoptada por los cultivadores comerciales de su época, **ARDITTI (1984)**.

Posteriormente Noel Bernard realizó una serie de experimentos que le permitieron explicar el rol del hongo micorrízico en la germinación de semillas de orquídeas (**BERNARD 1909**), demostrando la importancia de esta asociación simbiótica y germinando exitosamente distintas especies e híbridos de orquídeas terrestres y epífitas. Otros investigadores continuaron su trabajo. **ARDITTI (1990)**.

Went y Thimann en 1937, mencionado en **ARDITTI 1990**, descubren la auxina Ácido indol Acético. Hormona reguladora de crecimiento que estimula el desarrollo de raíces.

CAPLIN Y STEWARD (1948), mencionado en **ARDITTI (1990)**, determinan que el endosperma líquido de coco tiene un efecto en la formación de células aisladas de raíces de zanahoria.

SKOOG y MILLER (1957), citado en **ARDITTI (1990)**, combinan auxinas y citoquininas, controlando la formación de brotes y raíces,

MURASHIGE y SKOOG (1962), mencionado en **ARDITTI (1990)**, logran desarrollar el medio nutritivo que actualmente es el más utilizado para la propagación in vitro de muchas de las especies de orquídeas.

Las semillas de orquídeas constan de una testa gruesa, que encierra un embrión. La cual tiene aspecto característico en forma de red y diferente para cada especie. La testa está formada por un tejido muerto, compuesto en un 96% de aire, de tal forma que cada semilla puede ser considerada como un auténtico globo, **PIERIK (1989)**.

SINGH (1981), citado en **LEÓN (1995)**, demostró que el 2, 3, 5 trifenil – tetrazolium es útil para determinar la viabilidad de las semillas, donde los embriones viables se tiñen de rojo, mientras que los no viables quedan blancos.

Los protocormos deben ser transferidos antes que induzcan hiperhidricidad o fenolizar y luego mueran, **DELGADO (2001)**.

A pesar del descubrimiento del medio de cultivo **KNUDSON**, se comprobó que no siempre es posible hacer un medio en el que una determinada especie de orquídea pueda germinar y desarrollarse; se han descrito muchos medios nutritivos para muchos géneros y especies diferentes, **ARDITTI (1982)**.

ARDITTI (1984); **PIERIK, et al, (1988)**, mencionado en **ESPINOZA (2001)**, las orquídeas germinan asimbióticamente después de la inhibición formando un pequeño cuerpo esférico denominado protocormo, a partir de cuya base surgen rizoides y a continuación primordios de raíces y hojas, todo lo cual permite distinguir etapas bien definidas que se usan en el cálculo de índices de crecimiento.

Algunas especies de orquídeas pueden germinar de 4 a 8 semanas después de su siembra, y la multiplicación se efectúa dentro de las 12 a 16 semanas,

empleando el medio de micropropagación que sirve para multiplicar todas las especies con éxito, **DONAYRE (2000)**.

Un medio de cultivo con sales M&S, suplementadas con vitaminas, azúcar, ANA y BAP, permite una rápida germinación de las semillas y un crecimiento de las plántulas, dado que se desarrollan bien las hojas y forman raíces, **SELENA (1999)**.

El medio de cultivo utilizado en la fase de multiplicación para el cultivo de plantas ornamentales fue el M&S (1962) aumentado la concentración de BAP a 2 mg/l y ANA 0,3 mg/l, **ACEVES (2000)**.

Para la fase de enraizamiento en el cultivo de plantas ornamentales, se utiliza las mismas sales M&S en el medio de cultivo, omitiéndose la citoquinina (BAP). Complementado con 1,5 g/l de carbón activado, 20 g/l de sacarosa y agregando la auxina (ANA), las condiciones de incubación fueron las mismas que para las etapas anteriores, **ACEVES (2000)**.

LEÓN (1995), La utilización de sustancias orgánicas complejas como el plátano homogeneizado (100 g/l) y endosperma líquido de coco (100 ml/l), en la composición de los medios, promueven una rápida diferenciación del protocormo y el desarrollo vegetativo y radicular de las plántulas de *Cattleya rex* O'brien, *Cattleya maxima* Lindley y *Psychopsis versteegianum* (Pulle) Lueckel & Braem. De igual manera menciona que el medio de cultivo M&S, modificado es el adecuado para la propagación in Vitro de las especies mencionadas.

MAURO M. & ARDITTI (1994), citado en **ESPINOZA (2001)**, probaron la influencia de diferentes dosis de benzilaminopurina (BAP) y ácido naftalenoacético (ANA), en el medio de cultivo Murashige y Skoog (M&S) en *Cattleya* sp., ellos sugirieron que para la multiplicación se debe utilizar el medio suplementado con la combinación de 10mg/l de BAP y 0,1 mg/l de ANA, y para el desarrollo de plántulas con el incremento de hojas y raíz, se utiliza el medio suplementado con 10mg/l de ANA.

ARDITTI Y ERNST (1993), mencionado en **ESPINOZA (2001)** varios aditivos se han usado en el cultivo *in Vitro*, tal es el caso del endosperma líquido de coco, la cual posee una gran cantidad de componentes, entre ellos encontramos algunas fitohormonas con diferentes concentraciones como: auxinas, citocininas y giberelinas y, se ha usado rutinariamente en un sinnúmero de métodos de propagación.

3.2. Propagación *In Vitro* de orquídeas.

ARDITTI (1990) las técnicas de propagación de orquídeas pueden ser de dos tipos:

3.2.1. Propagación por semillas.

a. Por semillas provenientes de cápsula dehiscente.

Se utiliza semillas de cápsulas dehiscentes, las semillas son esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio en concentraciones de 0,5 a 1,0% por 10 – 30 minutos, dependiendo del tipo de semilla, para favorecer su esterilización es conveniente usar un agente que rompa la tensión superficial de la solución esterilizante

(Tween 20), es un agente que permite el mejor contacto del esterilizante con la semilla, se utiliza a razón de 2 gotas/100 ml o reemplazado por detergente casero, como Hipoclorito de calcio y sodio.

b. Por semillas provenientes de cápsula no dehiscente (cápsula verde).

La cápsula es separada de la planta madre, se eliminan las partes que no serán necesarias 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 calcio al 2 - 4% por 20 minutos.

La siembra se hace directamente sin necesidad de enjuague, para abrir la cápsula se hacen dos cortes longitudinales a lo largo de la sutura de dehiscencia y dos cortes transversales se retiran el pedazo de cápsula seleccionado y se procede a la siembra.

3.3. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados tienen diversas composiciones y se emplean como líquido o geles (ROCA y MROGINSKI, 1991). Los constituyentes básicos incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta, macro y micro nutrientes; un azúcar (usualmente sacarosa, sucrosa o glucosa); vitaminas como la tiamina, glicina entre otros; sustancias reguladoras

del crecimiento; y otros compuestos. Entre estas juegan un papel esencial las auxinas y las citoquininas cuyas proporciones relativas favorecen el desarrollo del tallo y el de la raíz, citado en **RUÍZ (2003)**.

Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de la planta en diversas especies vegetales, citado en **RUÍZ (2003)**.

3.4. Sustancias orgánicas complejas 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**).

Los más frecuentemente usados son el endosperma líquido de coco, el jugo de tomate y el fruto del plátano. **STEWART AND SIMMONDS (1954)** reportaron que las capas formativas del fruto del plátano poseen sustancias que estimulan la división en células de zanahoria; con solo esta evidencia disponible, **KHALIFAH (1966 b)** llegó a la conclusión de que estas sustancias responsables de la división celular eran las citoquininas.

Encontraron que el fruto del plátano contiene pequeñas cantidades de compuestos inductores de la división celular [zeatina, zeatin-ribosido y 6-(Δ^2 -isopentilamino) purina] pero que comparados con el endosperma líquido del

coco su actividad era extremadamente baja: 20 ml. de este aditivo daban una respuesta similar a 500 g de plátano. Sin embargo, existen evidencias de que el efecto del plátano sobre el desarrollo de las orquídeas puede deberse a la presencia de otros compuestos distintos a las citoquininas, pues se ha reportado la presencia de compuestos afines a giberelinas y auxinas en el mismo (KHALIFAH, 1966a, 1966b).

VALMAYOR (1972), reportó que el endosperma líquido del coco solamente permite una pobre diferenciación en protocormos de *Dendrobium*, *Vanda* y *Cattleya*, mientras que su combinación con extractos de plátano resulta en un buen desarrollo de raíces y tallos.

3.5. Carbón activado.

El carbón activado utilizado en cultivo 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 et. al., 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, el pH, y la composición química de la sustancia adsorbida, siendo mayormente adsorbidos los compuestos moderadamente polares y poco solubles, como fenoles, fito – hormonas y vitaminas, en comparación con los muy polares o los

apolares: azúcares, sorbitol, manitol, inositol, etc. que no son adsorbidos (WEATHERHEAD et. al., 1979).

Las sales inorgánicas muy disociadas no son adsorbidas por el carbón activado, pero si lo son los de muy baja solubilidad como cationes di- o poli – valentes. Es por ello en estos casos importante el uso de agentes quelantes (EDTA) que incrementan la solubilidad de los mismos (YAM et. al., 1990).

Varios mecanismos se han propuesto para explicar el efecto benéfico del carbón activado en el cultivo de orquídeas (WEATHERHEAD et. al., 1978). En primer lugar la contribución de minerales en forma de impurezas estaría enriqueciendo el medio de cultivo. Segundo, la capacidad para adsorber metabolitos fitotóxicos que estarían siendo liberados al medio de cultivo por los tejidos (fenoles y sus oxidados, hidroxiquinonas, ácido para – hidro – benzoico). Tercero la adsorción de sustancias producidas durante la esterilización en el medio de cultivo, como 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.

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 2 g/l.

3.6. Experiencias en cultivo In Vitro de orquídeas con medios de cultivo casero.

3.6.1 Medios de cultivo para la siembra de semillas y meristemas.

MACHADO (2003), menciona que para un laboratorio casero, se puede preparar medios de cultivo con componentes de fácil adquisición y baratos. Estos medios son tan eficientes y en algunos casos hasta mejores que los medios usados tradicionalmente en el cultivo in Vitro de orquídeas. Los componentes para la preparación del medio de cultivo casero se pueden adquirir en cualquier feria libre o mercado de productos de primera necesidad, la preparación del medio es tan fácil que quien sabe preparar una vitamina para consumo personal, sabrá también con seguridad hacer un excelente medio para reproducir orquídeas.



Fuente: MACHADO (2003)

3.6.2 Receta de un medio de cultivo para cultivar semillas.

MACHADO (2003), recomienda que todos los componentes a usarse en la preparación de un medio de cultivo debe ser orgánico sin agroquímicos, estos son:

1. Plátano seda semi maduro sin cáscara (mitad) aproximadamente 50 g.
2. Papaya (una cuchara de sopa bien llena) aproximadamente 50 g.
3. Tomate cereza (cinco pequeños tomates) aproximadamente 50 g.
4. Agua de coco verde (1 vaso) aproximadamente 120 ml.
5. Azúcar (una cuchara de sopa) aproximadamente 20 g.
6. Agar – agar (una cuchara de sopa) aproximadamente 10 g.
7. Polvo de carbón (una cuchara de te) aproximadamente 01 g.
8. Agua destilada completar para un litro.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación de los experimentos.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales (LCTV) de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, Facultad de Ciencias Agrarias, situado en la Ciudad Universitaria, cuya ubicación política y geográfica se menciona a continuación:

4.1.1 Ubicación Política

Lugar : Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la
Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.
Distrito : Morales
Provincia : San Martín
Departamento : San Martín

4.1.2 Ubicación Geográfica

Longitud Oeste : 76° 22' 48.4"
Latitud Sur : 06° 29' 13.2"
Altitud : 278 m.s.n.m.
Clima : Bosque seco - Tropical (bs – T). Holdridge 1978

4.1.3 Financiamiento.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el marco del proyecto **“Desarrollo de tecnologías de bajo costo para la propagación in Vitro y el cultivo de orquídeas en la Región San Martín”**, financiado por FDSE – INCAGRO, en convenio con la UNSM – T y el Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales – INIBICO.

4.2. Materiales.

4.2.1 De laboratorio.

- Botellas de vidrio de 18 X 6 cm. (Khisky Jonnie Walker).
- Pipetas DIN/B de 10 y 5 ml.
- Erlenmeyer pirex de 500, 250 y 125 ml.
- Vaso de precipitado kimax de 500 y 1000 ml
- Placas petri pirex de 100 x 15 mm y 150 x 25 mm
- Mechero para alcohol.
- Pinzas de acero inox stainless punta roma de 143,0 y 200,0 mm de longitud.
- Espátula de bronce de 293,0 mm de longitud
- Mango para hoja de bisturí N° 10, 11 de acero inox stainless de 165 mm de longitud.
- Hojas de bisturí KIP N° 10, 11 descartables.
- Papel aluminio. De 8 x 8 Cm.
- Complejo B.
- Endospermo líquido de coco.
- Azúcar blanca.
- Plátano seda.
- Carbón vegetal molido.
- Algodón.
- Agua destilada estéril.
- Lejía comercial CLOROX al 5,25% de NaOCl.
- Alcohol etílico de 96°

4.2.2 Equipos



- Autoclave vertical sercal de 40 l de capacidad.
- Agitador magnético con calentamiento (CAT HOTPLATE STIRRER M6 de 1600 rev/min y 300°C).
- Estereomicroscopio nikon SMZ645 (0,8X - 5X).
- Potenciómetro schot.
- Cámara de flujo laminar horizontal.
- Destilador de agua sercal de 4 l/hora.
- Refrigerador LG icebeam door cooling, -20°C.
- Aire acondicionado LG tipo ventana de 24000 BTU.
- Licuadora práctica.
- Balanza analítica ADAM EQUIPMENT.
- Termómetro de máxima-mínima Stortz MMT-15/17.
- Cámara digital nikon coolpix 4300 de 4.0 megapixels.
- Adaptador de cámara para estereomicroscopio nikon coolpix MDC2 Lens.

4.2.3 Reactivos

- Nitrato de amonio (NH_4NO_3).
- Nitrato de potasio (KNO_3).
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4).
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- Ioduro de potasio (KI).
- Sulfato de manganeso heptahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Acido bórico (H_3BO_3).

- Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).
- Molibdato de sodio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$).
- Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).
- Cloruro de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$).
- Ácido etilendiaminotetracético dihidratado ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$).
- Sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$).
- Ácido clorhídrico (35%) de pureza.
- Ácido nicotínico.
- Tiamina – HCl.
- Sucrosa.
- Carbón activado.
- Agar – agar SIGMA.
- Pastillas buffer pH= 4,0; pH= 7,0

4.3. Metodología.

4.3.1. Proceso de la propagación in Vitro de orquídeas.

a. Preparación y desinfección de la cápsula indehisciente (cerrada).

a.1. Preparación de los materiales.

- ✓ Para la desinfección de las cápsulas se preparó una solución desinfectante al 1,0 % de Hipoclorito de sodio (NaOCl) en un frasco de vidrio de 15 onzas. Se sumergió las cápsulas en la solución desinfectante por un intermedio de 20 minutos.
- ✓ La siembra se realizó con la ayuda de un bisturí para aperturar la cápsula cerrada, realizando tres cortes longitudinales, se extrajo las semillas y se colocó en un

erlenmeyer de 125 ml con 75 ml de agua destilada estéril y con la espátula estéril se procedió a homogenizar, con el mismo proceso propuesto por **LEÓN (1995)**.

- ✓ Antes de la siembra, se extrajo una muestra de la suspensión para ser observado en el microscopio óptico (mayor aumento 100X), siguiendo el proceso propuesto por **DONAYRE (1996)**, pero existe otro método más confiable para determinar la viabilidad (método del 2, 3, 5, trifenil – tetrazolium), como lo menciona **LEÓN (1995)**.

a.2. Trabajo en la cámara de flujo laminar.

En la cámara de flujo laminar se procedió a abrir la cápsula haciendo tres cortes a la misma con la ayuda de una hoja de bisturí número 10 y de esta manera se obtuvo las semillas y se colocó en un principio en una placa petri estéril para luego introducirlos en un erlenmeyer de 125 ml contenida con 75 ml de agua destilada estéril para así obtener la suspensión de las semillas, tal como muestra la figura N° 2.



Figura N° 2: Obtención de semillas de capsula verde

a.3. Proceso de siembra.

Después de haber obtenido la suspensión, se realizó la siembra, utilizando una espátula tipo cuchara estéril y desinfectada para evitar contaminaciones, con el cual se tomó una pequeña cantidad de la suspensión (una cucharada) y se colocó en las botellas de vidrio de 18 x 6 cm. que contenían los diferentes medios de cultivo (tratamientos puestos en estudio), posteriormente se colocó la tapa de algodón y luego se selló con papel aluminio y plástico, tal como muestran en las figuras N° 3, 4, 5, 6, 7, y 8, anotándose después los datos de siembra, para su posterior ubicación en la cámara (cuarto) de incubación a una temperatura de 21 – 25° C, con una humedad relativa de 60%.





b. Multiplicación de protocormos.

En su segunda etapa de propagación *in Vitro* (multiplicación) se continuó con los mismos tratamientos sin adicionar ningún otro componente a los mismos, para así poder determinar la eficiencia de los medios de cultivo propuestos.

Con la ayuda de una espátula en forma de cuchara con mango delgado se procedió a extraer los protocormos de las botellas de vidrio de 18 x 6 cm. y se los colocó en una placa petri estéril, para luego ser introducidos en otra botella con medio de cultivo nuevo, para su multiplicación, tal como se muestra en la figura N° 9.

El procedimiento para esta labor fue el mismo que para la siembra de semillas, al igual que en la primera etapa (siembra), las botellas de vidrio de 18 x 6 cm., contenidas con 100 ml de medio de cultivo y los protocormos transferidos para sus desarrollo fueron etiquetadas y llevadas a la cámara (cuarto) de incubación a una temperatura de 21 – 25° C, con una humedad relativa de 60%.



Figura N° 9: Transferencia de protocormos para su multiilicación.

4.4. Diseño Experimental.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco (5) tratamientos y diez (10) repeticiones, donde se estudió cinco (5) tipos de medios de cultivo para la fase de germinación y desarrollo. Los ensayos fueron repetidos tres veces.

4.5. Tratamientos en estudio.

Los tratamientos en estudio para el presente trabajo se investigación lo muestra el cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Tratamientos en estudio.

COMPOSICIÓN	TRATAMIENTOS				
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Minerales	1/2 MS	Fertilizantes	Coco desproteinizado	Fertilizante	Fertilizante
Fuente de carbono	Sucrosa	Azúcar	Azúcar	Azúcar	Azúcar
Vitaminas (Tiamina)	Tiamina/Ac. Nicotínico	Complejo B	Complejo B	Complejo B	Complejo B
Solidificantes	Agar	Agar	Agar	Agar	Agar
Carbón	Carbón Activo	Carbón Vegetal	Carbón Vegetal	Carbón Vegetal	Carbón Vegetal
Suplementos				Coco	Plátano
Botellas	18 x 6 Cm	18 x 6 Cm	18 x 6 Cm	18 x 6 Cm	18 x 6 Cm

4.5.1 Medios de Cultivo.

a. Medios de cultivo para la germinación de semillas de las especies *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*.

Los cuadros N° 2, 3, 4, 5 y 6, muestra los componentes y las cantidades a usar para preparar un litro de medio de cultivo. El cuadro N° 2, corresponde al medio de cultivo M&S, formulado en 1962 por Murashige y Skoog, modificado por León (1995) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV), Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto (UNSM – T). Los cuadros N° 3, 4, 5 y 6, corresponden a los medios de cultivo puestos en estudio (Tratamientos), los mismos que fueron formulados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto (UNSM – T) por León y Padilla (2007), durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Para determinar el fertilizante y la dosis del mismo a utilizar en los diferentes tratamientos, se determinó el N – P – K y la cantidad de microelementos del medio M&S, luego se comparó estos resultados con el contenido mineral de los diferentes fertilizantes foliares disponibles en el mercado local, se encontró que el fertilizante Bayfolan (11 – 8 – 6) se aproximó a los resultados obtenidos de los cálculos realizados, de modo que se calculó la dosis a utilizar y se preparó los medios de cultivo para los ensayos correspondientes.

Cuadro N° 2: Componentes y dosis del medio de cultivo Murashige Skoog (1962) - T₀ modificado para germinación de semillas de orquídeas.

Reactivos e insumos	Fórmula química	Unidad	Cantidad a usar por litro
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	mg	1650,000
Nitrato de potasio	KNO ₃	mg	1900,000
Agente quelante	Na ₂ – EDTA 2H ₂ O	mg	37,300
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	mg	27,800
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	mg	400,000
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	mg	170,000
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₂ .2H ₂ O	mg	0,250
Cloruro de cobalto hexhidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	mg	0,025
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	mg	6,200
Yoduro de potasio	KI	mg	0,830
Sulfato de manganeso monobásico	MnSO ₄ .4H ₂ O	mg	16,000
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	mg	370,000
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	mg	8,600
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ 5H ₂ O	mg	0,001
Tiamina – HCl	----	mg	0,400
Ácido nicotínico	----	mg	0,500
Sucrosa	----	g	20,000
C. Activado	----	g	2,00
Agar – agar	----	g	10,00
Agua destilada	----	ml	1000,000
pH	----	---	5.1 – 5,4

Cuadro N° 3: Componentes y dosis del medio de cultivo T₁ para germinación.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Fertilizante Bayfolan (11 – 8 – 6)	ml	7,10
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

Cuadro N° 4: Componentes y dosis del medio de cultivo T₂ para germinación.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Endosperma líquido de coco desproteinizado	ml	200,00
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

Cuadro N° 5: Componentes y dosis del medio de cultivo T₃ para germinación.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Fertilizante Bayfolan (11 – 8 – 6)	ml	7,10
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Endosperma líquido de coco	ml	100,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

Cuadro N° 6: Componentes y dosis del medio de cultivo T₄ para germinación.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Fertilizante Bayfolan (11 – 8 – 6)	ml	7,10
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Plátano seda	g	40,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

b. Medios de cultivo para el desarrollo y enraizamiento de plántulas de las especies *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*.

En el cuadro N° 7, se muestra los componentes y las cantidades a usar para preparar un litro de medio de cultivo, el mismo que fue formulado en 1962 por Murashige y Skoog, modificado por León (1995) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV), Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto (UNSM – T).

Cuadro N° 7: Componentes y dosis del medio de cultivo Murashige Skoog (1962) - T₀ modificado para el desarrollo y enraizamiento de plántulas de orquídeas.

Componentes y dosis	Formulas químicas	Unidad	Cantidad
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	mg	1650,000
Nitrato de potasio	KNO ₃	mg	1900,000
Agente quelante	Na ₂ – EDTA 2H ₂ O	mg	37,300
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	mg	27,800
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	mg	400,000
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	mg	170,000
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	mg	0,250
Cloruro de cobalto hexhidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	mg	0,025
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	mg	6,200
Yoduro de potasio	KI	mg	0,830
Sulfato de manganeso monobásico	MnSO ₄ .4H ₂ O	mg	16,000
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	mg	370,000
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	mg	8,600
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	mg	0,001
Tiamina – HCl	---	mg	0,400
Ácido nicotínico	---	mg	0,500
Sucrosa	---	g	20,000
C. Activado	---	g	2,00
Agar – agar	---	g	10,00
Agua destilada	---	ml	1000,000
Endosperma líquido de coco	---	ml	100,000
pH	---	---	5.1 – 5,4

Los cuadros N° 8, 9, 10 y 11, muestran los componentes y las cantidades a usar para preparar un litro de medio de cultivo, el mismo que fue formulado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto (UNSM – T) por León y Padilla (2007), durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Cuadro N° 8: Componentes y dosis del medio de cultivo T₁ para la fase de enraizamiento y desarrollo.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Fertilizante Bayfolan (11 – 8 – 6)	ml	7,10
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Endosperma líquido de coco	ml	100,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

Cuadro N° 9: Componentes y dosis del medio de cultivo T₂ para la fase de enraizamiento y desarrollo.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Endosperma líquido de coco desproteinizado	ml	200,00
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Endospermo líquido de coco	ml	100,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

Cuadro N° 10: Componentes y dosis del medio de cultivo T₃ para la fase de enraizamiento y desarrollo.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Fertilizante Bayfolan (11 – 8 – 6)	ml	7,10
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Endosperma líquido de coco	ml	200,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

Cuadro N° 11: Componentes y dosis del medio de cultivo T₄ para la fase de enraizamiento y desarrollo.

Insumos	Unidad	Cantidad a usar por litro
Fertilizante Bayfolan (11 – 8 – 6)	ml	7,10
Complejo B + Zn	ml	3,00
Azúcar blanca	g	20,00
Agar – agar	g	10,00
Carbón vegetal molido	g	2,00
Plátano seda	g	40,00
Endosperma líquido de coco	ml	100,00
Agua destilada	ml	1000,00
pH	---	5.1 - 5.4

4.5.2 Procedimiento para la preparación del medio de cultivo.

- En un vaso precipitado de 1 l se colocaron 500 ml de agua destilada.
- Se pesaron los componentes sólidos (azúcar, agar-agar, carbón activado, etc.).
- Para el tratamiento T₀ (Testigo) se agregó las cantidades de las sales minerales especificados por Murashige & Skoog (1962) contenidos en stocks A, B, G, C, D, E y F.
- Para los tratamientos (T₁, T₂, T₃ y T₄) no se utilizó las soluciones

stock; para cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente se agregaron los siguientes componentes.

- **Para T₁:** Bayfolan y complejo B.
- **Para T₂:** Endosperma líquido de coco desproteinizado y complejo B. Cabe indicar que para la desproteinización del endosperma líquido de coco (agua de coco), se siguió el siguiente procedimiento; colocamos 300 ml de endosperma líquido de coco en un vaso de precipitado de 500 ml y lo calentamos hasta hervir en una cocina, el agua de coco debe hervir por 5 minutos y luego se filtró, con algodón y un embudo (Figura N° 10).
- **Para T₃:** Bayfolan, complejo B y endosperma líquido de coco.
- **Para T₄:** Bayfolan y complejo B, pero antes se debe preparar una suspensión (jugo) con 300 ml de agua destilada y plátano seda (figura N° 11), licuado hasta homogenizar y luego se agregó esta mezcla a la solución anterior.
- Para cada etapa de propagación, preparamos diferentes tipos de medio de cultivo, con diferentes concentraciones de componentes; germinación: cinco (05) medios (Tratamientos); para desarrollo y enraizamiento también cinco (5) medios de cultivo (Tratamientos).
- Luego adicionamos los componentes sólidos a cada solución establecida por separados según su formulación y tipo de medio requerido para cada caso.
- Luego de aplicar los componentes enrazamos a 1000 ml.
- A cada medio de cultivo establecido se ajustó su pH de 5.1 – 5.4, como se muestra en la figura N° 12.

- El medio de cultivo se distribuyó en botellas de vidrio de 18 x 6 cm., colocando 100 ml de medio de cultivo por botella, con la ayuda de una medida de dispersión de $\frac{1}{2}$ (100 ml), obteniendo 10 botellas de medio de cada tratamiento para la fase de germinación, y al mismo tiempo 10 botellas para la fase de desarrollo y enraizamiento.
- Todas las botellas con medio de cultivo, se pasó a la esterilización en una olla autoclave de capacidad de 40 litros a temperatura de 121° C, con una presión de 15 lb, por un periodo de 15 minutos (figura N° 13).
- Después de enfriado, se agitó el medio para tener homogeneidad y luego se almacenó en la sala de incubación a la temperatura de 20 a 24°C hasta el momento de su uso, donde se las ubicó horizontalmente para una mejor solidificación (figura N° 14).

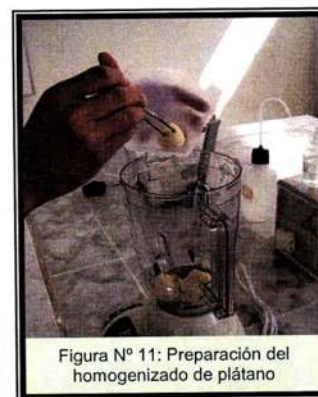




Figura N° 14: Enfriado del medio de cultivo

4.5.3 Especies.

Cattleya spp. y *Oncidium lanceanum*.

4.5.4. Análisis de Varianza.

Se da a conocer que a partir de la primera fase (germinación) y la segunda fase (desarrollo y enraizamiento) de la propagación *in vitro*, se realizó las evaluaciones para el análisis de varianza correspondiente; para el caso de la primera fase se hizo un recuadro de 4 cm² sobre la superficie del vidrio de las botellas, con la finalidad de lograr la facilitación en la toma de datos, para el caso de la segunda fase, se colocó en cada botella 48 plántulas por cada especie por tratamiento (*Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*).

Cuadro N° 12: Análisis de varianza del experimento en la fase I (germinación y formación de protocormos) y fase II (Desarrollo y enraizamiento).

Fuente de variabilidad	G.L.
Tratamientos	5 - 1 = 4
Error	5(10 - 1) = 45
Total	(5 x 10) - 1 = 49

4.5.5 Modelo Matemático.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

μ = Media General α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Efecto aleatorio del error

4.6. Evaluaciones realizadas

4.6.1. Establecimiento de las semillas

a) Viabilidad.

Se evaluó la viabilidad de las semillas observando al microscopio (aumento 100x). Donde se tomó 10 muestras de semillas al azar, en cada uno de los cuales se realizó la evaluación y se hizo el recuento de semillas viables y no viables, obteniéndose el porcentaje de viabilidad de la siguiente manera:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Total de semillas viables}}{\text{Total de semillas}} \times 100\%$$

b) Contaminación.

Se evaluó presencia de microorganismos (hongos y bacterias) por observación directa, a los 07 días después de la siembra, en dos momentos de siembra: 07/08/07 y 09/08/07, para luego obtener el porcentaje de contaminación en cada momento de siembra, por medio de la formula general.

c) Porcentaje de Germinación.

Se evaluó el porcentaje de germinación, al cabo de una (1) semana después de la siembra, y después se realizó observaciones cada 7 días, donde se tomó diez (10) botellas al azar por cada tratamiento y se hizo el recuento total de semillas y de semillas germinadas que se encontraban dentro del cuadro de 2 cm x 2 cm, para luego obtenerse el porcentaje de germinación en cada cuadrado y elevado al número total de semillas por botella evaluado por medio de la formula general.

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Total de semillas}} \times 100\%$$

d) Romplimento de testa.

Se evaluó el rompimiento de testa de las semillas en el medio de cultivo (germinación). Se procedió a tomar las cinco (5) botellas establecidas y observar la velocidad de rompimiento de testa de las semillas por cada cuadrado (en cada botella), esto cada 7 días en 4 evaluaciones.

e) Vitrificación.

Se evaluó los protocormos en buen estado (verdes) y vitrificados o a punto de morir (verde transparente o tornándose como vidrio) a 75 días después de la siembra, donde contamos el número de protocormos vivos y vitrificados de los dos cuadrados de 2 cm. x 2 cm. (Dos cuadrados en cada botella) en las cinco (5) botellas establecidas por los cinco (5) tratamientos.

f) Fenolización.

Se evaluó el estado de protocormos vivos (verdes) y fenolizados o muertos (marrón) a 90 días después de la siembra, donde contamos el número de protocormos vivos y muertos de los dos cuadrados de 2 cm. x 2 cm. (dos cuadrados en cada botella) en las cinco (5) botellas establecidas por los cinco (5) tratamientos.

4.6.2. Etapa de Desarrollo y Enraizamiento.

Se estableció cinco (5) medios de cultivo para el desarrollo y enraizamiento, con diez (10) repeticiones (botellas) y por cada botella se colocó 48 plántulas.

a) Número de hojas.

Se evaluó el número de hojas de las plántulas, donde se procedió a contar el número de hojas de cada plántula (10 plántulas/botella) obteniéndose un promedio final que representará el número de hojas/plántula/botella en cada tratamiento, para luego realizar el Análisis de varianza y la prueba de Duncan.

b) Altura de plántulas.

Se evaluó la altura de las plántulas, tomándose la longitud de las plántulas con un papel milimetrado. De cada plántula (10 plántulas/botella) obteniéndose un promedio final que representará la altura de plántulas/botella, esto a las cinco (5) botellas evaluadas en los cinco (5) tratamientos, para luego realizar el análisis de varianza y prueba de Duncan.

c) Número de raíces.

Se evaluó el número de raíces, donde se procedió a contar el número de raíces de cada plántula (10 plántulas/botella) obteniéndose un promedio final de raíces/plántula/botella, esto a las cinco (5) botellas evaluadas en los cinco (5) tratamientos, para luego realizar el análisis de varianza y Prueba de Duncan.

4.5.3 Análisis de costos.

Se determinó el costo de los diferentes medios de cultivo propuestos, los mismos que representan los diferentes tratamientos del presente trabajo investigación. Para esto se realizó la cotización respectiva de todas las sales nutritivas y minerales que se utilizó en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog en 1962, modificada para el cultivo de orquídeas por León en 1995, y del fertilizante y los insumos, utilizados en los medios caseros propuestos como tratamientos, esto se puede observar en los cuadros 13, 14, 15, 16 y 17.

Cuadro N° 13. Costos de 1 litro de medio de cultivo M&S (T₀).

Componente	Costo (S./.)	Cantidad de producto	Cantidad Usado (g/l)	Total
nitrate de amonio	89,605	1000	1,65	0,14784825
Nitrato de potasio	59,00	500	1,9	0,2242
Cloruro de calcio	65,00	500	0,44	0,0572
Sulfato de magnesio	97,00	500	0,016	0,003104
Sulfato de zinc	95,00	500	0,0086	0,001634
acido bórico	65,00	500	0,0062	0,000806
Ioduro de potasio	150,00	250	0,00083	0,000498
acido molibdic	536,95	500	0,00005	5,3695
Cloruro de cobalto	125,00	100	0,000025	0,00003125
Sulfato de hierro	125,00	500	0,0278	0,00695
Agente quelante Na ₂ - EDTA	125,00	500	0,0373	0,009325
Tiamina - HCl	135,00	100	0,0004	0,00054
acido nicotínico	69,00	25	0,0005	0,00138
Sucrosa	62,00	500	20,00	2,48
agar - agar	224,00	500	10,00	4,48
Carbon activado	110,00	1000	2,00	0,22
agua destilada (L)	9,70	1000	1000,00 ml	9,70
agua de coco (ml) *	0,50	400	100,00 ml	0,125
Equipo	Costo/H	Tiempo usado	Total	
Autoclave	0,675	0,75 H	0,50625	
Costo total del medio de cultivo para germinación				17,84
Costo total del medio de cultivo para desarrollo				17,96

* Sólo se utiliza para medio de desarrollo.

Cuadro N° 14. Costos de 1 litro de medio de cultivo T₁.

Insumos	Costo (S./.)	Cantidad de producto	Cantidad usado/L	Total (S./.)
Fertilizante Bayfolan (11 - 9 - 8) (ml)	22,00	1000	7,1	0,1562
Complejo B (ml)	3,30	120	3,0	0,0825
Azúcar blanca (g)	2,30	1000	20,0	0,046
Agar - agar (g)	224,00	500	10,0	4,48
Carbón vegetal molido (g)	1,20	1000	2,0	0,0024
Agua destilada (ml)	9,70	1000	890,0	8,63203
agua de coco (ml)*	0,50	400	100,0	0,125
Equipo	Costo/H	Tiempo usado	Total	
Autoclave	0,675	0,75 H	0,50625	
Costo total del medio de cultivo para germinación				14,88
Costo total del medio de cultivo para desarrollo				14,03

* Sólo se utiliza para medio de desarrollo.

Cuadro N° 15. Costos de 1 litro de medio de cultivo T₂.

Insumos	Costo (S/.)	Cantidad de producto	Cantidad usado/L	Total (S/.)
Endospermo líquido de coco desproteinizado (ml)	0,50	350	200,00	0,28571429
Complejo B (ml)	3,30	120	3,00	0,0825
Azúcar blanca (g)	2,30	1000	20,00	0,046
Agar – agar (g)	224,00	500	10,00	4,48
Carbón vegetal molido (g)	1,20	1000	2,00	0,0024
Agua destilada (ml)	9,70	1,000	697,00	6,7609
agua de coco (ml)*	0,50	400	100,00	0,125
Equipo	Costo/H	Tiempo usado	Total	
Autoclave	0,675	0,75 H	0,50625	
Costo total del medio de cultivo para germinación				13,10
Costo total del medio de cultivo para desarrollo				12,29

* Sólo se utiliza para medio de desarrollo.

Cuadro N° 16. Costos de 1 litro de medio de cultivo T₃.

Insumos	Costo (S/.)	Cantidad de producto	Cantidad usado/L	Total (S/.)
Fertilizante Bayfolan (11 – 9 – 8) (ml)	22,00	1000	7.1	0,1562
Complejo B (ml)	3,30	120	3	0,0825
Azúcar blanca (g)	2,30	1000	20	0,046
Agar – agar (g)	224,00	500	10	4,48
Carbón vegetal molido (g)	1,20	1000	2	0,0024
Agua destilada (ml)	9,70	1,000	689.9	6,69203
Agua de coco	0,50	400	100	0,125
Agua de coco (ml)*	0,50	400	100	0,125
Equipo	Costo/H	Tiempo usado	Total	
Autoclave	0,675	0,75 H	0,50625	
Costo total del medio de cultivo para germinación				14,03
Costo total del medio de cultivo para desarrollo				12,22

* Sólo se utiliza para medio de desarrollo.

Cuadro N° 17. Costos de 1 litro de medio de cultivo T₄.

Insumos	Costo (S/.)	Cantidad de producto	Cantidad usado/L	Total (S/.)
Fertilizante Bayfolan (11 – 9 – 8) (ml)	22,00	1000	7,10	0,1562
Complejo B (ml)	3,30	120	3,00	0,0825
Azúcar blanca (g)	2,30	1000	20,00	0,046
Agar – agar (g)	224,00	500	10,00	4,48
Carbón vegetal molido (g)	1,20	1000	2,00	0,0024
Agua destilada (ml)	9,70	1000	889,90	8,63203
plátano seda (g)	0,20	93,032	40,00	0,08599192
agua de coco (ml)*	0,50	400	100,00	0,125
Equipo	Costo/H	Tiempo usado	Total	
Autoclave	0,675	0,75 H	0,50625	
Costo total del medio de cultivo para germinación				14,96
Costo total del medio de cultivo para desarrollo				14,12

* Sólo se utiliza para medio de desarrollo.

V. RESULTADOS

5.1. Establecimiento de las semillas.

Al cabo de un promedio de 4 semanas de ser sembradas las semillas en las botellas de vidrio de 18 x 6 cm. que contenían 100 ml de medio de cultivo por botella. Se observó el desarrollo de las semillas, incubadas a una temperatura de 21 – 24°C con una humedad relativa de 40 – 60%.

Se sabe que las semillas de las orquídeas son muy pequeñas entre 0,4 – 1,25 mm y de un embrión diferenciado y suspendida dentro de una estructura reticulada (testa) y rodeada de un gran volumen de aire (en algunas especies), lo que permite flotar por períodos largos.

El embrión de la orquídea esta formado por células relativamente indiferenciadas con abundantes cuerpos de lípidos y proteínas que constituyen su única fuente de reserva, pero utilizando el cultivo *in vitro*, las semillas comenzarán a germinar y desarrollarse ya que cuenta con nutrientes que aceleran su desarrollo en condiciones de laboratorio.

Aproximadamente a 3 semanas y media (21 – 30 días) después de la siembra en el medio de cultivo (germinación), se observó el proceso de rompimiento de testa que cubre el embrión de la semilla de *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*, tal como muestran las figuras N° 15, 16, 17, 18, 19 y 20; esto se da por la germinación del embrión y también por las condiciones favorables para su desarrollo (temperatura, foto periodo y humedad).



Figura N° 15: A 10 X (T₀)



Figura N° 16: A 10 X (T₁)



Figura N° 17: A 10 X (T₂)

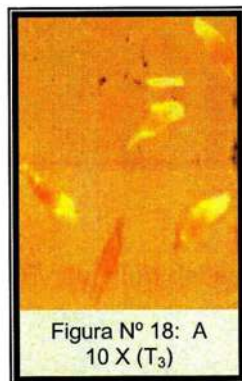


Figura N° 18: A
10 X (T₃)



Figura N° 19: A 10 X (T₄)



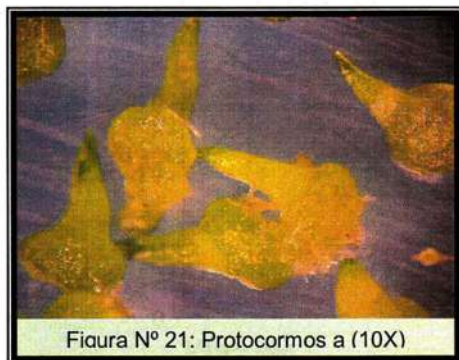
Figura N° 20: T₄ a simple vista

5.2 Multiplicación de protocormos.

En esta fase los protocormos comenzaron a diferenciarse algunos en plántulas y desarrollaron hojas (figura N° 21), esto gracias a las condiciones ambientales controladas en el laboratorio, el medio de cultivo y también los repiques realizados cada 30 días, evitando así el retraso en su desarrollo, esto se hace porque el medio de cultivo se agota y es necesario el reemplazo por un nuevo medio.

Se pudo observar que los protocormos estaban formando algunas en plántulas ya diferenciadas, esto debido a que el medio utilizado esta favoreciendo su desarrollo y siempre controlando las condiciones ambientales

en el laboratorio para su desarrollo y estar nuevamente en las condiciones de un nuevo medio de desarrollo y enraizamiento, tal como se puede observar en la figura N° 22.

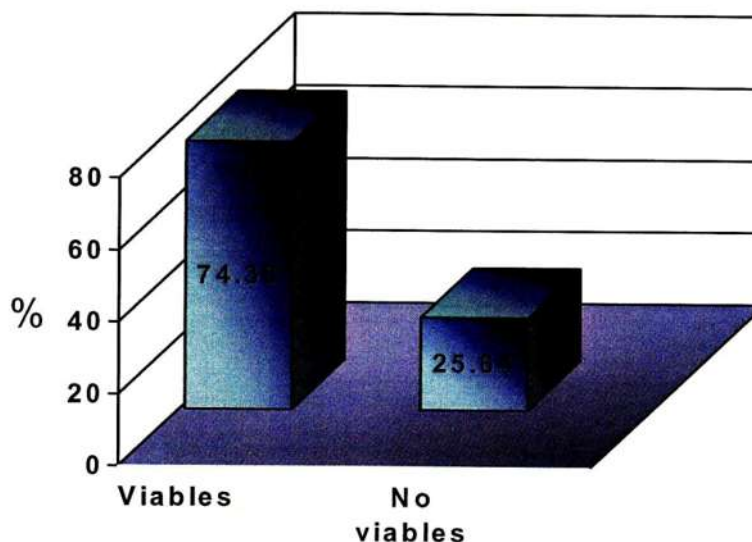


5.3. Evaluación del establecimiento de las semillas.

Cuadro N° 18: Viabilidad de las semillas de *Cattleya* spp., expresado en porcentajes antes de la siembra.

N° de muestras	Cantidad de semillas	Viables (%)	No Viables (%)
1	247	72,5	27,5
2	247	70,0	30,0
3	242	72,7	27,3
4	245	73,9	26,1
5	247	72,5	27,5
6	247	74,9	25,1
7	246	75,2	24,8
8	244	76,2	23,8
9	245	77,9	22,1
10	248	77,8	22,2
X	245.8	74,36	25,64

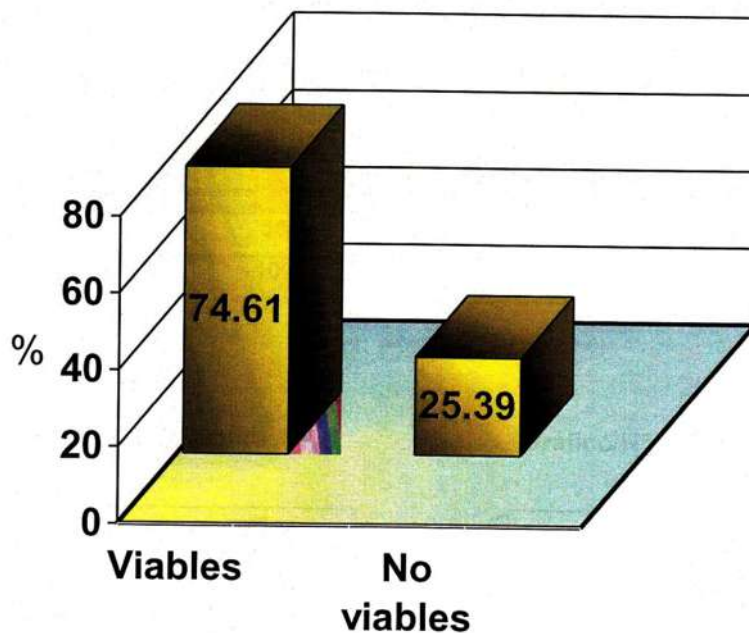
Gráfico N° 1: Viabilidad de las semillas *Cattleya* spp.



Cuadro N° 19: Viabilidad de las semillas de *Oncidium lanceanum*, expresado en porcentajes antes de la siembra.

N° de muestras	Cantidad de semillas	Viables (%)	No Viables (%)
1	246	66,3	33,7
2	248	75,4	24,6
3	243	75,3	24,7
4	247	75,7	24,3
5	245	78,4	21,6
6	273	67,0	33,0
7	248	75,9	24,1
8	245	77,6	22,4
9	246	76,8	23,2
10	247	77,7	22,3
X	248,8	74,61	25,39

Gráfico N° 2: Viabilidad de las semillas de *Oncidium lanceanum*.



5.3.1. Contaminación.

Cuadro N° 20: Número de botellas con *Cattleya* spp. contaminadas en medio de cultivo (Germinación), primer momento de siembra: 07/08/07; después de 2 semanas.

N°	Cantidad de botellas	Contaminados	No contaminados
1*	50	0	50
%	100	0	100

Cuadro N° 21: Número de botellas con *Oncidium lanceanum* contaminadas en medio de cultivo (Germinación), segundo momento de siembra: 09/08/07; después de 2 semanas.

N°	Cantidad de botellas	Contaminados	No contaminados
2	50	0	50
%	100	0	100

Gráfico N° 3.a: Siembra 1

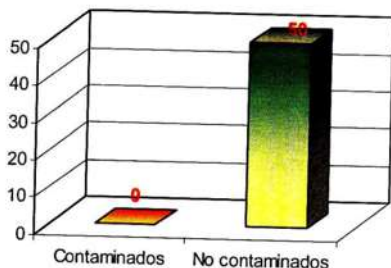
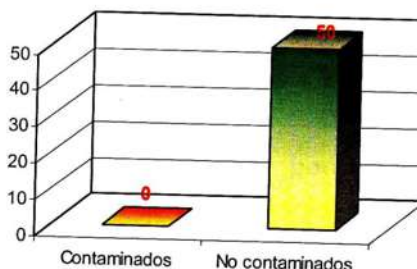


Gráfico N° 3.b: Siembra 2



5.3.2. Porcentaje de Germinación.

Cuadro N° 22: Análisis de Varianza para el porcentaje de germinación de semillas de *Cattleya* spp. en un medio de germinación a 30 días de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT(0.01-0.05)
Tratamientos	t-1 4	152.13	38.03339054	76.0821	(2.87-4.43)
Error	(t)(r-1) 20	9.998	0.499899306		
Total	rt-1 24	162.13			

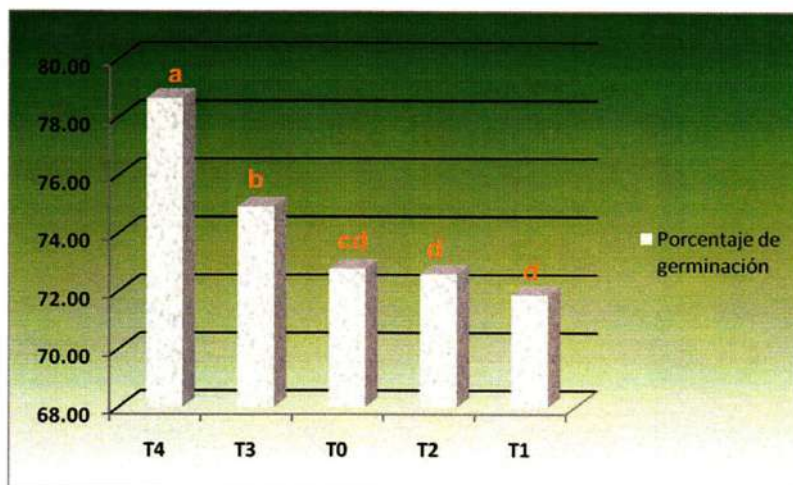
** Altamente significativo

X = 74,16%

R²=93,83%

C.V= 0,95%

Gráfico N° 4: Prueba de DUNCAN al 0.01% para el Porcentaje de germinación de semillas de *Cattleya* spp. en un medio de germinación a 30 días de la siembra.



Cuadro N° 23: Análisis de Varianza para el porcentaje de germinación de semillas de *Oncidium lanceanum* en un medio de germinación a 30 días de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT(0.01-0.05)
Tratamientos	t-1	4	95.611	23.90275458	37.0107 (2.87-4.43)
Error	(t)(r-1)	20	12.917	0.645834411	
Total	rt-1	24	108.53		

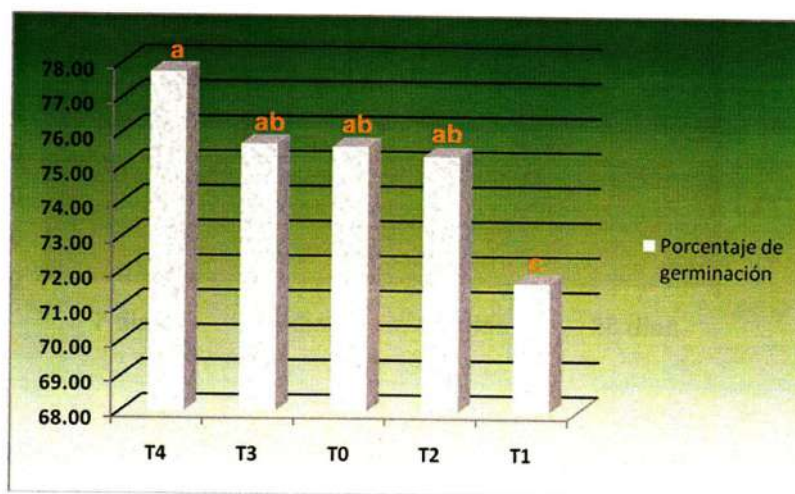
** Altamente significativo

X = 75,21%

R²=88,10%

C.V= 1,07%

Gráfico N° 5: Prueba de DUNCAN al 0.01% para el porcentaje de germinación de semillas de *Oncidium lanceanum* en un medio de germinación a 30 días de la siembra.

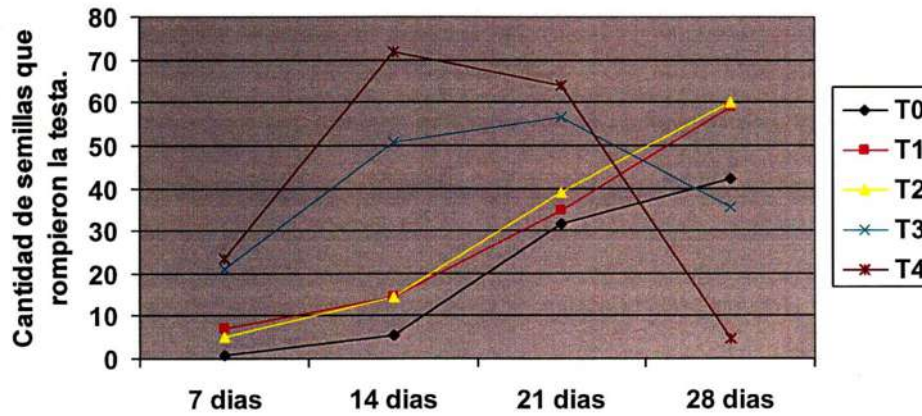


5.3.3. Rompimiento de testa.

Cuadro N° 24: Rompimiento de testa de semillas de *Cattleya* spp., en un medio de germinación durante 4 evaluaciones expresado en cantidad.

Tto.	Rompimiento de testa en un medio de cultivo (germinación) expresado en proporción.			
	7 días	14 días	21 días	28 días
T ₀	0,8	5,4	31,6	42,2
T ₁	7,0	14,4	34,6	59,0
T ₂	5,0	14,6	39	60,0
T ₃	21,0	50,6	56,4	35,6
T ₄	23,6	71,8	64,0	4,8
X	11,48	31,36	45,12	40,32
Total	57,4	156,8	225,6	201,6

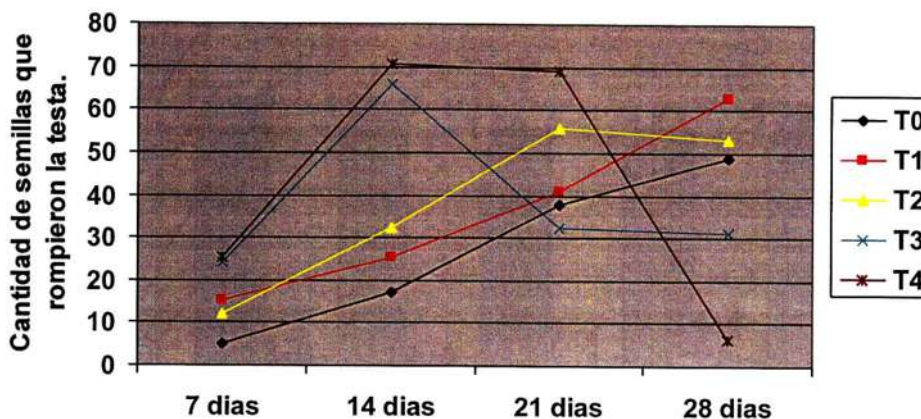
Gráfico N° 6: Velocidad de rompimiento de testa.



Cuadro N° 25: Rompimiento de testa de semillas de *Oncidium lanceanum*, en un medio de germinación durante 4 evaluaciones expresado en cantidad.

Tto.	Rompimiento de testa en un medio de cultivo (germinación) expresado en proporción.			
	7 días	14 días	21 días	28 días
T ₀	5,0	17,0	37,8	48,8
T ₁	15,2	25,4	40,8	63,0
T ₂	12,0	32,4	56,0	53,2
T ₃	24,2	65,8	32,4	31,4
T ₄	25,2	70,6	69,0	6,2
X	16,32	42,24	47,2	40,52
Total	81,6	211,2	236	202,6

Gráfico N° 7: Velocidad de rompimiento de testa.



5.3.4. Vitrificación.

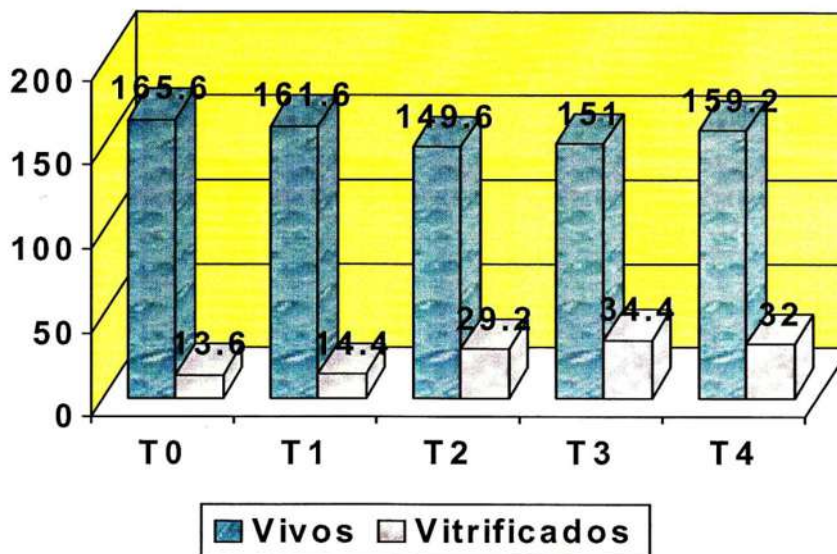
Cuadro N° 26: Cuadro de observación del número de protocormos verdes y vitrificados de *Cattleya* spp. a los 75 días después de la siembra.

Repet.	T ₀		T ₁		T ₂		T ₃		T ₄	
	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.
1	154	14	153	21	152	27	146	40	173	18
2	159	16	161	14	151	23	158	25	141	54
3	175	9	164	16	146	30	151	38	156	24
4	179	11	169	10	150	35	154	33	155	38
5	161	18	161	11	149	31	146	36	171	26
X	165,6	13,6	161,6	14,4	149,6	29,2	151	34,4	159,2	32
Total	828	68	808	72	748	146	755	172	796	160

Leyenda: Repet.: Repeticiones. Verdes: Protocormos verdes vivos.

P.V.: Protocormos vitrificados.

Gráfico N° 8: Protocormos vivos y vitrificados.



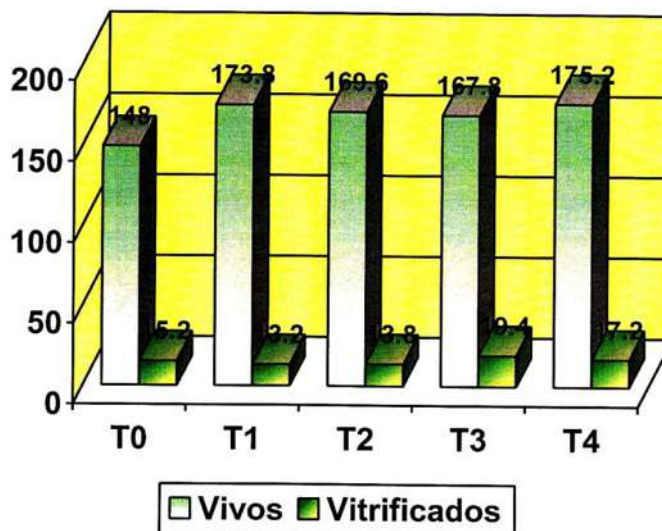
Cuadro N° 27: Cuadro de observación del número de protocormos verdes y vitrificados de *Oncidium lanceanum* a los 75 días después de la siembra.

Repet.	T ₀		T ₁		T ₂		T ₃		T ₄	
	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.	Verdes	P.V.
1	150	12	176	10	175	9	176	15	173	21
2	161	13	173	16	171	16	176	13	178	13
3	149	14	174	13	173	17	161	26	173	17
4	147	17	167	15	163	12	155	24	170	24
5	133	20	179	12	166	15	171	19	182	11
X	148	15,2	173,8	13,2	169,6	13,8	167,8	19,4	175,2	17,2
Total	740	76	869	66	848	69	839	97	876	86

Leyenda: Repet.: Repeticiones. Verdes: Protocormos verdes vivos.

P.V.: Protocormos vitrificados.

Gráfico N° 9: Protocormos vivos y vitrificados.



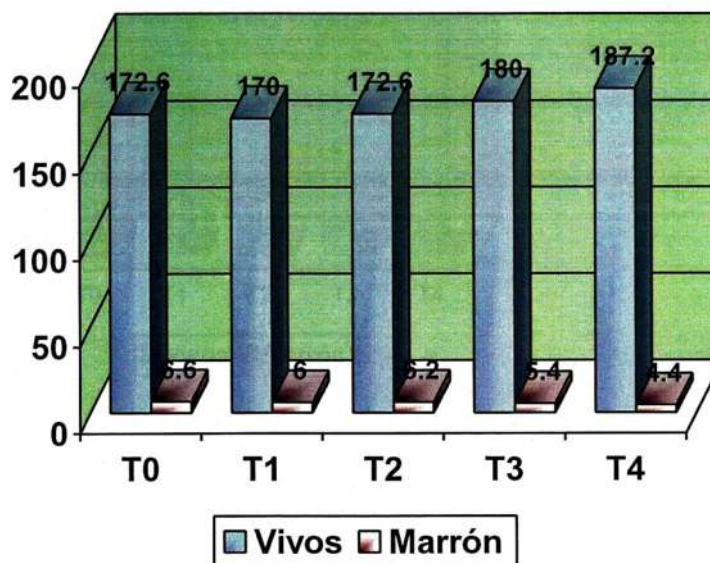
5.3.5. Fenolización.

Cuadro N° 28: Cuadro de observación del número de protocormos vivos y fenolizados de *Cattleya* spp. a los 90 días después de la siembra.

Repet.	T ₀		T ₁		T ₂		T ₃		T ₄	
	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.
1	163	5	165	9	171	8	183	3	185	6
2	168	7	169	6	168	6	177	6	190	5
3	175	9	176	4	172	4	180	9	176	4
4	186	4	171	8	178	7	183	4	190	3
5	171	8	169	3	174	6	177	5	195	4
X	172,6	6,6	170,0	6,0	172,6	6,2	180,0	5,4	187,2	4,4
Total	863	33	850	30	863	31	900	27	936	20

Leyenda: Repet.: Repeticiones. P.V.: Protocormos vivos.
P.F.: Protocormos fenolizados.

Gráfico N° 10: Protocormos vivos y fenolizados.



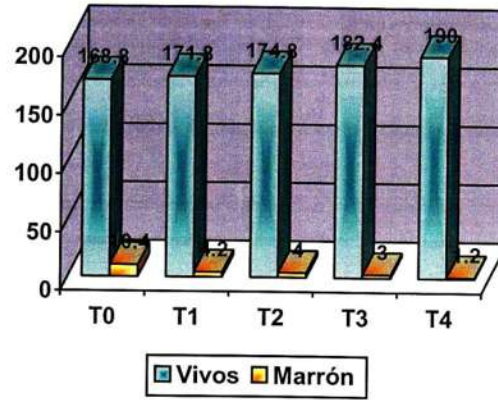
Cuadro N° 29: Cuadro de observación del número de protocormos vivos y fenolizados de *Oncidium lanceanum* a los 90 días después de la siembra.

Repet.	T ₀		T ₁		T ₂		T ₃		T ₄	
	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.	P.V.	P.F.
1	159	9	172	2	176	3	184	2	190	1
2	171	4	169	6	166	8	180	3	193	2
3	169	15	176	4	174	2	186	3	180	0
4	184	6	177	2	181	4	184	3	191	2
5	161	18	165	7	177	3	178	4	196	1
X	168,8	10,4	171,8	4,2	174,8	4,0	182,4	3,0	190,0	1,2
Total	844	52	859	21	874	20	912	15	950	6

Leyenda: Repet.: Repeticiones. P.V.: Protocormos vivos.

P.F.: Protocormos fenolizados.

Gráfico N° 11: Protocormos vivos y fenolizados.



5.4. Evaluaciones en la etapa de desarrollo y enraizamiento de plántulas.

Al cabo de un período donde los protocormos estaban formando algunas plántulas, se procedió al cambio de un medio más nutritivo, el mismo que se consiguió agregando a todos los tratamientos 100 ml de endosperma líquido de coco (agua de coco verde), llegando a la fase de desarrollo y enraizamiento de las plántulas, en esta etapa se estableció un número determinado de plántulas por botella (48 plántulas/botella), siempre con las mismas condiciones ambientales para su desarrollo y enraizamiento, en ésta fase las plántulas tendrán mayor tamaño y formaran raíces (Figuras N° 23, 24, 25, 26, 27 y 28).

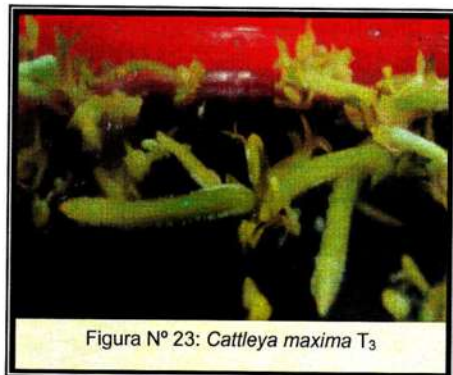


Figura N° 23: *Cattleya maxima* T₃

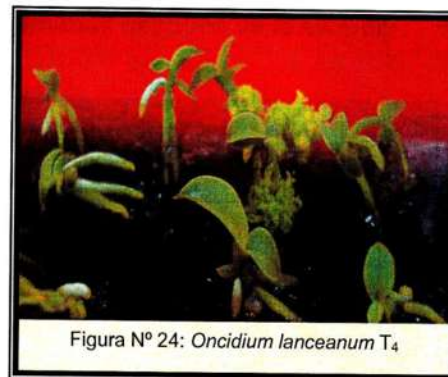


Figura N° 24: *Oncidium lanceanum* T₄

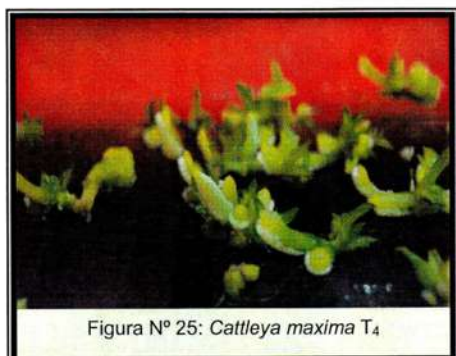


Figura N° 25: *Cattleya maxima* T₄

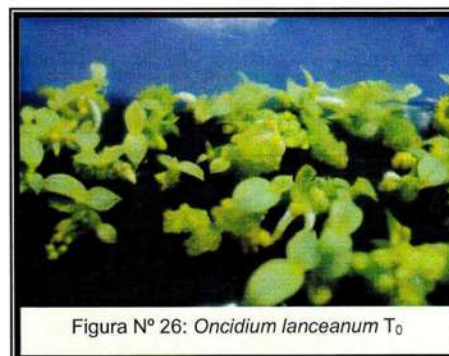


Figura N° 26: *Oncidium lanceanum* T₀



Figura N° 27: *Cattleya maxima* T₀

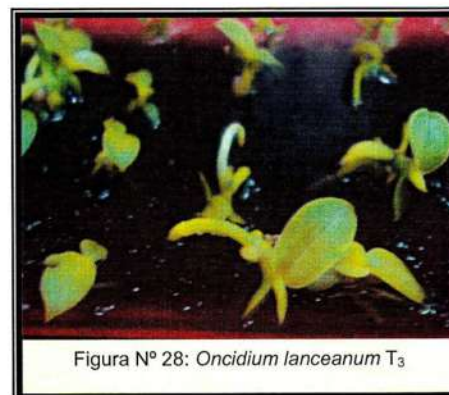


Figura N° 28: *Oncidium lanceanum* T₃

5.4.1. Número de hojas.

Cuadro N° 30: Análisis de varianza para determinar el número de hojas de *Cattleya maxima* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT (0.01-0.05)
Tratamientos	t-1 4	15.68	3.92	73.5	2.56-3.77
Error	(t)(r-1) 45	2.4	0.053333333		
Total	rt-1 49	18.08			

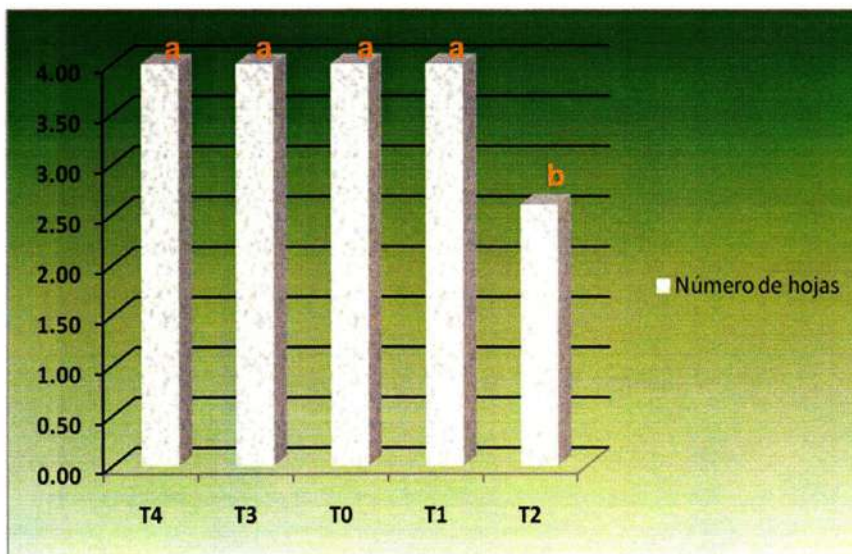
** Altamente significativo

X = 3,72

R²=86,72%

C.V= 6,20%

Gráfico N° 12: Prueba de Duncan para determinar el número de hojas de *Cattleya maxima* a 24 semanas después de la siembra.



Cuadro N° 31: Análisis de varianza para determinar el número de hojas de *Oncidium lanceanum* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT(0.01-0.05)
Tratamientos	t-1 4	25.6368	6.4092	73.2015228	2.56-3.77
Error	(t)(r-1) 45	3.94	0.087555556		
Total	rt-1 49	29.5768			

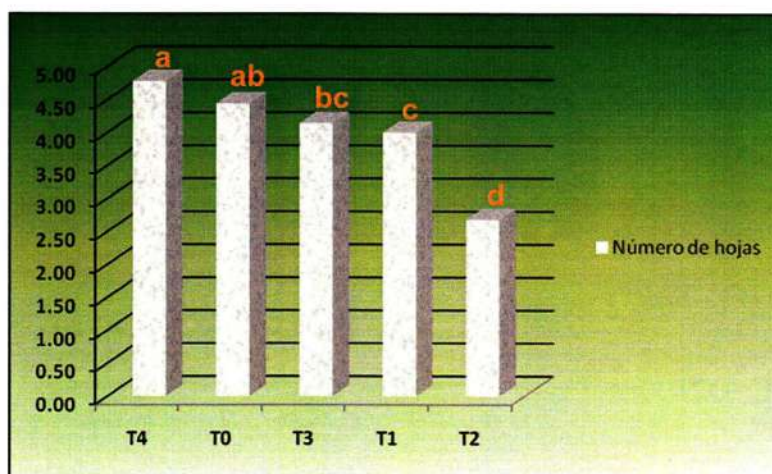
** Altamente significativo

X = 3,94

R² = 86,68%

C.V = 7,38%

Gráfico N° 13: Prueba de Duncan para determinar el número de hojas de *Oncidium lanceanum* a 24 semanas después de la siembra.



5.4.2. Altura de las plántulas.

Cuadro N° 32: Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas en mm de *Cattleya maxima* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT (0.01-0.05)
Tratamientos	t-1 4	307.1948	76.7987	287.947134	(2.57 - 3.77)
Error	(t)(r-1) 45	12.002	0.266711111		
Total	rt-1 49	319.1968			

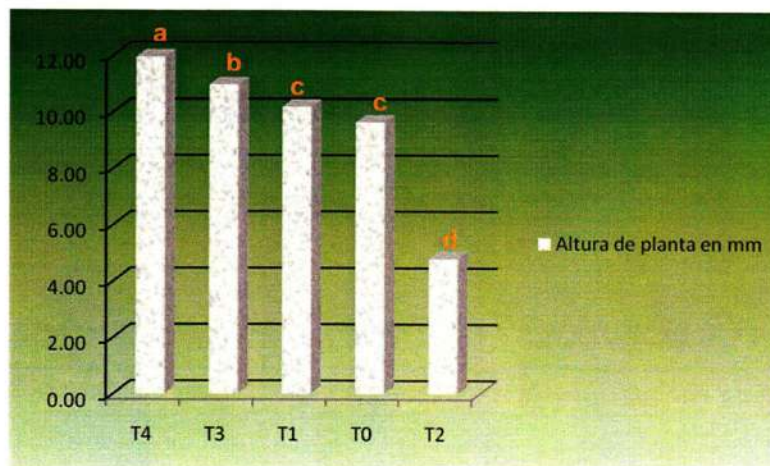
** Altamente significativo

X=9.5 mm

R²=96,24%

C.V= 5,43%

Gráfico N° 14: Prueba de Duncan al 0.01% para determinar la altura de plántulas en mm de *Cattleya maxima* a 24 semanas después de la siembra.



Cuadro N° 33: Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas en mm de *Oncidium lanceanum* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT (0.01-0.05)
Tratamientos	t-1	4	2435.941	608.9852	371.811058 (2.55 - 3.77)
Error	(t)(r-1)	45	73.705	1.637888889	
Total	rt-1	49	2509.646		

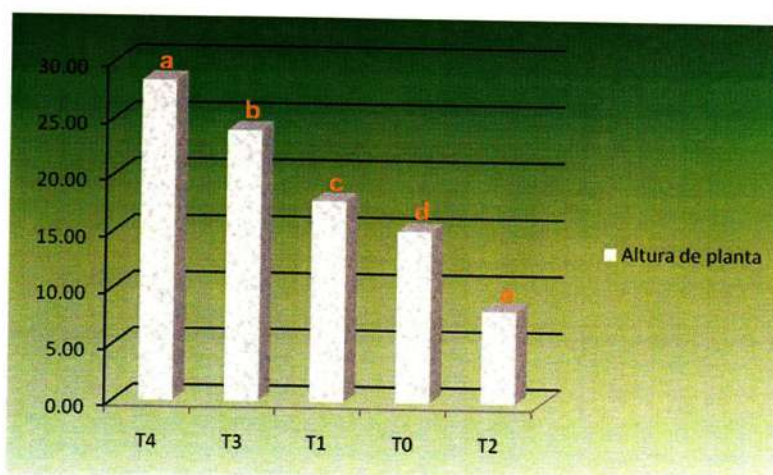
** Altamente significativo

X=18.67 mm

R²=97,10%

C.V= 6,9%

Gráfico N° 15: Prueba de Duncan al 0.01% para determinar la altura de plántulas en mm de *Oncidium lanceanum* a 24 semanas después de la siembra.



5.4.3. Número de raíces.

Cuadro N° 34: Análisis de varianza para determinar el número de raíces del *Cattleya maxima* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT(0.01-0.05)
Tratamientos	t-1 4	4.5758	1.14395	64.3270853	(2.575 - 3.77)
Error	(t)(r-1) 45	0.80025	0.017783333		
Total	rt-1 49	5.37605			

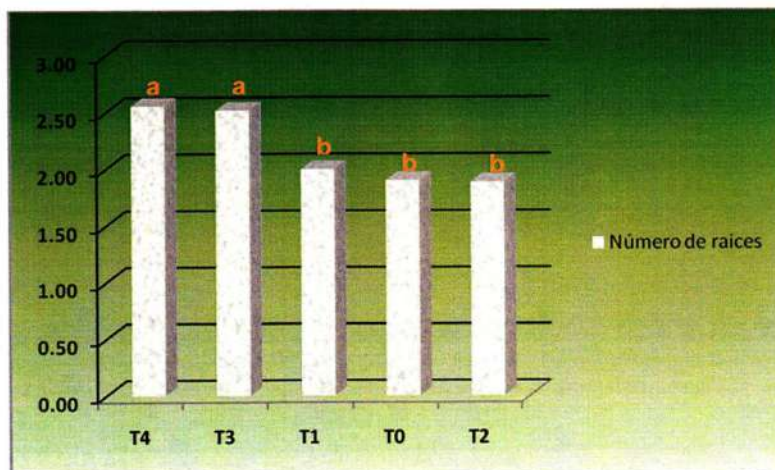
** Altamente significativo

X = 2,17

R²=85,11%

C.V= 6,14%

Gráfico N° 16: Prueba de Duncan para determinar el número de raíces de *Cattleya maxima* a 24 semanas después de la siembra.



Cuadro N° 35: Análisis de varianza para determinar el número de raíces del *Oncidium lanceanum* en fase de enraizamiento y desarrollo a 24 semanas después de la siembra.

F. de V.	GL	SC	CM	FC	FT(0.01-0.05)
Tratamientos	t-1 4	11.0452	2.7613	71.0048571	(2.575 - 3.77)
Error	(t)(r-1) 45	1.75	0.038888889		
Total	rt-1 49	12.7952			

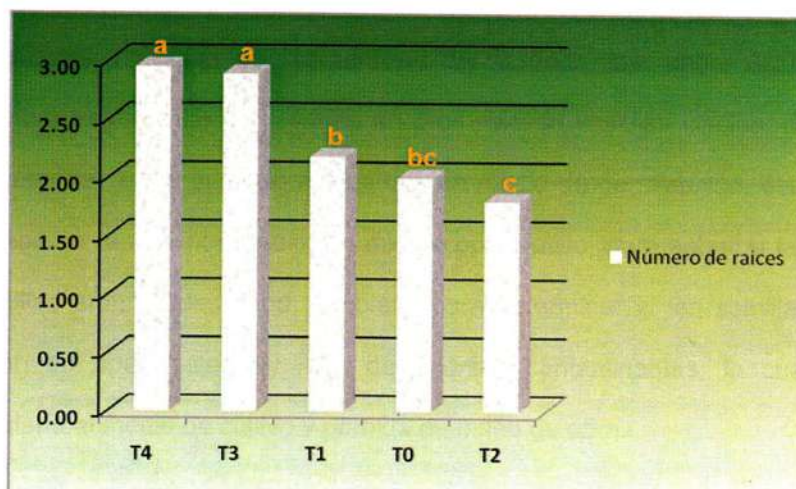
** Altamente significativo

X = 2,36%

R²=86,32%

C.V= 8,34%

Gráfico N° 17: Prueba de Duncan para determinar el número de raíces de *Oncidium lanceanum* a 24 semanas después de la siembra.



VI. DISCUSIÓN

6.1. Viabilidad.

6.1.1 Para *Cattleya* spp. El cuadro N° 12, nos muestra los resultados de la prueba de viabilidad de las semillas de *Cattleya* spp. antes de la siembra, registrando un 74,36% en promedio de semillas viables, de un total de 245,8 semillas evaluadas, en medio de germinación, ésta prueba se realizó por medio del microscopio óptico, para saber si las semillas eran viables o no, también para determinar si las semillas están en buen estado y libre de agentes contaminantes, lo cual afectaría al medio de cultivo y pérdida de mano de obra.

6.1.2 Para *Oncidium lanceanum*. El cuadro N° 13, muestra de manera clara los resultados de la prueba de viabilidad para las semillas de *Oncidium lanceanum* antes del momento de la siembra, registrando un 74,61% en promedio para las semillas viables, de un total de 248,8 semillas evaluadas, al igual que para *Cattleya* spp. en este caso se siguió los mismos procedimientos para la evaluación de este parámetro.

Esto conforme a lo realizado por **RODRÍGUEZ (1996)**, en donde menciona que para determinar la viabilidad de las semillas de *Phragmipedium kovachii*, se puede realizar por medio del microscopio electrónico, donde se observa las semillas a simple vista, y se reconoce las viables o las no viables.

Existe otro método como es el 2, 3, 5 trifenil – tetrazolium (TTZ) al 1%, donde se coloca una pequeña muestra de semillas más una pequeña cantidad del

TTZ, por un periodo de 24 a 72 horas, luego se extrae y se lo coloca en una placa petri, y se puede distinguir las semillas viables y no viables, esto conforme a lo mencionado por **LEÓN (1995)**.

6.2. Porcentaje de contaminación

Los cuadros N° 14 y 15, muestran que después de 2 semanas de sembradas las semillas de *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*, no se encontró contaminación por ningún tipo de microorganismos, esto debido al buen trabajo realizado en la cámara de flujo laminar, cabe mencionar también que la técnica de desinfección de las semillas utilizado para este trabajo ha sido buena y bien empleada, dado a que las botellas de whisky Jonnie Walker contenidas con medio de cultivo y semillas de las especies antes mencionadas se mantuvieron sin contaminarse hasta el momento de la transferencia a un medio de cultivo de desarrollo.

Conforme lo indicado por **DONAYRE (2000)**, indica que el material a sembrar pueda tener presencia de algún patógeno que pueda afectar el desarrollo y germinación de las semillas, para el cual es necesario utilizar algún desinfectante que pueda disminuir la contaminación, por ejemplo el hipoclorito de sodio o de calcio, agua oxigenada (peroxido de hidrógeno) y alcoholes, en concentraciones mínimas (0.1 – 0.5%).

Referente a lo que son desinfectantes utilizado por **ARDITTI (1999)**, sugiere que también podemos utilizar un agente que rompa la tensión superficial con la semillas (Tween 20) y que actúa esterilizando y desinfectándolo

completamente y así permitiremos que las semillas al sembrarlas no puedan contaminarse.

6.3. Porcentaje de germinación.

6.3.1 Para *Cattleya* spp. El cuadro N° 22 y el gráfico N° 4, representan el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente respecto al porcentaje de germinación de *Cattleya* spp., con valores para el C. V. con 0,95% y un R^2 con 93,83%, estos resultados corroboran la confiabilidad de los resultados obtenidos. En el gráfico N° 4 se observa el resultado de la prueba de Duncan con respecto al porcentaje de germinación con resultados de T_0 con 72,78%, T_1 con 71,87%, T_2 con 72,59%, T_3 con 74,92% y T_4 con 78,65%, esto nos indica que el medio de cultivo con plátano tiene un mejor resultado para germinar semillas de *Cattleya* spp.

6.3.2 Para *Oncidium lanceanum*. El cuadro N° 23 representa el análisis de varianza respecto al porcentaje de germinación de *Oncidium lanceanum*, con valores para el C. V. con 1,07% y un R^2 con 88,10%, estos datos al igual que para *Cattleya* spp., corroboran la confiabilidad de los resultados obtenidos. En el gráfico N° 5 se observa el resultado de la prueba de Duncan con respecto al porcentaje de germinación con resultados de T_0 con 71,70%, T_1 con 75,33%, T_2 con 75,61%, T_3 con 75,68% y T_4 con 77,74%, esto corrobora la información obtenida con *Cattleya* spp., lo que muestra que el medio de cultivo T_4 (con la adición de 40 g de platano seda semi maduro) es adecuado para la

germinación in Vitro de orquídeas *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*.

La razón de este resultado fue que el embrión de la semilla comenzó a romper la testa, debido a que el medio de cultivo influyó en la germinación absorbiendo el embrión los nutrientes que contenía (sales, vitaminas, reguladores, sustancias orgánicas, etc. Los mismos que se encontraban en el fertilizante utilizado, el complejo B y las sustancias orgánicas complejas). Otros factores que ayudaron a la germinación fueron la alta humedad en el medio de cultivo, la temperatura y la luz (fotoperiodo 16/8) controlada por un timer. Se sabe que el plátano contiene ciertas cantidades de fitoormonas, los mismos que son los responsables de la división celular, tal como lo afirma KHALIFAH en 1966, donde menciona que el fruto del plátano contiene pequeñas cantidades de compuestos inductores de la división celular [zeatina, zeatin-ribosido y 6-(Δ^2 -isopentilamino) purina].

Este resultado concuerda con lo planteado para el proceso de propagación in Vitro de *Cattleya* spp. y *Psychopsis versteegianum*, por LEÓN (1995), donde menciona que las semillas de estas especies tienen mejor germinación bajo condiciones in Vitro, y que pueden germinar en un período de 30 días en buena cantidad y uniforme, gracias al medio de cultivo empleado, como también el manejo brindado a la semilla para que germinen como las condiciones ambientales, una buena desinfección evitando así pérdidas de semillas por contaminación.

6.4. Rompimiento de testa.

En los cuadros N° 24 y 25, y en los gráficos N° 6 y 7, se muestran los resultados de las evaluaciones de los días al rompimiento de la testa, donde se puede apreciar que para el caso del tratamiento T_4 a los 14 días se tuvo el mayor número de semillas rompiendo la testa, seguido del tratamiento T_3 , a diferencia que en el tratamiento T_0 , se observa que el mayor número de semillas que rompieron la testa están a los 28 días después de la siembra, la razón es porque la testa al ser una estructura reticulada que cubre al embrión y compuesta por células indiferenciadas con cuerpos lipídicos y proteínas, al entrar en contacto con el medio de cultivo, comenzó a desarrollarse y activarse para poder realizar el rompimiento de testa, posteriormente formar protocormo y luego plántula. El hecho de romper la testa en menos tiempo indica que el proceso de germinación y aparición del protocormo será en menos tiempo, lo que implica un aceleramiento del proceso de germinación.

Este resultado tiene relación con lo afirmado por **PIERIK (1989)**, cuando menciona que el proceso de rompimiento de testa es rápido y se da por las condiciones ambientales brindadas a la semilla (temperatura, fotoperíodo 16/8, humedad relativa, etc.) y al medio de cultivo, donde las semillas al entrar en contacto con el medio reaccionan instintivamente y comienzan a desarrollarse.

6.5. Vitrificación.

Los cuadros N° 26 y 27, muestran al que cabo de 75 días después de la siembra de semillas de *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum* en el medio de

cultivo para germinación, se obtuvo en promedio los siguientes resultados: T₀ con 13,6 y 15,2; T₁ con 14,4 y 13,2; T₂ con 29,2 y 13,8; T₃ con 34,4 y 19,4 y T₄ con 32 y 17,2; éstos valores representan a los protocormos que sufrieron el problema de vitrificación (color verde transparente), esto es debido al tiempo transcurrido en el medio de cultivo, se observó que el proceso de vitrificación es producto de la competencia y el agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo, lo que implica que hay que realizar el cambio del medio de cultivo en menos tiempo (cada 30 días).

6.6. Fenolización.

En los cuadros N° 22 y 23, podemos observar que al cabo de 90 días después de la siembra de las semillas de *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum* en el medio de germinación, se tuvo los promedios siguientes: T₀ con 6,6 y 10,4; T₁ con 6 y 4,2; T₂ con 6,2 y 4; T₃ con 5,4 y 3 y T₄ con 4,4 y 1,2; éstos valores representan a los protocormos que sufrieron el problema de fenolización o muerte (color marrón), al igual que para vitrificación este problema aparece debido al tiempo transcurrido antes del repique, ya que es necesario el reemplazo de medio de cultivo cada cierto tiempo (30 días), como también a que los protocormos fueron eliminando sustancias como fenoles y anhídrido carbónico, contaminando el medio de cultivo, creo que es necesario la adición de una dosis más de carbón vegetal o activado, como también adicionar una dosis de antioxidantes como ácido cítrico o ácido ascórbico para así neutralizar algunas sustancias que pudieran ser excretadas por los protocormos, porque sufren estragos y decoloración.

Referente a repiques tanto para el ítem 6.5 y 6.6; indica **RODRÍGUEZ (1999)**, que es necesario realizar repique cada 30 días, para evitar fenalizaciones, porque sabemos que algunas especies contienen sustancias endógenas que exudan de la superficie cortados al medio de cultivo, el cual se puede evitar utilizando un antioxidante, además si la humedad relativa es muy baja, durante el periodo de cultivo se puede presentar deshidratación del medio y aumentar la salinidad.

Así mismo, con respecto a repiques (ítem 6.5 y 6.6), menciona **DONAYRE (2000)**, que consiste en separar los protocormos que se encuentra en un medio inicial y transferirlos en diferentes frascos a un nuevo medio de cultivo, repitiendo la operación cada cuatro (4) semanas como máximo. También se indica que los protocormos deben ser transferidos cada 30 días como máximo de un medio a otro, antes de sufrir hiperhidricidad o fenolización, esto conforme lo mencionado por **DELGADO (2001)**.

6.7. Número de hojas en la fase de desarrollo y enraizamiento.

6.7.1 Para *Cattleya* spp. El cuadro N° 30, representa el análisis de varianza respecto al número de hojas en la fase de desarrollo y enraizamiento de *Cattleya* spp., con valores para el C. V. con 6,2% y un R^2 con 86,72%, los mismos que corroboran la confiabilidad de los resultados obtenidos durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio. En el gráfico N° 12 se observa el resultado de la prueba de Duncan con respecto al número de hojas en la etapa de desarrollo, en el factor medio de cultivo se

observa que no existe diferencia estadística entre los tratamientos T_0 con 4, T_1 con 4, T_3 con 4 y T_4 con 4; la diferencia estadística radica entre los tratamientos mencionados y el tratamiento T_2 con 2,6; los mismos que lo superan, quienes provocaron la mayor formación de hojas promedios en las plántulas por tratamientos esto nos indica que los medios de cultivo con la adición de endosperma líquido de coco y plátano homogenizado tienen un mejor resultado para el desarrollo de *Cattleya* spp.

6.7.2 Para *Oncidium lanceanum*. El cuadro N° 31 representa el análisis de varianza respecto al número de hojas en la etapa de desarrollo y enraizamiento de *Oncidium lanceanum*, con valores para el C. V. con 7,38% y un R^2 con 86,68%, los mismos que corroboran la confiabilidad de los resultados obtenidos durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio. En el gráfico N° 13 se observa el resultado de la prueba de Duncan con respecto al número de hojas en la etapa de desarrollo, en el factor medio de cultivo se observa diferencia estadística en T_4 con 4,78 que supera a T_0 con 4,44; que supera a T_3 con 4,14; que supera a T_1 con 4; el mismo que supera a T_2 con 2,68; esto corrobora la información obtenida con *Cattleya* spp., lo que muestra que el medio de cultivo con plátano y endosperma líquido de coco es adecuado para el desarrollo de hojas en plántulas de orquídeas *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*.

De la interacción de los medios de cultivo con respecto al número de hojas en fase de desarrollo, respondieron mejor las botellas con medio de cultivo M&S (T_0) y el medio de cultivo con plátano (T_4), a ambos agregados endosperma líquido de coco, este resultado corrobora con lo afirmado por **KHALIFAH** en 1966, donde menciona que existen evidencias de que el efecto del plátano sobre el desarrollo de las orquídeas puede deberse a la presencia de otros compuestos distintos a las citoquininas, pues se ha reportado la presencia de compuestos afines a giberelinas y auxinas en el mismo. Las plántulas de las botellas con medio de cultivo con coco desproteinizado y endosperma líquido de coco (T_2) fueron los que formaron menor número de hojas, los mismos que adquirieron un color amarillo pálido y truncaron sus desarrollo, sin llegar a fenolizar; esto debido a la falta de nutrientes en el medio y también a la alta concentración de fitohormonas en el medio de cultivo, puesto que la adición de endosperma líquido de coco fue en exceso lo que impidió que las plántulas desarrollen hojas, también cabe indicar que este medio de cultivo carece de fertilizante bayfolan lo que se deduce que a la falta de nutrientes las plántulas no desarrollaron hojas de forma normal comparados a los demás tratamientos durante esta fase; este resultado concuerda con lo afirmado por **ESPINOZA** en el 2001, en donde menciona que el endosperma líquido de coco contiene fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) que ayudan a un mejor desarrollo de las plántulas, siempre y cuando las concentraciones deben estar estandarizadas, para evitar problemas durante su desarrollo. Así mismo **ROCA y MROGINSKI** en 1991 menciona que los constituyentes básicos incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta, macro y micro nutrientes; un azúcar (usualmente sacarosa, sucrosa o

glucosa); vitaminas como la tiamina, glicina entre otros; sustancias reguladoras del crecimiento; y otros compuestos. Entre estas juegan un papel esencial las auxinas y las citoquininas cuyas proporciones relativas favorecen el desarrollo del tallo y el de la raíz, al mismo tiempo la formación de hojas.

6.8. Altura de plántula en fase de desarrollo.

6.8.1 Para *Cattleya* spp. El cuadro N° 32, representa el análisis de varianza respecto a la altura de plántulas en la fase de desarrollo y enraizamiento de *Cattleya* spp., con valores para el C. V. con 5,43% y un R^2 con 96,24%, los mismos que corroboran la confiabilidad de los resultados obtenidos durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio. En el gráfico N° 14 se observa el resultado de la prueba de Duncan con respecto a la altura de plántulas en la etapa de desarrollo, en el factor medio de cultivo se observa que existe diferencia estadística entre los tratamientos T_4 con 12 mm que supera a los tratamientos T_3 con 11 mm, que supera a T_1 con 10,2 mm; que supera a T_0 con 9,6 mm; el mismo que supera a T_2 con 4,8 mm, estos valores indican que las plántulas de *Cattleya* spp. se desarrollan mejor en un medio de cultivo con la adición de endosperma líquido de coco y plátano.

6.8.2 Para *Oncidium lanceanum*. El cuadro N° 35 muestra el análisis de varianza respecto a la altura de plántulas en la etapa de desarrollo y enraizamiento de *Oncidium lanceanum*, con valores para el C. V. con 6,9% y un R^2 con 97,10%, los mismos que corroboran la confiabilidad

de los resultados obtenidos durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio. En el gráfico N° 15 se observa el resultado de la prueba de Duncan con respecto a la altura de plántulas expresados en mm en la etapa de desarrollo, en el factor medio de cultivo se observa diferencia estadística en T₄ con 28,3 mm que supera a los tratamientos T₃ con 23,9 mm, que supera a T₁ con 17,8 mm; que supera a T₀ con 15,2 mm; el mismo que supera a T₂ con 8,2 mm, esto corrobora la información obtenida con *Cattleya* spp., lo que muestra que el medio de cultivo con la adición de plátano y endosperma líquido de coco es eficiente para el desarrollo de plántulas de orquídeas *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*.

De la interacción de los medios de cultivo con respecto a la altura de plántulas en la fase de desarrollo, respondieron mejor las botellas con medio de cultivo con plátano más la adición de endosperma líquido de coco (T₄), esto debido al efecto de los nutrientes macro y micro que se encontraban en el fertilizante bayfolan, esto concuerda con lo afirmado por **ROCA y MROGINSKI** en 1991, en donde indica que los constituyentes básicos incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta, macro y micro nutrientes; un azúcar (usualmente sacarosa, sucrosa o glucosa), también a la adición de complejo B y las sustancia orgánicas complejas (40 g/l de plátano seda y 100 ml/l de endosperma líquido de coco), fueron los que permitieron sus eficiente desarrollo de las plántulas de las especies antes mencionadas, esto concuerda con lo demostrado por **ROCA y MROGINSKI** en 1991; donde

indica que los medios de cultivo también deben de tener en su composición vitaminas como la tiamina, glicina entre otros; sustancias reguladoras del crecimiento; y otros compuestos. Entre estas juegan un papel esencial las auxinas y las citoquininas cuyas proporciones relativas favorecen el desarrollo del tallo y el de la raíz, al mismo tiempo la formación de hojas. Este resultado también tiene relación con lo afirmado por **VALMAYOR** en 1972, donde afirma que el endosperma líquido del coco solamente permite una pobre diferenciación en protocormos de *Dendrobium*, *Vanda* y *Cattleya*, mientras que su combinación con extractos de plátano resulta en un buen desarrollo de raíces y tallos.

Las plántulas que se encontraban en las botellas con medio de cultivo con coco desproteinizado y endosperma líquido de coco (T₂) fueron los que menos tamaño alcanzaron y adquiriendo un color amarillo pálido y truncaron sus desarrollo, sin llegar a fenolizar; esto debido a la falta de nutrientes en el medio y también al exceso de fitohormonas contenidas en su composición, lo que impidió que las plántulas se desarrollen de forma normal, también cabe indicar que este medio de cultivo carece de fertilizante bayfolan lo que se deduce que a la falta de nutrientes las plántulas no se desarrollaron de forma normal comparados a los demás tratamientos durante esta fase; este resultado concuerda con lo afirmado por **ESPINOZA** en el 2001, en donde menciona que el endosperma líquido de coco contiene fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) que ayudan a un mejor desarrollo de las plántulas, siempre y cuando las concentraciones deben estar estandarizadas, para evitar problemas durante su desarrollo.

6.9. Número de raíces.

6.9.1 Para *Cattleya* spp. El cuadro N° 34, representa el análisis de varianza respecto al número de raíces en la fase de desarrollo y enraizamiento de *Cattleya* spp., con valores para el C. V. con 6,14% y un R^2 con 85,11%, estos datos corroboran la confiabilidad de la información obtenida en la investigación. El gráfico N° 16 muestra el resultado de la prueba de Duncan con respecto al número de raíces en la etapa de desarrollo, en el factor medio de cultivo se observa que existe mínima diferencia entre los tratamientos T_4 con 2,56 que supera a los tratamientos T_3 con 2,52; que supera a T_1 con 2; que supera a T_0 con 1,9; el mismo que supera a T_2 con 1,89; donde T_4 obtuvo el mayor número de raíces formadas; esto nos indica que el medio de cultivo con la adición de plátano y endosperma líquido de coco tiene un mejor resultado para el enraizamiento de plántulas de *Cattleya* spp.

6.9.2 Para *Oncidium lanceanum*. El cuadro N° 35 representa el análisis de varianza respecto al número de raíces en la etapa de desarrollo y enraizamiento de *Oncidium lanceanum*, con valores para el C. V. con 8,34% y un R^2 con 86,32%, estos datos corroboran la confiabilidad de los datos obtenidos en la investigación. En el gráfico N° 17 se observa el resultado de la prueba de Duncan con respecto al número de raíces en la etapa de desarrollo y enraizamiento, en el factor medio de cultivo se observa una mínima diferencia entre los tratamientos T_4 con 2,95 que supera a los tratamientos T_3 con 2,89; que supera a T_1 con 2,18; que supera a T_0 con 2; el mismo que supera a T_2 con 1,8; esto

corroborar la información obtenida con *Cattleya* spp., lo que muestra que el medio de cultivo con la adición de plátano y endosperma líquido de coco es adecuado para el enraizamiento de plántulas de orquídeas *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*.

El medio de cultivo que desarrolló mayor número de raíces fue el T₄ tanto para *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum* ya que contenía en su composición plátano y endosperma líquido de coco (que contiene fitohormonas). Según en lo referente a auxinas, **ARDITTI (1990)**, menciona que las plántulas responden a los cambios de medio y la composición que contengan, como el caso de auxinas que actúa directamente en la formación de raíces, así como las condiciones ambientales controladas (temperatura, luz y humedad relativa, fotoperíodo 16/8). Se menciona también que para la fase de enraizamiento, se utiliza las mismas sales M&S, omitiéndose la citoquinina (BAP). Complementado con 1,5 g/l de carbón activado, 20 g/l de sacarosa y agregando auxinas (ANA) mencionado por **AVECES (2000)**.

ESPINOZA (2001), menciona que el endosperma líquido de coco contiene fitohormonas que ayudan a un mejor desarrollo de las plántulas, siempre y cuando las concentraciones son variadas y que ayuden al desarrollo y a la formación de raíces de las mismas.

6.10. Costos.

6.10.1 Costos de los medios de cultivo para germinación. Los cuadros N° 13, 14, 15, 16 y 17 muestran los costos de los diferentes medios de cultivo, los mismos que representan los tratamientos del trabajo de

investigación, en donde podemos comparar los costos que van con los siguientes precios: T_0 con S/. 17,84 el litro de medio de cultivo, T_1 con S/. 14,89 el litro, T_2 con S/. 13,1 el litro, T_3 con S/. 14,03 el litro y T_4 con S/. 14,96 el litro, como se puede observar en los cuadros de varianza y en los gráficos de las pruebas de Duncan los mejores resultados obtenidos en la investigación corresponden a los tratamientos T_0 , T_3 y T_4 si realizamos una observación minuciosa el T_0 (Testigo), nos resulta más costoso que el tratamiento T_3 y T_4 , en este caso el tratamiento que mejor resultado dio fue el T_4 que mantiene una diferencia de dos y 88/100 nuevos soles (S/. 2,88), lo que implica un ahorro de este monto para el productor, esto solo para un litro de medio de cultivo, si lo vemos desde el punto de vida de producción entonces estamos hablando de 50 litros de medio de cultivo a más, por lo que se tendría un ahorro de S/. 144,00 a más.

6.10.2 Costos de los medios de cultivo para desarrollo y enraizamiento.

En los cuadros N° 13, 14, 15, 16 y 17 se muestran los costos de los diferentes medios de cultivo (Tratamientos), como se puede observar los costos van desde T_0 con S/. 17,96 el litro de medio de cultivo, T_1 con S/. 14,03 el litro, T_2 con S/. 12,29 el litro, T_3 con S/. 12,22 el litro y T_4 con S/. 14,12 el litro, los cuadros de varianza y los gráficos de las pruebas de Duncan muestran que los mejores resultados obtenidos en la investigación corresponden a los tratamientos T_0 , T_3 y T_4 esto indica que el T_0 (Testigo), nos resulta más costoso que los tratamientos T_3 y T_4 , en este caso el tratamiento que mejor resultado dio fue el T_4 que

mantiene una diferencia de tres y 84/100 nuevos soles (S/. 3,84), lo que implica un ahorro de este monto para el productor, esto solo para un litro de medio de cultivo, si lo vemos desde el punto de vida de producción entonces estamos hablando de 50 litros de medio de cultivo a más, por lo que se tendría un ahorro de S/. 192,00 a más.

6.10.3 Costos de producción de una planta In Vitro. En los ítems anteriores se muestran solo los costos de los medios de cultivo, si a éstos los agregamos el costo de la energía consumida por la cámara de flujo laminar y la energía consumida por los fluorescentes usados para la incubación de las semillas hasta sus completo desarrollo (plantas listas para la aclimatación), que corresponde un promedio de 9 meses, al mismo tiempo le adicionamos la cantidad en litros de medios de cultivo utilizado hasta esta etapa, entonces tenemos los costos de producción de una planta in Vitro, en el anexo N° 2 se muestran los costos que comprenden para las plantas producidas con el $T_0 = S/. 0,50$; $T_1 = S/. 0,44$; $T_2 = S/. 0,39$; $T_3 = S/. 0,43$ y $T_4 = S/. 0,40$; como se puede observar los tratamiento T_2 y T_4 muestran el menor costo de producción, pero si revisamos los cuadros de análisis de varianza y los gráficos de las pruebas de Duncan nos damos cuenta que el tratamiento T_2 no muestra diferencia significativa, pero el tratamiento T_4 si lo que indica que producir plantas in Vitro utilizando este medio de cultivo resulta más rentable para el productor, esto si lo observamos desde el punto de vista de producción a gran escala.

VII. CONCLUSIONES



- 7.1. El protocolo establecido durante el proceso de propagación *in Vitro* de las especies *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*, permitió la germinación de las semillas, formación de protocormos, desarrollo y enraizamiento de las plántulas.
- 7.2. Se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo T₄ (con la adición de plátano seda), T₃ (con la adición de endosperma líquido de coco), T₂ (solo con coco desproteínizado), T₁ (solo con fertilizante) y el medio de cultivo M & S (T₀) modificado para la germinación de semillas de las especies *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*. Siendo el más adecuado el medio T₄.
- 7.3. La utilización de sustancias orgánicas complejas como el plátano seda homogeneizado (40 g/l) y endosperma líquido de coco (100 ml/l), en la composición de los medios, tienen efecto en la rápida diferenciación de los protocormos y el desarrollo vegetativo y radicular de las plántulas.
- 7.4. En la etapa de desarrollo y enraizamiento, en lo referente a número de hojas y altura de plántula de *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*, el tratamiento que dio mejores resultados fue el T₄ con resultados de 4 y 12 mm respectivamente para *Cattleya* spp., para *Oncidium lanceanum* 4,5 y 28,3 mm respectivamente; todo ello debido al efecto de los nutrientes agregados al medio de cultivo, esto a 24 semanas después de la siembra.

- 7.5. En la etapa de desarrollo y enraizamiento, en lo referente a número de raíces de *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*, el tratamiento que dio mejores resultados fue el T₄ con 2,5 raíces en promedio para *Cattleya maxima* y 2,9 para *Oncidium lanceanum*, esto a 24 semanas después de la siembra, todo ello debido al efecto del fertilizante, vitaminas y sustancias orgánicas complejas, utilizados en la composición del mismo.
- 7.6. El costo para la preparación de un litro de medio de cultivo T₄ resulta ser menor que el costo de un litro de medio de cultivo T₀ (que hasta la actualidad se viene utilizando para la propagación in Vitro de orquídeas), en S/. 2,88 para germinación y S/. 3,84 para desarrollo y enraizamiento. Lo que implica el aumento del costo de producción de una planta in Vitro, esto mirándolo desde el punto de vista de producción a gran escala.

VIII. RECOMENDACIONES



- 8.1. Emplear herramientas apropiadas para la siembra in Vitro de orquídeas (*Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*), para evitar contaminación; al mismo tiempo se recomienda el uso de las botellas de vidrio de 18 X 6 cm. para el proceso del cultivo.
- 8.2. Utilizar el medio de cultivo con la adición de sustancias orgánicas complejas como el plátano seda homogenizado y el endosperma líquido de coco (Tratamiento T₄) para la producción masiva de orquídeas de las especies *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum*, en las dos etapas (germinación y desarrollo).
- 8.3. Realizar ensayos de propagación in Vitro de otras especies de orquídeas utilizando el medio de cultivo casero con la adición de sustancias orgánicas complejas como el plátano seda homogenizado y el endosperma líquido de coco (Tratamiento T₄).
- 8.4. Evaluar posteriormente otros agentes gelidificantes que reemplacen al agar – agar utilizado para el presente trabajo de investigación, de esta manera se estará abaratando más los costos de producción de plantas utilizando el cultivo in Vitro.

- 8.5. Continuar con diferentes trabajos de investigación en especies de orquídeas en peligro de extinción utilizando el medio de cultivo con plátano seda homogenizado y endosperma líquido de coco (Tratamiento T₄).
- 8.6. El LCTV de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, debe empezar a producir orquídeas con miras a la producción a gran escala utilizando el medio de cultivo con plátano seda homogenizado y endosperma líquido de coco (Tratamiento T₄).

IX. RESUMEN



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, con el objetivo de evaluar la eficiencia de cinco medios de cultivo *in Vitro* para germinación, desarrollo y enraizamiento en *Cattleya* spp. y *Oncidium lanceanum* a partir de semillas, para obtener plántulas libres de patógenos y se adecuó a un diseño completamente al azar, 5 x 10 (medios de cultivo) y 10 repeticiones.

Las semillas en un promedio de 30 días después de la siembra en un medio de germinación, comenzaron a germinar y empezar su desarrollo y formación de protocormos, observando un nivel muy bajo de contaminación luego de 2 semanas, esto debido a la asepsia que se manejó al momento de la introducción de semillas a condiciones *in Vitro* y en todo momento durante el repique y transferencia de las plántulas de un medio de germinación a uno de desarrollo y enraizamiento.

A las 24 semanas después de la siembra en medio el de desarrollo y enraizamiento (Fase II), las plántulas mostraron un resultado promedio de 4 hojas para *Cattleya* spp. y 4,5 hojas para *Oncidium lanceanum*, con una altura en mm de 12,0 para *Cattleya* spp. y 28,3 para *Oncidium lanceanum*; 2,5 raíces para *Cattleya* spp. y 2,9 raíces para *Oncidium lanceanum*, estos datos solo para el tratamiento T₄, que demostró mayor eficiencia en todo el proceso de propagación *in Vitro* de las especies mencionadas.

Se muestra el costo de cada medio de cultivo empleado para el trabajo de investigación, los mismos que representan los cinco tratamientos, al mismo tiempo

se determinó el costo de producción de una planta producida en condiciones in Vitro, con estos datos se muestran que los costos de producción del cultivo in Vitro de especies de orquídeas no son elevados puesto que con el presente trabajo de investigación se demostró que los costos de producción se pueden minimizar utilizando el medio de cultivo con plátano seda homogenizado y endosperma líquido de coco (Tratamiento T₄).

SUMMARY

This work was executed in the Plant Tissue Culture Laboratory at the National University of San Martín – Tarapoto. Its objective was to assay five different culture media for in vitro germination and development in Peruvian orchids *Cattleya* spp. and *Oncidium lanceanum*, they were sown from seeds using the green pod method and the statistical used was an ANOVA in a completely randomized design with five treatments and ten repeats each.

Seeds started germination and protocorm development 30 days after sowing in a germination culture media, with a very low levels of contamination, recorded after two weeks after sowing, because the aseptic conditions at replating from germination to development and rooting culture media.

24 weeks after sowing in culture medium for development and rooting (Phase II), plantlets developed, in average values: 04 leaves for *Cattleya* spp. and 4,5 leaves for *Oncidium lanceanum*, with 12.00mm high for *Cattleya* spp., 28.3mm for *Oncidium lanceanum*; 2.5 roots in *Cattleya* spp. And 2.9 roots for *Oncidium lanceanum*. These data belong to Treatment 04, the treatment with best results for the whole process of orchid propagation in vitro.

Costs of production for every culture media used (five treatments) was determined. In the same way, costs of production for a plantlet produced under in vitro conditions were determined. These data shown a noticeable reduction in costs when using banana homogenated and coconut milk (Treatment 04) as culture media components.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **ACEVES, R. J.L. 2000.** Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in Vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. Veracruz – México. Pp: 12, 25 – 51.
2. **ARDITTI, J. 1967.** Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. Bot. Rev. 33, 1 – 97.
3. **ARDITTI, J. 1977.** Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture _ A Manual. Pag. 203 – 293. En : Arditti (editor) Orchid Biology: reviews and Perspectives Vol. I Croneli University Press. Ithaca, New York.
4. **ARDITTI, J. 1982.** Orchid seed germination and seedling culture – A. Manual. En J. Pp: 145 – 153.
5. **ARDITTI, J. 1984.** An History of Orchid Hibridization, Seed Germination and Tissue Culture. Bot. J. Linn. Soc. 89 New York. Pp: 359 – 381.
6. **ARDITTI, J. 1990.** Lewis Knudson: His Science, His times and his legacy. Lindleyana. 5 Pp 1 – 79.
7. **ARDITTI, J. 1993.** Micropropagation of orchids. J. Wiley & Sons Inc. New York. Pp 520 – 521.

8. **BERNARD, N. 1909.** L'évolution dans la Symbiose, les Orchidées et leur Champignons Comensaux. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 9: 1-196.
9. **CALZADA, B. 1982.** Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial Milagros S. A. Lima – Perú 644p
10. **DELGADO, H. 2001.** "Propagación in vitro de plátano, piña, y orquídeas en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la UNSM" Informe de prácticas Pre Profesionales. Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSM
11. **DONAYRE T. A. 2000.** Métodos en la Propagación de semillas de orquídea Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. UNMSM. Lima – Perú. Pp: 42, 51 – 57.
12. **ESPINOZA, G. A. 2001.** Proliferación de *Rhynchosste bictonlense* (orchidaceae) a partir de semillas y explantes de material cultivado *in Vitro*. Universidad Nacional Autónoma de México – Laboratorio de Cultivo de Tejido vegetales. Pp: 95 y 102.
13. **HOLDRIDGE, L. R. 1978.** Ecología Basada en zonas de vida. IICA. San José – Costa Rica. 216 p.
14. **KHALIFAH, R. 1966a.** Indole-Acetic Acid From the Developing Banana Fruit. Nature 212, 1471-1472.

15. **KHALIFAH, R. 1966b.** Giberelin-like substances from the developing banana fruit. *Plant. Phys.* 41, 771-773.
16. **LEON, M. 1995.** Tesis "Conservación de Especies Peruanas de Orquídeas Utilizando Técnicas de Cultivo de Tejidos In Vitro. UNALM. Pp: 14 – 15.
17. **MACHADO, D. 2003.** Orquídeas. Manual práctico de reproducción. Editorial Expressão e Cultura. Pp: 5 – 9.
18. **OSPINA, M. 1968.** "La desaparición de vallosas orquídeas nativas de América Latina". *Orquideología*, Vol.III, Nro.2. Colombia. Pag: 29-38.
19. **PIERIK, R. L. M. 1989.** Cultivo in Vitro de las plantas superiores. Pp: 24 y 87.
20. **PRTCHAR, H. W. 1989.** Modern methods in orchid conservation the role of physiology, ecology and management. University of Cambridge the pitt Building. New York – USA. Pp: 61 – 74.
21. **ROCA, W. y L. MROGINSKI 1991.** Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Pp. 499 - 553 –554.
22. **RUÍZ, R. 2003.** "Micropropagación y determinación cromosómica del género *Crotón* productoras de látex". Pp: 37 – 42.

23. **SELENA, L. A. 1999.** Propagación in Vitro de orquídeas a partir de semilla sexual. Universidad de Caldas – A. A. – Manizales – Colombia. Pp: 29, 81 – 86.
24. **SINGH, F. 1981.** Differential Staining of Orchid Seeds for Viability Testing. Amer. Orchid Soc. Bull. 50: 416-418.
25. **SNOW, R. 1985.** Improvements in Methods for The Germination of Orchid Seeds. AOS. Bull. Vol: 54 Nro.2, Pag: 179-182.
26. **STEWART, F. C. AND N. W. SIMMONDS 1954.** Growth Promoting Substances in the Ovary and Inmature Fruit of the Banana. Nature 173, 1083-1084.
27. **VALMAYOR, H. 1972.** Further Investigation into Nutrient Media. Proc. 7th World Orchid Conf. Colombia 211-229.
28. **WEATHERHEAD and G. HENSHAW, 1979.** Effects of Activated Charcoal as an Additive to Plant tissue Culture Media: Part 2. Z. Pflanzenphysiol. 89: 399-405
29. **WEATHERHEAD, J.; E. BURDON and G. HENSHAW. 1978.** Some Effects of Charcoal as an Additive to Plant Tissue Culture Media. Z. Pflanzenphysiol. 89: 141-147.

30. **YAM, T.; R. ERNST; J. ARDITTI; H. NAIR and M. WEATHERHEAD. 1990.**
Charcoal in Orchid Seed Germination and Seedling Culture. *Lindleyana*
5 (4), 256-265.

XI. ANEXOS

Anexo N° 01: Análisis de costos totales de los medios de cultivos.

costo de medios de cultivo y E°	Cantidad	precio unitario	Sub total
Medio germinación T0	2	17,84	35,68
Medio germinación T1	1	14,88	14,88
Medio germinación T2	1	13,10	13,10
Medio germinación T3	1	14,03	14,03
Medio germinación T4	1	14,96	14,96
Medio desarrollo T0	2	17,96	35,93
Medio desarrollo T1	2	14,03	28,06
Medio desarrollo T2	1	12,29	12,29
Medio desarrollo T3	2	12,34	24,68
Medio desarrollo T4	1	14,12	14,12
Subtotal			207,72
E° consumida por la cámara de flujo	Cantidad	precio unitario	Sub total
Medio germinación T0	2	2,52	5,04
Medio germinación T1	1	2,52	2,52
Medio germinación T2	1	2,52	2,52
Medio germinación T3	1	2,52	2,52
Medio germinación T4	1	2,52	2,52
Medio desarrollo T0	2	4,54	9,07
Medio desarrollo T1	2	4,54	9,07
Medio desarrollo T2	1	4,54	4,54
Medio desarrollo T3	2	4,54	9,07
Medio desarrollo T4	1	4,54	4,54
Subtotal			51,41
E° consumida en incubación	meses	precio/mes	Sub total
E° consumida por 2 fluorescentes al mes	9	17,28	155,52
Total de costo de producción/tratamiento			Total
Tratamiento T0			241,24
Tratamiento T1			210,05
Tratamiento T2			187,96
Tratamiento T3			205,82
Tratamiento T4			191,65

Leyenda: E° = Energía

* Los costos totales corresponden a la sumatoria de todos los costos, incluido el costo de la energía consumida.

Anexo N° 02: Costos de producción de una planta producida in Vitro.

Tratamiento	Costo	N° botellas	N° plantas	Costo/planta
T ₀	241,24	10	48	0,50
T ₁	210,05	10	48	0,44
T ₂	187,96	10	48	0,39
T ₃	205,82	10	48	0,43
T ₄	191,65	10	48	0,40

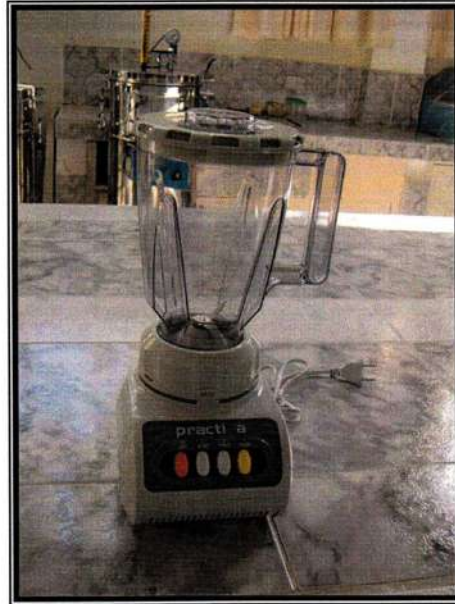
Anexo N° 03: Fertilizante utilizado para la preparación de los medios de cultivo.



Anexo N° 04: Complejo B+Zn, usado como fuente vitamínica de los medios de cultivo



Anexo N° 05: Licuadora utilizada para el homogenizado de plátano seda.



Anexo N° 06: Botellas de whisky Jonnie Walker usadas para el trabajo de investigación.



Anexo N° 07: Diferencia entre los tratamientos en la fase de germinación



Anexo N° 08: Desarrollo de plántulas en los tratamientos T₁ y T₂.



Anexo N° 09: Primer ensayo para la segunda fase en T₄ con *Cattleya rex* y
Phalaenopsis sp.



Anexo N° 10: Incubación de las semillas sembradas en los medios de cultivos.



Anexo N° 11: Flor de *Cattleya rex* y *Cattleya maxima*.



Foto de la flor de *Cattleya rex*

Fuente: GÁLVEZ, Roger (2008)



Foto de la flor de *Cattleya maxima*

Fuente: GÁLVEZ, Roger (2008)

Anexo N° 12: Flor de *Oncidium lanceanum*.



GLOSARIO

ANA	Ácido naftalacetico
AUXÍNA	Hormona vegetal que ocasiona el crecimiento de las plantas por elongación celular.
BAP	Ácido naftaleneacetico
CÁPSULA	Fruto seco, con una o más cavidades que contienen varias semillas y cuya dehiscencia se efectúan según el plano que no es perpendicular al eje del fruto.
CITOQUININA	Grupo de reguladores de crecimiento que induce a la formación de yemas y multiplicación celular.
DEHISCENCIA	Acción de abrirse naturalmente las anteras de una flor o el pericarpio de un fruto, para dar salida al polen o a la semilla.
ENRAZAR	Agregar, nivelar con agua o solución.
EMBRIÓN	En las plantas fanerógamas, esbozo de la futura planta, contenido en la semilla.
FENOLIZACIÓN	Coloración marrón del protocormo por muerte a causa de formación de fenoles en el medio de cultivo.

IN VÍTRO	Cultivo en vidrio
INHIBICIÓN	Componente de los sistemas de regulación, fisiológicos, que actúan en los seres vivos.
LCTV	Laboratorio de Cultivo de tejidos Vegetales
PROTOCORMO	Estructura diferenciada formada del desarrollo de las semillas, para luego formarse una plántula en condiciones in Vitro.
SIMBIOSIS	Asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, sobre todo si los simbiotes sacan provecho de la vida en común.
STOCK	Cantidad de componentes que se tienen en una sola solución.
TESTA	Cubierta externa de la semilla, derivada del tegumento y de consistencia y dureza variables.
TTZ	Trifenil tetrazolium
VITRIFICACIÓN	O hiperhidratación. Cambios en las hojas, tallo y raíces que les dan una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y translúcida.