

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL



**“DESARROLLO DE PROTOCOLO PARA LA
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL *Phragmipedium kovachii*
Atwood Dalström & Fernández (Orchidaceae) A PARTIR
DE SEMILLAS”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGRONOMO

Presentado por el:

BACH. ROGER ALY GÁLVEZ PANDURO

TARAPOTO - PERÚ

2005



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

AREA DE BIOLOGÍA

TESIS

**“DESARROLLO DE PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DEL
Phragmipedium Kovachii Atwood, Dalström & Fernández (Orchidaceae) A
PARTIR DE SEMILLAS”**

PRESENTADO POR: BACH.

ROGER ALY GÁLVEZ PANDURO

Miembros del Jurado



Ing. M. Sc. Jorge Sánchez Ríos

Presidente



Ing. M. Sc. Orlando Ríos Ramírez

Miembro



Ing. Elías Torres Flores

Miembro



Blgo. M. Sc. Winston F. Ríos Ruiz

Asesor



Bach. Roger Aly Gálvez Panduro

Tesista

DEDICATORIAS

Con todo cariño, respeto y amor a mi familia.

A mis padres RICARDO y FLOR DE MARÍA, por el impulso que me brindan en todo momento para salir adelante en mi futuro profesional.

A OMAR, CLAUDIA ALEJANDRA y HERNAN, 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.

AGRADECIMIENTOS:

- Al Biólogo M. Sc. **WINSTON FRANZ RÍOS RUÍZ**, por su apoyo incalculable como asesor de la presente tesis.
- Al Biólogo **MARCO ANTONIO LEÓN MARTÍNEZ**, por su apoyo como coasesor de la presente tesis.
- A los Ingenieros **LUIS FEDERICO MENDO ALEGRÍA, HENRI DELGADO HAYA y JIM DICKERSON VÁSQUEZ** por su apoyo incondicional como apoyo durante la tesis en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.
- A los Bachilleres en Agronomía: **FRANCISCO ARÉVALO ARMAS, SEGUNDO AMASIFUEN VÁSQUEZ, TITO ROJAS REÁTEGUI y OBDELIO BARRERA RENGIFO**, por su apoyo como compañeros Tesistas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales.
- A todos mis **MAESTROS**, a quienes considero como pilares para mi formación en mi vida profesional.

GLOSARIO

ANA	Ácido naftalacetico
AUXÍNA	Hormona vegetal que ocasiona el crecimiento de las plantas por elongación celular.
BAP	Bencil amino purina
BRACTEA	Hoja que nace del pedúnculo de las flores de ciertas plantas, y suele diferir de la hoja verdadera por la forma, la consistencia y el color.
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.
ESCAPO	Tallo herbáceo, florífero, sin hojas, que arranca de la parte baja del vegetal y lleva las flores en su ápice.

IN VÍTRO	Cultivo en vidrio
INHIBICIÓN	Componente de los sistemas de regulación, fisiológicos, que actúan en los seres vivos.
LABELO	estructura modificada de un pétalo.
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.
RIZOMA	Tallo horizontal y subterráneo, como el del lirio común.
SIMBIOSIS	Asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, sobre todo si los simbiosiontes 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	Hacer que algo adquiera las apariencias del vidrio.

CONTENIDO

	Págs.
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	
3.2.1. Propagación por semillas.	06
3.2.2. Ventajas y desventajas de la propagación <i>in Vitro</i>	07
3.3. Características generales del género <i>Phragmipedium</i> ...	08
3.3.1. Descripción general.	
3.3.2. Condiciones Edafológicas.	
3.4. Algunas especies del género <i>Phragmipedium</i> existentes en el Perú	09
3.5. Taxonomía de la especie <i>Phragmipedium kovachii</i> <i>Atwood Dalström & Fernández</i>	10
3.5.1. Características de la especie <i>Phragmipedium</i> <i>kovachii Atwood Dalström & Fernández</i>	11
3.5.2. Descripción general.	12
3.6. Propagación <i>In Vitro</i> de la especie <i>Phragmipedium</i> <i>Besseae Dodson & Kuhn</i>	13
3.6.1. Selección del material genético.	
3.6.2. Desinfección de las semillas.	
3.6.3. Establecimiento de las semillas.	
3.6.4. Traspaso de las plántulas para su crecimiento.	

3.7.	Situación actual de la especie <i>Phragmipedium kovachii</i> <i>Atwood Dalström & Fernández</i> en el Perú y el mundo.....	15
3.7.1.	Problemas legales de esta especie.	16

IV. MATERIALES Y MÉTODO

4.1.	Ubicación del experimento.	18
4.2.	Materiales	19
4.3.	Metodología	21
4.3.1.	Proceso de la propagación <i>in Vitro</i> de <i>Phragmipedium kovachii</i> <i>Atwood Dalström &</i> <i>Fernández.</i>	
a.	Selección y transporte del material de inicio.	
b.	Preparación y desinfección de cápsula abierta.	
c.	Establecimiento de las semillas	
d.	Multiplicación de los protocormos.	
e.	Enraizamiento de las plántulas.	
4.4.	Diseño experimental	33
4.4.1.	Medios de Cultivo.	
4.4.2.	Procedimiento para la preparación del medio de cultivo.	
4.4.3.	Especie	
4.4.4.	Análisis de varianza.	
4.4.5.	Modelo Matemático.	
4.5.	Evaluaciones realizadas	38
4.5.1.	Establecimiento de las semillas	
4.5.2.	Multiplicación de protocormos.	
4.5.3.	Etapa de enraizamiento.	

V. RESULTADOS

5.1. Evaluación del establecimiento de semillas	42
5.2. Etapa de multiplicación	46
5.3. Etapa de enraizamiento	50

VI. DISCUSIÓN 58

VII. CONCLUSIONES 68

VIII. RECOMENDACIONES 69

IX. RESUMEN 70

X. SUMMARY 71

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

XII. ANEXOS 75

ÍNDICE DE FOTOS

N°		Págs.
1.	Descripción general del <i>Phragmipedium kovachii</i>	11
2.	Ubicación del <i>Phragmipedium kovachii</i> en San Martín (Moyobamba)...	15
3.	Flor del <i>Phragmipedium kovachii</i>	17
4.	<i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández	17
5.	Planta de <i>Phragmipedium kovachii</i>	21
6.	Cápsula de <i>Phragmipedium kovachii</i>	22
7.	Cápsula de <i>Phragmipedium kovachii</i> cosechada	22
8.	Uso de la Jeringa	23
9.	Semillas vistas al microscopio	24
10.	Partes de una semilla de <i>Phragmipedium kovachii</i>	24
11.	Proceso de desinfección de las semillas	25
12.	Obtención de las semillas de la jeringa con la ayuda de una pinza.	26
13.	Separación de las semillas del algodón para la siembra.....	26
14.	Siembra de semillas en tubos de ensayo	27
15.	Sellado y etiquetado	27
16.	Cuarto de incubación para las semillas sembradas	27
17.	Germinación de las semillas de <i>Phragmipedium kovachii</i> en un medio de cultivo	28
18.	Rompimiento de testa en medio de germinación	29
19.	Desarrollo de las semillas	30
20.	Protocormos en etapa de desarrollo	30
21.	Etapas de desarrollo hasta formar plántulas	30
22.	Formación de protocormos a plántulas pequeñas	31
23.	Formación de protocormos a plántulas pequeñas	31
24.	Plántulas de <i>Phragmipedium kovachii</i> en formación de raicillas.....	31
25.	Momento del transplante	32

26.	Siembra en momento de enraizamiento	32
27.	Viabilidad	38
28.	Contaminación	39
29.	Preparación de medio de cultivo	76
30.	Tubos de ensayo con medio de cultivo para <i>Phragmipedium</i>	76
31.	<i>Phragmipedium</i> en fase de enraizamiento	77
32.	Enraizamiento (a)	77
33.	Enraizamiento (b)	77
34.	Enraizamiento (c)	77
35.	Proceso de floración del <i>Phragmipedium kovachii</i>	78
36.	Ubicación de la especie <i>Phragmipedium kovachii</i> en San Martín	79

ÍNDICE DE CUADROS

N°		Págs.
1.	Componentes y Dosis del medio de cultivo para germinación	33
2.	Medios de Cultivo Para fase de multiplicación	34
3.	Medios de cultivo en la fase de enraizamiento	35
4.	Análisis de varianza del experimento en la fase de multiplicación y enraizamiento	37
5.	Viabilidad de las semillas de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández, expresado en porcentajes	42
6.	Número de tubos de <i>Phragmipedium kovachii</i> contaminados en medio de cultivo (Germinación) expresado en proporción en dos momentos de siembra después de 2 semanas	43
7.	Porcentaje de germinación de semillas de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández en un medio de germinación a los 30 días de la siembra	44
8.	Velocidad de rompimiento de testa de semillas de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández a los 60 días después de la siembra, en un medio de germinación durante cuatro evaluaciones expresado en cantidad	45
9.	Cuadro de observación del número de protocormos de color verde (Vivos) y marrón o fenolizados (muertos) a los 90 días después de la siembra	46
10.	Análisis de varianza para determinar el número de hojas de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández en etapa de multiplicación a las 20 semanas después de la siembra	47
11.	Prueba de Duncan para el determinar el número de hojas de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández a las 20 semanas después de la siembra	47
12.	Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas de <i>Phragmipedium kovachii</i> en medio de desarrollo a las 20 semanas	

	después de la siembra	48
13.	Prueba de Duncan para el determinar la altura de plántulas de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández a las 20 semanas después de la siembra	49
14.	Correlación promedio entre número de hojas y altura de plántula en fase de multiplicación.....	49
15.	Análisis de varianza para determinar el número de hojas de <i>Phragmipedium kovachii</i> en medio de enraizamiento a 35 semanas después de la siembra	50
16.	Prueba de Duncan para el determinar el número de hojas de <i>Phragmipedium kovachii</i> a las 35 semanas después de la siembra	51
17.	Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas en mm de <i>Phragmipedium kovachii</i> en medio de enraizamiento a 35 semanas después de la siembra	52
18.	Prueba de Duncan para el determinar la altura de plántulas en mm de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández a las 35 semanas después de la siembra	52
19.	Análisis de varianza para determinar el número de raíces del <i>Phragmipedium kovachii</i> en medio de enraizamiento a 40 semanas después de la siembra	53
20.	Prueba de Duncan para el determinar el número de raíces a las 40 semanas después de la siembra.....	54
21.	Análisis de varianza para determinar la longitud de la raíces en mm <i>Phragmipedium kovachii</i> en medio de enraizamiento a 40 semanas después de la siembra	55
22.	Prueba de Duncan para el determinar la longitud de raíces en mm a las 40 semanas después de la siembra	55
23.	Correlación entre el promedio de número de hojas y altura de plántula de <i>Phragmipedium kovachii</i> en fase de enraizamiento.....	56
24.	Correlación entre el promedio de número de raíces y longitud de raíces de <i>Phragmipedium kovachii</i> en fase de enraizamiento	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

N°		Págs.
1.	Viabilidad de las semillas	42
2.	Contaminación expresado en porcentaje	43
3.	Velocidad de rompimiento de testa	46
4.	Promedio del número de hojas en medio de multiplicación	48
5.	Promedio de altura de plántulas en medio de multiplicación	49
6.	Correlación entre número de hoja y altura de plántula en fase de multiplicación	50
7.	Promedio del número de hojas en medio de enraizamiento	51
8.	Promedio de altura de plántulas en medio de enraizamiento	53
9.	Promedio del número de raíces	54
10.	Promedio de longitud de raíces	56
11.	Correlación número de hojas y altura de plántula	57
12.	Correlación numero y longitud de raíces	57
13.	Esquema del proceso de propagación in Vitro de <i>Phragmipedium kovachii</i> Atwood Dalström & Fernández	75

I. INTRODUCCIÓN

Los bosques tropicales de nuestro país, sufren constantemente un proceso de degradación, debido al incremento de áreas para la agricultura, la tala y quema indiscriminada de los bosques, el cual hace que se pierda material genético, que aún no presentan una identificación completa y otras aun no descubiertas, **LEON (1 995).**

La gran mayoría de especies existentes en los bosques, como es el caso de orquídeas, sufren también una disminución de su población, debido a la agricultura, la tala de los bosques y la extracción de su hábitad natural, para luego ser comercializadas ilegalmente sin poder hacer nada para evitarlo.

En el caso del *Phragmipedium kovachii*, especie recientemente descubierta y ubicada en el departamento de San Martín, esta siendo depredada y comercializada sin permiso alguno y si no hacemos nada para evitarlo puede llegar a desaparecer. Pero, esto podemos llegar a solucionar aplicando técnicas de propagación *in Vitro* a partir de semillas, siempre y cuando se asegure su reproducción en cantidades adecuadas y en menor tiempo. Las plantas propagadas de esta especie serían distribuidas a viveros comerciales y zonas de reserva, con el fin de disminuir la extracción de esta especie de su hábitad natural.

En nuestro país además existen laboratorios de propagación *in Vitro*, que pueden contribuir a recuperar especies de *Phragmipedium* y otras especies de orquídeas, que están en proceso de extinción. De esta forma estaríamos comercializando sin la necesidad de realizar recolectas continuas en el hábitad de interés para proveerse de material vegetal.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Desarrollar un protocolo para la propagación *in Vitro* de plántulas de *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalström & Fernández a partir de semillas hasta enraizamiento.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar un medio de cultivo en la germinación *in Vitro* de semillas de *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalström & Fernández.
- Evaluar tres medios de cultivo para la multiplicación de protocormos de la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalström & Fernández.
- Evaluar tres medios de cultivo para el enraizamiento de plántulas de *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalström & Fernández.

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, practica que fue adoptada por los cultivadores comerciales de su época, **ARDITTI (1984)**.

Posteriormente Noel Bernard realizo una serie de experimentos que le permitieron explicar el rol del hongo micorrízico en la germinación de semillas de orquídeas (Bernard 1990), 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, descubren la auxina (Ácido indol Acético). Hormona reguladora de crecimiento, estimula el desarrollo de raíces, **ARDITTI (1990)**.
- CAPLIN Y STEWARD en 1948, determinan que la "leche de coco" tiene un efecto en la formación de células aisladas de raíces de zanahoria, **ARDITTI (1990)**.
- SKOOG y MILLER en 1957, combinan auxinas y citoquininas, controlando la formación de brotes y raíces, **ARDITTI (1990)**.
- MURASHIGE y SKOOG en 1962, logran desarrollar el medio nutritivo que actualmente es el mas utilizado para mucha especies de orquídeas, **ARDITTI (1990)**.

- La semilla de la orquídea consta 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 (1 989)**.
- **SING**, demostró que el 2,3,5 trifenil -tretazolium es útil para determinar la viabilidad de las semillas, donde los embriones viables se tiñen de rojo, mientras que los no viables quedan blancos, **LEON (1 995)**.
- Los protocormos deben ser transferidos antes que induzcan hiperhidricidad o felonizar y luego mueran, **DELGADO (2 001)**.
- 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 (1 982)**.
- **Arditti 1 984**; **Pierik, et al, 1 988**, 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, **ESPINOZA (2 001)**.
- 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 (2 000)**.

- 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 (1 999)**.
- 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 BA a 2 mg/l y ANA 0.3 mg/l, **ACEVES (2 000)**.
- 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 (BA). Complementado con 1.5 gr/l de carbón activado, 20 gr/l de sacarosa y agregando auxina (ANA), las condiciones de incubación fueron las mismas que para las etapas anteriores, **ACEVES (2 000)**.
- Mauro M. & Arditti en 1 994, probaron la influencia de diferentes dosis de benzilaminopurina (BA) y ácido naftaleneacético (ANA), en el medio de cultivo Murashige y Skoog (M&S) en *Cattleya sp.* ellos sugirieron que para la multiplicación se utilizara el medio suplementado con la combinación de 10mg/l de BA y 0.1 mg/l de ANA, y para el desarrollo de plántulas con el incremento de hojas y raíz, se utilizara el medio suplementado con 10mg/l de ANA. **ESPINOZA (2 001)**.
- **Arditti y Ernest, 1 993**, varios aditivos se han usado en el cultivo *in Vitro*, tal es el caso del agua de coco, la cual posee una gran cantidad de componentes, entre ellos encontramos algunas fitohormonas con diferentes concentraciones como: auxinas, citocininas y giberelina y, se ha usado rutinariamente en un sinnúmero de métodos de propagación, **ESPINOZA (2 001)**.

3.2. Propagación *In Vitro* de orquídeas

ARDITTI (1 990) 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 y de columna), 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.

3.2.2. Ventajas y desventajas de la propagación *In Vitro*

Según CIRGEBV (1 994) las ventajas de las técnicas de propagación *in Vitro* de especies vegetales, pueden ser resumidas como sigue:

a. Ventajas

- Acelera el proceso de propagación y posibilita el rescate de especies en peligro de extinción.
- Permite la eliminación de patógenos, hongos, bacterias, virus, etc.
- Las plantas son de crecimiento y desarrollo vigoroso resultando más resistentes a enfermedades.
- Se puede realizar la propagación de plantas en un corto tiempo y espacio. Hace posible establecer bancos de germoplasma *in Vitro*.

b. Desventajas

- Los costos de instalación de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales son bastante elevados.
- Se debe de contar con personal calificado, y no disponibilidad de reactivos.
- La aclimatación de las plántulas producidas *in Vitro* ocasiona porcentajes altos de pérdidas de plántulas en esta fase.

3.3. Características generales del género *Phragmipedium*

El género *Phragmipedium* presenta las siguientes características morfológicas:

3.3.1. Descripción general

- Según **ZUIDERWIR (2 003)** proviene del nombre *Phragma* = separación o demarcación y el *pedium* (pedilón) = zapatilla o sandalia que apuntan a la forma del labio. Las plantas de este género son terrestres, otras son epífitas. Las hojas están plegadas a lo largo de su longitud, normalmente es verde ligero y pueden ser de tamaño variado. Las flores son derechas y surgen del centro de las hojas. Ellos desnudan flores múltiples que abren consecutivamente, dependiendo de las especies.
- La flor como en la mayoría de las especies de *Phragmipedium* abren en sucesión, pero en algunas especies abren una sola vez.

Un hecho notable sobre las flores es que cuando ella se cae de la inflorescencia parecen como si estarían frescos. Los granos de polen están unidos en la polinia, **ZUIDERWIR (2 003)**.

3.3.2. Condiciones edafológicas

Según **ATWOOT (2 002)** menciona que el *Phragmipedium* se adapta al agua limpia así como de lluvia y destilada, casi todos los *Phragmipedium* en su naturaleza crecen en un pH a partir de 5,5 a más bajo. Requieren una temperatura promedio de 20 a 25° C, es decir temperaturas intermedias, la luz no tanto les afecta su desarrollo ya que puede adaptarse bien.

La humedad que requieren estas especies es de aproximadamente 30 – 60 % dependiendo del hábitad donde se encuentran.

- **ATWOOD (2 002)** calcula que existe alrededor de 20 especies de este género, ubicadas desde el nivel del mar hasta los 900 – 1500 m.s.n.m. Ellos crecen en climas tropicales a subtropicales donde las condiciones sean favorables para su desarrollo.
- **OAKES y DONOVAN (1 952)** comentan que las orquídeas del género *Phragmipedium* tienen hábito terrestre, epífita y litófito, se encuentran distribuidos en todos los trópicos de América y viven entre los 900 a 2000 metros sobre el nivel del mar.
- **Mc COOK (1 988)** menciona que las orquídeas *Phragmipedium* han pasado por muchos nombres: *Cypripedium*, *Paphiopedium*, *Selenipedium*, *Uropedilum* y hasta *Phragmipedilum*, esta confusión de los taxonomistas reflejada desde la década de 1 830, a primera vista puede ser difícil de distinguir *Phragmipedium* de un *Paphiopedilum*, sin embargo la flor de *Paphiopedilum*, tiene un solo lóculo en su ovario y diferencias en el labelum.

3.4. Algunas especies del género *Phragmipedium* existentes en el Perú

Según **Mc. HATTON (2 003)** indica que actualmente existe especies de *Phragmipedium* descubiertas en el Perú, entre las cuales se encuentra el más importante como es el *Phragmipedium kovachii* como se menciona algunas:

1. 1 831 *Phragmipedium vitatum*
2. 1 840 *Phragmipedium caudatum*
3. 1 850 *Phragmipedium caricinum*
4. 1 852 *Phragmipedium longifolium*
5. 1 854 *Phragmipedium boissierianum*
6. 1 856 *Phragmipedium pearcei*
7. 1 873 *Phragmipedium wallisii*
8. 1 981 *Phragmipedium besseae*
9. 1 994 *Phragmipedium richteri*
10. 2 002 *Phragmipedium kovachii*

3.5. Taxonomía de la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalström & Fernández.

División : Spermatophyta

Ordén : Orchidales

Familia : Orchidaceae

Sub familia : Cyripedioidae

Tribu : Cyripedieae

Género : *Phragmipedium*

Especie : *Phragmipedium kovachii* Atwood,
Dalström & Fernández.

3.5.1. Características de la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood
Dalström & Fernáñez

Según ATWOOD (2 002) algunas características del
Phragmipedium kovachii.

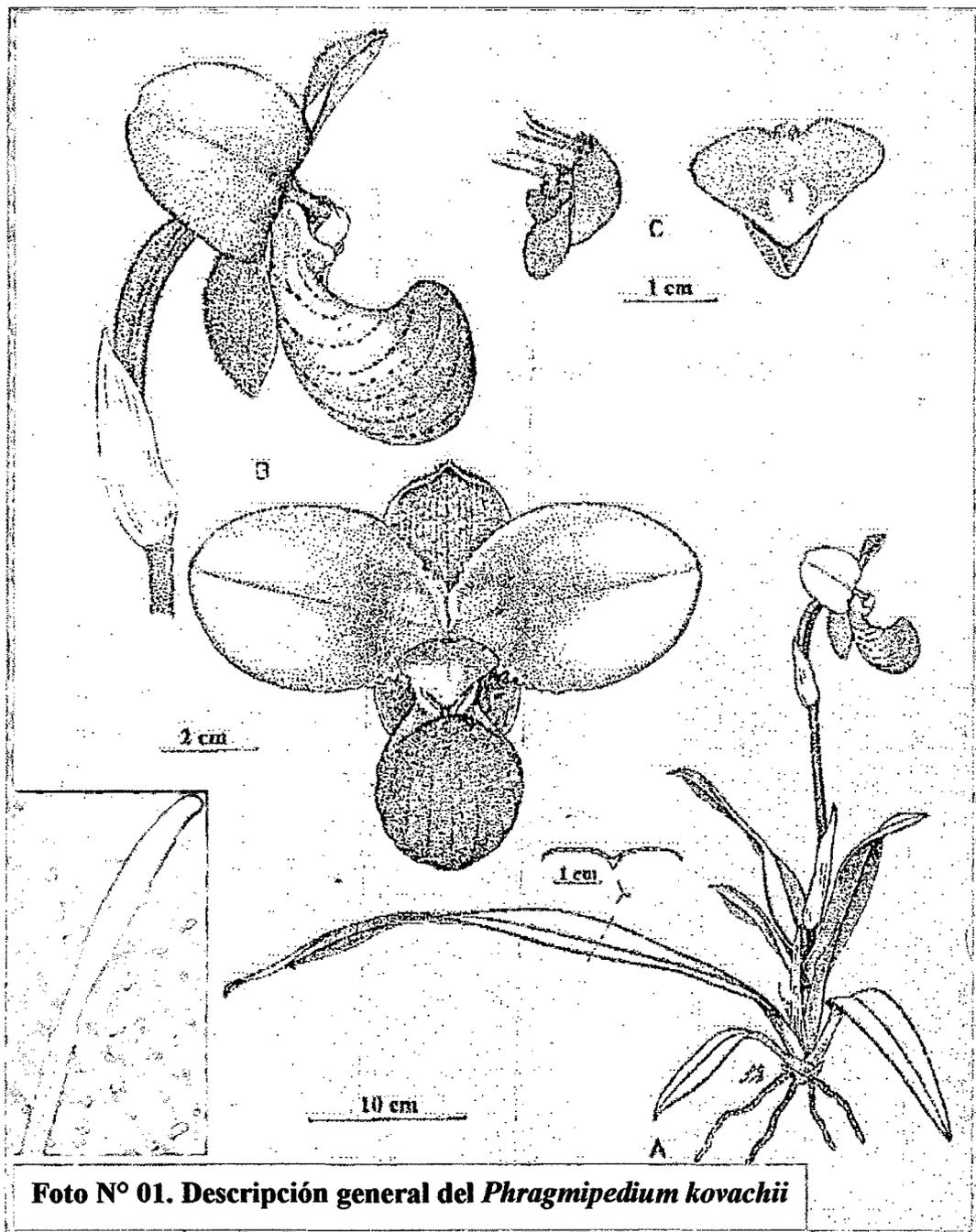


Foto N° 01. Descripción general del *Phragmipedium kovachii*

3.5.2. Descripción general

Planta terrestre no forma rizomas, sus raíces de 4 mm de diámetro, que puede llegar a 64 x 4 cm de longitud, pero sobre todo mucho más delgado.

Presenta una flor de 23 -25 cm de diámetro, pubescente, púrpura, con una sola bráctea verde 7- 9 cm del escapo de largo; el ovario 8 cm de largo, pubescente marrón, sujeta por una bráctea floral aguda 4 - 5.5 cm de largo. Sépalos algo cóncavo, denso de oro - marrón - pubescente; dorsal 4,5 x 3 cm, ampliamente elíptico, de obtuso; 5 x 3,7 cm sin sépalo, ampliamente elípticos a sub orbicular, obtuso. Los pétalos 6 x 4,8 cm, ampliamente de elíptico.

El labelo es de 5.5 - 7.5 x 3.5 - 4 cm. estaminoide 1,3 x 2 cm, cuerpo triangular a rombo, anteras que tocan casi los estigmas; estigmas tres, el estigma mediano particularmente grande, casi 1 cm de largo.

El *Phragmipedium kovachii* es un miembro de la sección *Micropetalum hallier* y se diferencia del resto de especies, en el género por las flores enormes que se extienden de color rosáceo a púrpura oscuro y que se llevan al parecer solo en una inflorescencia.

3.6. Propagación *in Vitro* de la especie *Phragmipedium besseae* Dodson & Kuhn

3.6.1. Selección del Material genético

Según **RODRÍGUEZ (1 996)** se colectaran material (cápsulas o plantas) de zonas endémicas del departamento de San Martín, para luego ser estudiados en el laboratorio, donde se llevara a cabo estudios de cultivos vegetales para propagar clonal e *in Vitro*.

3.6.2. Desinfección de las semillas

Según **RODRÍGUEZ (1 996)** recomienda lavar la cápsula, cuidadosamente con agua destilada y detergente con la ayuda de una escobilla para eliminar el polvo, pero en el caso de ser cápsula abierta, se debe realizar el proceso de desinfección por método de la jeringa, donde se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 -1% durante 20 minutos.

3.6.3. Establecimiento de las semillas

Luego de la desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio, se vuelve a lavar con agua destilada estéril, para eliminar todo tipo de residuos, **RODRÍGUEZ (1 996)** Con la ayuda de una espátula sacamos las semillas para determinar su viabilidad observándolas en un microscopio óptico a 100X, donde se observa los embriones de un color oscuro dentro de la testa, mientras que las no viables son de color blanquecino uniformes, entonces procedemos a sembrar al azar en el medio de cultivo contenidos en los tubos y frascos de vidrio, que son sellados con papel aluminio y plástico y luego llevados al cuarto para su germinación que será entre 30 a 65 días

para las orquídeas. El cuarto de cultivo se mantendrá a una temperatura de 21 – 25°C con la ayuda de un equipo de aire acondicionado y un termómetro, humedad ambiental y con el timer un periodo de luz de 16 horas/luz.

3.6.4. Traspaso de las plántulas para su crecimiento

Según **RODRÍGUEZ (1 996)** menciona que después que las semillas germinen, y formen plántulas y estas alcancen un tamaño aproximado de 2 a 3 cm después de 30 a 90 días de la germinación, entonces se los pasa a un medio de cultivo para su crecimiento repitiendo este proceso cada 30 días durante 180 a 360 días que es el rango de crecimiento de las orquídeas de este género, hasta que tengan una altura aproximada de 8 a 10 cm, las condiciones tanto de temperatura, humedad y periodo de luz del cuarto de cultivo en la etapa de crecimiento de las plántulas serán las mismas que fueron establecidas durante la germinación de las semillas.

3.7. Situación actual de la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalström & Fernández en el Perú y el mundo

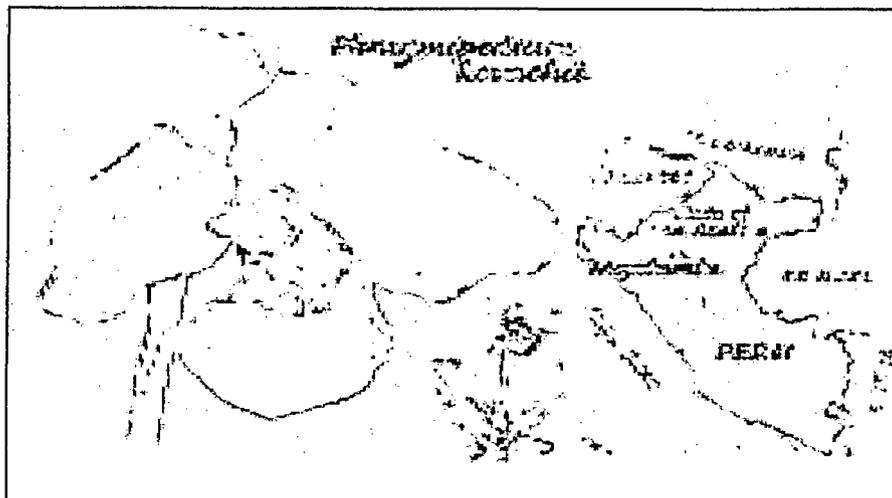


Foto N° 02: Ubicación del *Phragmipedium kovachii* en San Martín (moyobamba)

Según RACH (2 004) indica que la historia comienza cuando por la selva del Perú (San Martín) norte - central en el mes de junio del 2 002, Mike Kovach cultivador de Goldvein, descubre una orquídea en forma de zapafito con una flor del tamaño de la palma de la mano, con hojas desarrolladas y verduscas, pétalos color púrpura, Kovach llevo la flor deslumbradora a los científicos de Jardines de Selby en EEUU, en Julio del mismo año; el personal de Selby al ver esta especie se dedicó a estudiarla.

Al cabo de una semana fue patentada como *Phragmipedium kovachii*, ya que era una especie grande en 100 años y única en su especie. Luego de dos meses de ser patentada, los oficiales peruanos hicieron una queja formal a los EEUU y con ayuda de los Federales, arraigaron en los archivos de Selby por violar las leyes para proteger plantas en peligro por los cazadores furtivos en Perú.

3.6.1. Problemas legales de esta especie

Según **RACH (2 004)** indica que el Perú ha pedido al gobierno americano que ayude en las investigaciones de esta especie ilegalmente sacada del Perú y patentada como *Phragmipedium kovachii*. El costo de esta planta en EE. UU. Es de \$ 10 000 dólares por unidad, el cual superaría los 100 millones de dólares anuales.

La convención en el Comercio Internacional de las especies puestas en peligro (CITA), prohibió transportar orquídeas puestas en peligro de su país de origen. Tratado firmado por Estados Unidos en 1 973 y Perú en 1 989, pero este tratado se evadió ilegalmente.

Seguidamente **MOSQUIN (2 003) Sociedad Peruana de la Orquídea**. Merece agregarse que la Región San Martín, a pesar de su gran biodiversidad, es una de las más incomunicadas, apartadas y con alta tasa de desnutrición infantil; además afronta problemas como narcotráfico, terrorismo, desempleo y depredación de sus bosques, el cual deriva en un bajo crecimiento económico del lugar.

Adicionalmente, menciona que debería rebautizar a la *Phragmipedium kovachii* con el nombre de *Phragmipedium moyobambii* o *Phragmipedium peruvianum*, haciendo honor al lugar de origen de la orquídea, y denunciar por el robo de esta especie.

Finalmente **BENNETT (1 999)** menciona que todas las especies del género *Phragmipedium* están registradas desde 1 996, como especies en peligro de extinción incluyendo ahora el *Phragmipedium kovachii*, en la Convención Sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES), por lo tanto su comercialización esta reglamentada prohibida, con excepción de las plántulas o tejidos obtenidos a través de cultivos *in Vitro*.



Foto N° 03: Flor de *Phragmipedium kovachii*



Foto N° 04: *Phragmipedium kovachii* Atwood
Dalström & Fernández – 2002

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento

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

4.1.1 Ubicación Política

Lugar	:	LCTV – UNSM - T
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 1 978

4.2. Materiales

De laboratorio:

- Frascos
- Tubos de ensayo de 25 x 150 mm
- Erlenmeyer de diferentes graduaciones
- Placas petri
- Pinzas de acero quirúrgico
- Mangos de bisturí
- Hojas de bisturí No. 10 y 11
- Papel aluminio
- Alcohol
- Reguladores de crecimiento
- Medio de cultivo
- Vitaminas
- Agua de coco
- Gel rite
- Azúcar
- Mecheros
- Algodón
- Hipoclorito de sodio
- Sistemas de iluminación
- Agitador magnético
- Potenciómetro
- Destilador de agua
- Agua destilada
- Balanza analítica
- Refrigerador
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Agua destilada 1000 ml

Material fotográfico:

- Películas fotográficas
- Cámara fotográfica profesional
- Pilas
- Cámara digital profesional

Materiales de oficina:

- Papel bond A-4
- Papel bulki
- Lapiceros
- Lápices
- Computadora
- Diskettes
- Cds

4.3. Metodología

4.3.1. Proceso de la propagación *in Vitro* de *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalström & Fernández

a. Selección y transporte del material de inicio

El material genético se obtuvo en la zona del Alto Mayo, sector Pacaisapa, Provincia de Moyobamba, Departamento de San Martín; aproximadamente a 100 km de Tarapoto.

El material (cápsula) se obtuvo adherido a la planta, faltando un tiempo para su maduración (no se sabía el tiempo exacto de polinización), se colocó en un macetero para su desarrollo y maduración completa (aproximadamente de 6 – 7 meses).



Foto N° 05: Planta de *Phragmipedium Kovachii*

Al cabo de un tiempo, la cápsula llegó a su etapa de madurez (7 meses) y se procedió a la cosecha, cortando con una tijera, para luego colocarlo en un papel bond limpio y anotando algunos datos de recolección: lugar, especie, tiempo de maduración, colector etc.



Foto N° 06: Cápsula de *Phragmipedium kovachii* en estado de maduración

En el laboratorio se procedió a obtener las semillas de la cápsula madura, cortando con un bisturí en tres partes y colocarlos en un papel mas fino, evitando que se pierda el material vegetal (semillas) y anotando siempre los datos de recolección.



Foto N° 07: Cápsula de *Phragmipedium kovachii* cosechada

b. Preparación y desinfección de cápsula dehiscente (abierta)

A partir de este momento, los trabajos fueron hechos en el **Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales (LCTV)** de la **Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto (UNSM – T)**, como se menciona:

b.1. Preparación de los materiales

- Se preparo una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (NaCl) para desinfección.
- Para desinfectar las semillas abiertas, se utilizo el método de la jeringa, tiene la ventaja de desinfectar semillas dehiscentes, debido a la barrera de algodón contenida en el interior de la misma.
- Para la siembra se tomo un trozo de algodón e introducimos en el interior y después realizar una presión. La desinfección se siguió el mismo proceso propuesto por **DONAYRE (2 000)**.

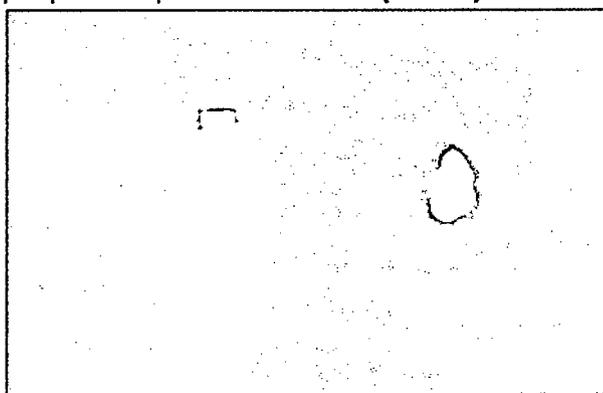


Foto N° 08: Uso de la jeringa. LCTV – UNSM - T

- Antes de la desinfección, se obtuvo una muestra de semilla para observar al microscopio (mayor aumento 100X), siguiendo el proceso propuesto por **DONAYRE (1 996)**, pero existe otro método mas

confiable para determinar la viabilidad (método del 2,3,5 trifenil-tetrazolium), como lo menciona LEÓN (1 995).

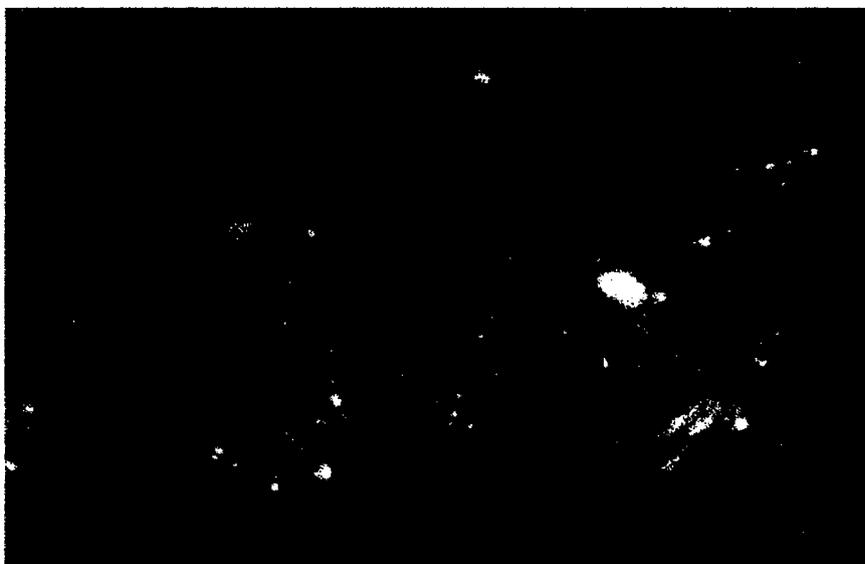


Foto N° 09: Semillas Vista al microscopio tomadas en el LCTV – UNSM - T

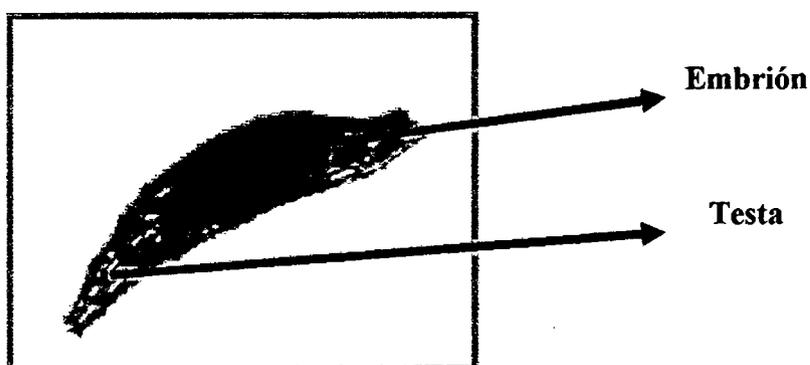


Foto N° 10: Partes de una semilla de *Phragmipedium kovachii* LCTV – UNSM - T

b.2. Trabajo en cámara de flujo laminar

- En la cámara de flujo laminar se procedió a la desinfección de las semillas donde se sumergió la jeringa, en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, contenidas en un frasco, realizando la

absorción de la solución y asegurando que se mojen las semillas, luego agitarlas por un periodo y eliminar la solución, esto por un espacio de 15 minutos y unas 10 veces como mínimo.

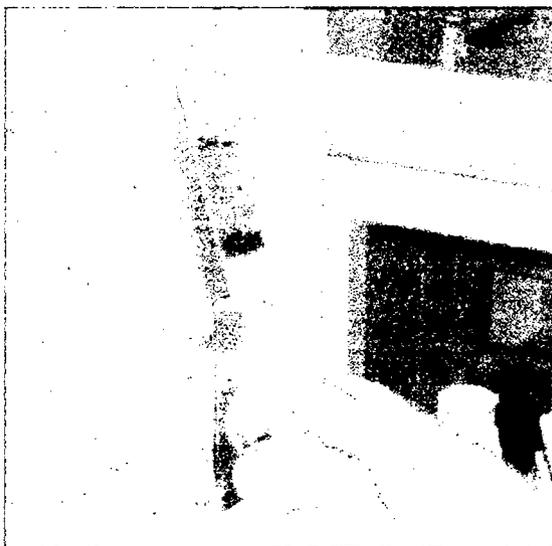


Foto N° 11: Proceso de desinfección de las semillas en el LCTV – UNSM -T

- Después de realizado la desinfección de las semillas, se procedió a eliminar los residuos de hipoclorito de sodio (lejía) contenidas en la jeringa, con el agua destilada estéril, donde se hizo el mismo proceso de desinfección.
- Una vez realizado el proceso de desinfección y lavado de las semillas de *Phragmipedium kovachii*, se procedió a extraer las semillas con la ayuda de una pinza desinfectada y estéril, colocarlos en una placa petri estéril, tratando de no perder semillas ya que algunas se encontraban adheridas al algodón. Con la ayuda de un bisturí estéril y desinfectado, se trata de retirar las semillas que se encontraban adheridas al algodón para su posterior sembrado.

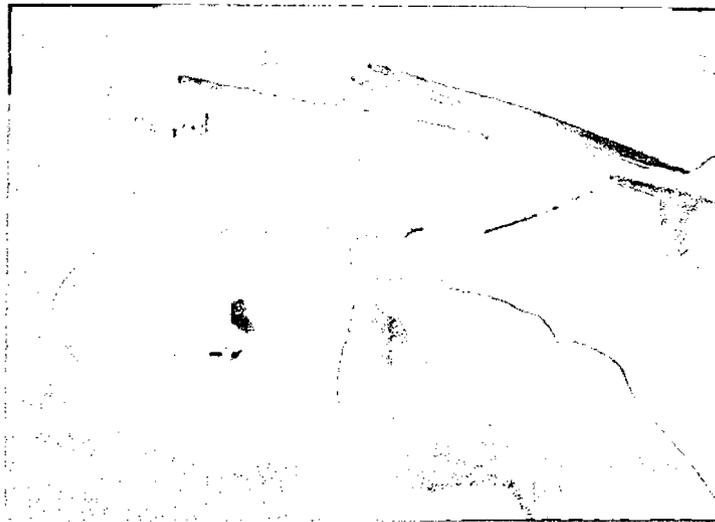


Foto N° 12: Obtención de las semillas de la jeringa con una pinza. LCTV – UNSM - T



Foto N° 13: Separación de las semillas del algodón . LCTV – UNSM - T

b.3. Proceso de siembra

- Después de haber obtenido las semillas en la placa petri, se realizó la siembra, utilizando una pinza estéril y desinfectada para evitar contaminaciones, con el cual se tomó una pequeña cantidad de semilla y se los colocó en los tubos de ensayo de 25 x 150 mm contenida con el medio de cultivo y luego sellado con papel aluminio y plástico, anotando luego datos de la

siembra. Y para su posterior ubicación en el cuarto de incubación a una temperatura de 21 – 25° C y humedad relativa de 60%, con un timer que controla el periodo de luz de 16 horas/luz.

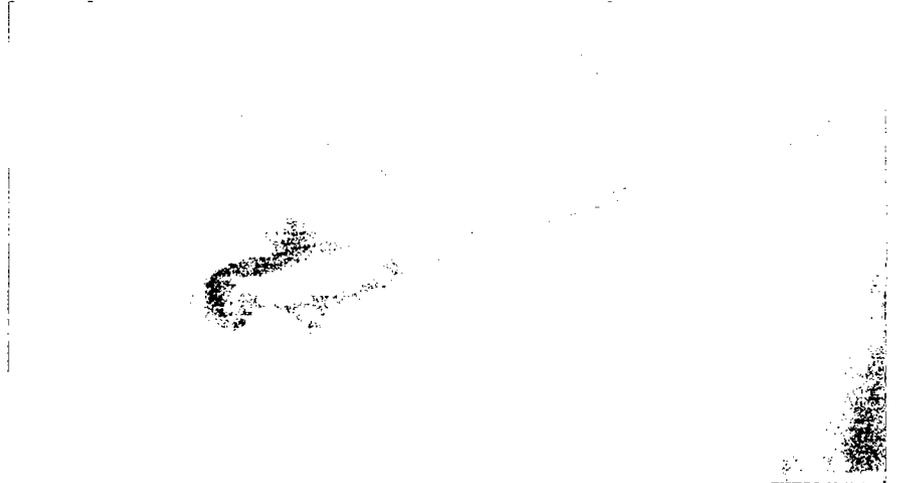


Foto N° 14: Siembra de semillas en tubos de ensayo. LCTV – UNSM - T

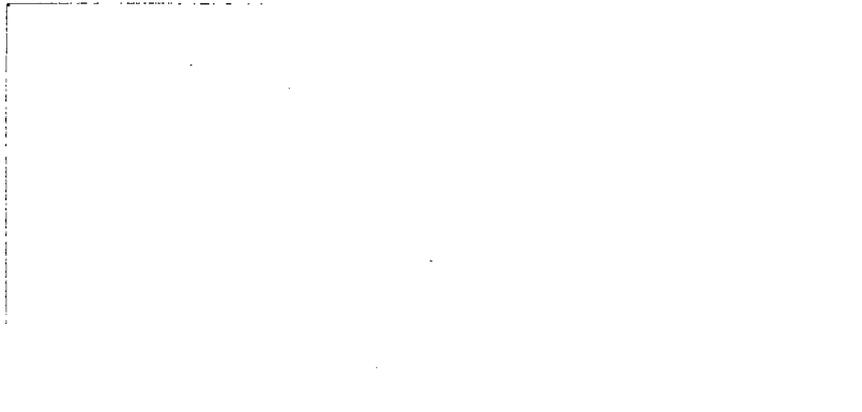


Foto N° 15: Sellado y etiquetado LCTV – UNSM - T



Foto N° 16: Cuarto de incubación para las semillas sembradas. LCTV – UNSM- T

c. Establecimiento de las semillas

Al cabo de un tiempo de ser sembradas las semillas en los tubos de ensayo de 25 x 150 mm contenidas con medio de cultivo sólido aproximadamente 10 ml/tubo se observó el desarrollo de las semillas, acondicionado a una temperatura de 21 – 24° C con una humedad relativa de 40 - 60% ya que estas condiciones favorecían su desarrollo.

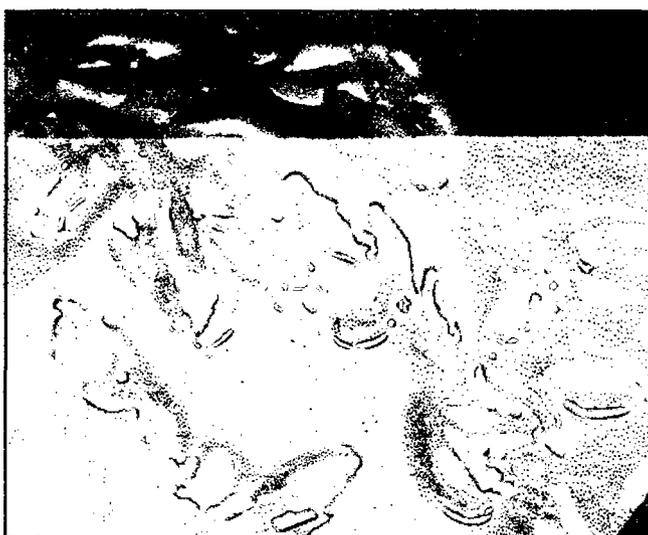


Foto N° 17: Germinación de las semillas de *Phragmipedium kovachii*
En un medio de cultivo. LCTV – UNSM - T

Se sabe que la semilla del *Phragmipedium kovachii* es muy pequeña 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, lo que permite flotar por periodos largos. El embrión de la orquídea esta formado por células relativamente indiferenciadas con abundantes cuerpos lipiditos y proteínas que constituyen su única fuente de reserva, pero utilizando el cultivo *in Vitro*, las semillas comenzaran a germinar y desarrollarse ya que cuenta con nutrientes que aceleran su desarrollo en condiciones de laboratorio.

Aproximadamente a 8 semanas después de la siembra en medio de cultivo (germinación), se observó el proceso de rompimiento de testa que cubre el embrión de la semilla de *Phragmipedium kovachii*, esto se da por germinación del embrión y también por las condiciones favorables para su desarrollo (temperatura, foto periodo y humedad).

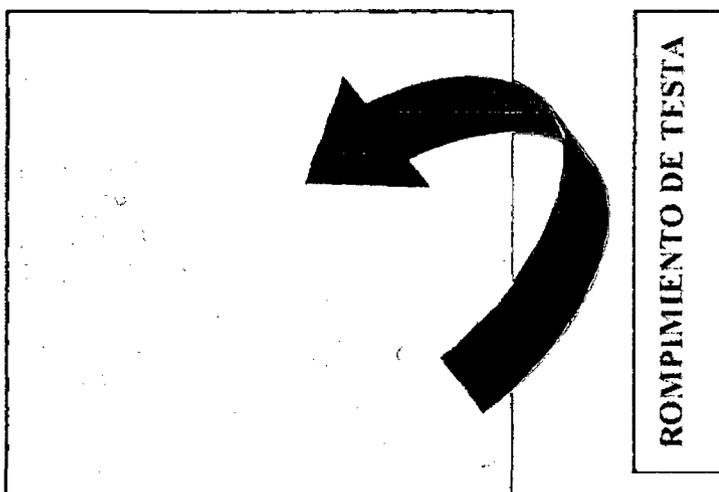


Foto N° 18: Rompimiento de la testa en medio de germinación. LCTV – UNSM - T

d. Multiplicación de protocormos

En su segunda etapa de propagación *in Vitro* (multiplicación) se estableció 3 medios con diferentes concentraciones y componentes, para así observar los cambios que sufren los protocormos y su desarrollo (3 protocormos/tubo) para un mejor estudio. En esta fase los protocormos comenzaran a diferenciarse algunas en plántulas y desarrollaran hojas, 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.

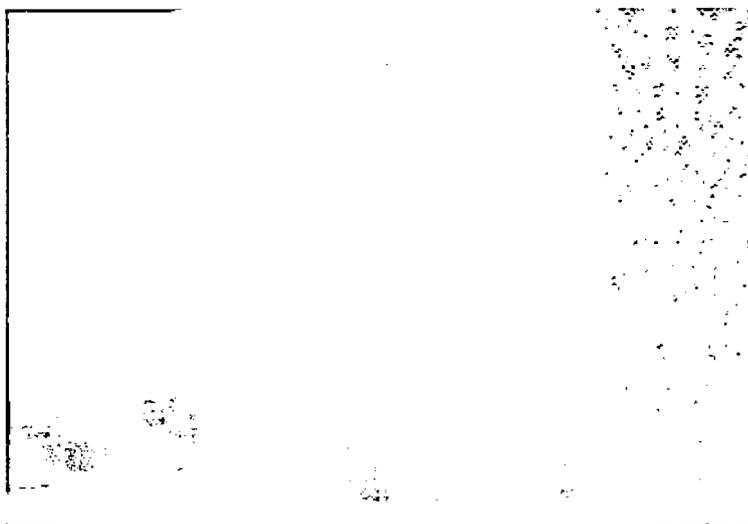


Foto N° 19: desarrollo de las semillas LCTV – UNSM - T



Foto N° 20: Protocormos en etapa de desarrollo. LCTV – UNSM - T

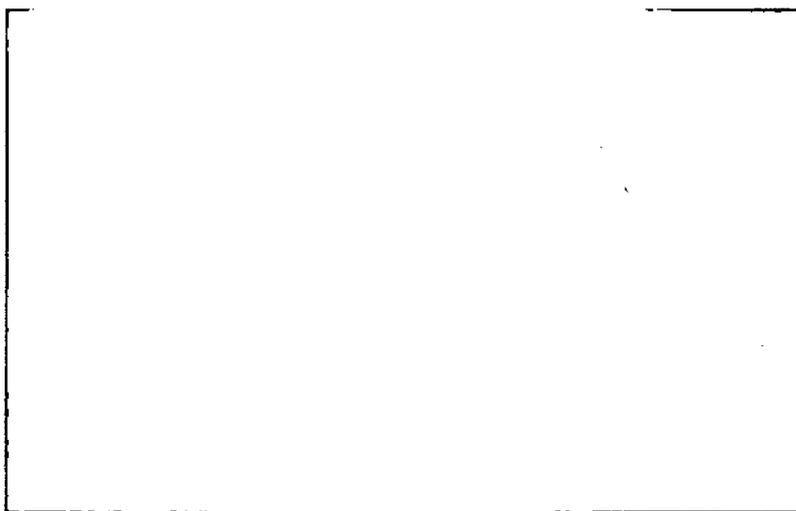


Foto N° 21: Etapas de desarrollo hasta formar plántulas. LCTV – UNSM - T

Se podrá observar que los protocormos se están 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 enraizamiento.

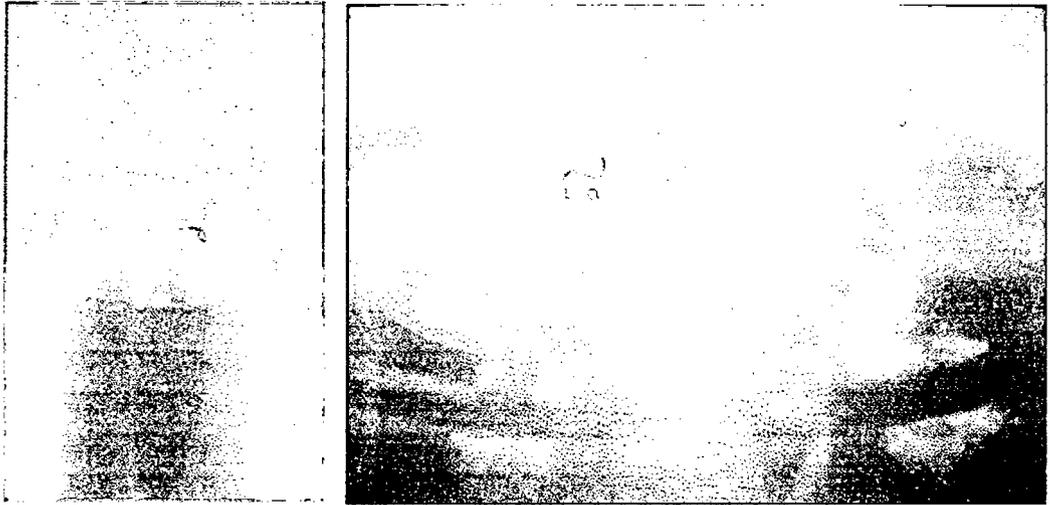


Foto N° 22 y 23. Formación de protocormos a plántulas pequeñas. LCTV – UNSM - T



Foto N° 24: Plántula de *Phragmipedium kovachii* en formación de raicillas. LCTV – UNSM - T

e. Enraizamiento de las plántulas

Al cabo de un periodo donde las protocormos estaban formando algunas plántulas en un medio de multiplicación, se procedió al cambio de un medio mas nutritivo, llegando a la fase de enraizamiento, en esta etapa se estableció tres medios de cultivo, y también 3 plántulas/tubo, siempre con las mismas condiciones ambientales para su enraizamiento, en esta fase las plántulas tendrán mayor tamaño y formaran raíces.



Foto N° 25: Momento del transplante. LCTV - UNSM - T

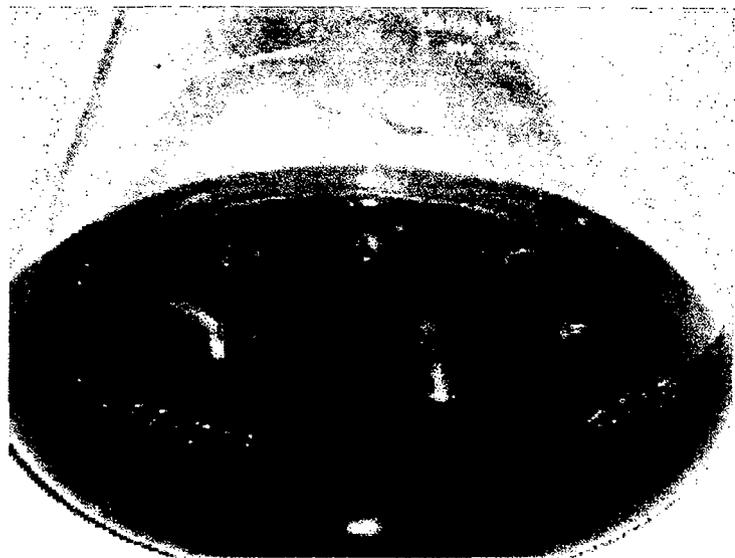


Foto N° 26: Siembra en medio de Enraizamiento. LCTV - UNSM - T

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con igual número de repeticiones (10), donde se estableció un solo medio fase de germinación, tres en fase de multiplicación y tres en fase de enraizamiento.

4.4.1 Medios de Cultivo

Cuadro N° 01: Componentes y dosis del medio de cultivo para germinación.

Reactivos e insumos	g/200 ml stock	Concentración final
Nitrato de amonio	20.625	1.031
Nitrato de potasio	23.750	1.188
EDTA	0.466	0.032
Sulfato ferroso heptahidratado	0.348	
Cloruro de calcio dihidratado	17.600	0.880
Fosfato de potasio monobásico (g/l)	6.800	0.085
Molibdato de sodio dihidratado	0.010	0.004 g/l
Cloruro de cobalto dihidratado	0.001	
Ácido bórico	0.248	
Yoduro de potasio	0.033	
Sulfato de manganeso monobásico	0.676	0.198 g/l
Sulfato de manganeso heptahidratado	14.800	
Sulfato de zinc heptahidratado	0.345	
Sulfato de cobre pentahidratado	0.001	
Tiamina	0.100	0.400
Ácido nicotínico	0.100	0.500
Biotina	10 mg/	0.330
Glucosa	10.000
Fructuosa	10.000
C. Activado (g)	2.000
Gel Rite (g)	2.500
Agua destilada (ml)	1000.000
pH	51 – 5.4

Medio N° 01: Establecido Por León M. en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV), UNSM – T

Cuadro N° 02: Medios de cultivo para fase de multiplicación

Reactivos e insumos	Tratamientos (g/l)		
	Medio I	Medio III	Medio IV
Nitrato de amonio	1.031	1.031	1.031
Nitrato de potasio	1.188	1.188	1.188
EDTA	0.032	0.032	0.032
Sulfato ferroso heptahidratado			
Cloruro de calcio dihidratado	0.880	0.880	0.880
Fosfato de potasio monobásico	0.085	0.085	0.085
Molibdato de sodio dihidratado	0.004	0.004	0.004
Cloruro de cobalto dihidratado			
Ácido bórico			
Yoduro de potasio	0.198	0.198	0.198
Sulfato de manganeso monobásico			
Sulfato de zinc heptahidratado			
Sulfato de manganeso heptahidratado			
Sulfato de cobre pentahidratado	0.400	0.400	0.400
Tiamina			
Ac nicotínico	0.500	0.500	0.500
Biotina	0.330	0.330	0.330
Glucosa(g)	10.000	10.000
Fructuosa (g)	10.000	10.000	10.000
C. Activado (g)	2.000	2.000	2.000
Gel Rite (g)	2.500	2.500	2.500
Myo-inositol (mg)	20.000
ANA (ml)	0.500	0.250
BAP (mg)	5.000	2.500
Agua de coco (ml)	200.000
Agua destilada (ml)	1000.000	1000.000	1000.000
pH	5.110	5.280	5.200

Medio N° 02: Establecido por León M. y Gálvez A. en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales (LCTV), UNSM – T

Cuadro N° 03: Medios de cultivo en la fase de enraizamiento

Reactivos e insumos	Tratamientos (g/l)		
	Medio I	Medio II	Medio III
Nitrato de amonio	1.031	1.031	1.031
Nitrato de potasio	1.188	1.188	1.188
EDTA	0.032	0.032	0.032
Sulfato ferroso heptahidratado			
Cloruro de calcio dihidratado	0.880	0.880	0.880
Fosfato de potasio monobásico	0.085	0.085	0.085
Molibdato de sodio dihidratado			
Cloruro de cobalto dihidratado			
Acido bórico	0.004	0.004	0.004
Yoduro de potasio			
Sulfato de manganeso monobásico			
Sulfato de zinc heptahidratado			
Sulfato de manganeso heptahidratado	0.198	0.198	0.198
Sulfato de cobre pentahidratado			
Tiamina	0.400	0.400	0.400
Ac nicotínico	0.500	0.500	0.500
Biotina	0.330	0.330	0.330
Glucosa (g)	10.000	10.000
Fructuosa (g)	10.000	10.000	10.000
C. Activado (g)	2.000	2.000	2.000
Gel Rite (g)	2.500	2.500	2.500
Kinetina (ml)	4.000
ANA (mg)	0.500	0.500	0.200
Myo – Inositol (ml)	20.000
Agua de coco (ml)	200.000	100.000
Agua Destilada	1000.000	1000.000	1000.000
pH	5.120	5.150	5.14

Medio N° 03: Establecido por León M. y Gálvez R. en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV), UNSM – T

4.4.2 Procedimiento para la preparación del medio de cultivo.

- En un vaso de vidrio o de plástico de capacidad de 1 litro, medimos 500 ml de agua destilada.
- Pesamos los componentes sólidos que requiere la preparación del medio de cultivo (azúcar, agar, carbón activado, etc).
- Agregamos los componentes (M & S modificado), los stock ABGCDEF al vaso de vidrio, previamente medidos con la ayuda de la pipeta de 1, 5 y 10 ml.
- Para cada etapa de propagación, preparamos diferentes tipo de medio de cultivo, con diferentes concentraciones (germinación: un solo medio; para desarrollo: tres medios de cultivo; enraizamiento: tres medios de cultivo).
- 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 uno de los frascos con los medios en caso de ser más que uno.
- A cada medio de cultivo establecido se ajustó su pH de 5.1 – 5.4 en el caso de orquídeas que es el rango establecido.
- Luego de tener el medio de cultivo preparado, se procedió a calentarlo, pues contenía compuestos sólidos (glucosa, azúcar), en un horno eléctrico, esto para evitar que el medio salga gelatinoso y para equilibrar el medio se utilizo un agitador magnético para que haya homogeneidad en los tubos.
- El medio de cultivo se distribuyo en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, colocando aproximadamente 10 ml a cada tubo, con la ayuda de una pipeta, obteniendo 43 tubos en la fase de germinación, 30 en fase de multiplicación (desarrollo) y 30 en etapa de enraizamiento.

- Todos los tubos de ensayo con el medio de cultivo, se pasó a la esterilización en una olla autoclave de capacidad de 12 litros a temperatura de 121° C y una presión de 15 lb. Por un periodo de 20 minutos.
- Después de enfriado, se agito el medio para tener homogeneidad y luego se almaceno en la sala de incubación a la temperatura de 20 a 24° C hasta el momento de su uso, donde se las ubico horizontalmente para un mejor estudio.

4.4.3 Especie.

Phragmipedium kovachii Atwood, Dalström & Fernández

4.4.4. Análisis de Varianza.

Se da a conocer que a partir de la segunda fase (multiplicación) y tercera fase (enraizamiento) de la propagación *in Vitro*, se colocó en cada tubo 3 protocormos de *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalström & Fernández, para así tener mejores resultados de la investigación.

Cuadro N° 04: Análisis de varianza del experimento en la fase de desarrollo (multiplicación) y enraizamiento

Fuente de variabilidad	G.L.	S.C.	C. M.	Fc
Tratamientos	$3 - 1 = 2$			
Error	$3(10 - 1) = 27$			
Total	$(3 \times 10) - 1 = 29$			

4.4.5. Modelo Matemático.

$$Y_{ij} = U + t_i + E_{ij}$$

4.5. Evaluaciones realizadas

4.5.1. 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:

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



Foto N° 27: Viabilidad. LCTV - UNSM

b) Contaminación.

Se evaluó presencia de microorganismos (hongo) por observación directa, a los 20 días después de la siembra, en dos momentos de siembra: 22/03/04 y 01/04/04, para luego obtener el porcentaje de contaminación en cada momento de siembra, por medio de la fórmula general.



CONTAMINACIÓN

Foto N° 28: Contaminación. LCTV – UNSM

c) **Porcentaje de Germinación.**

Se evaluó el porcentaje de germinación, al cabo de 5 semanas después de la siembra, donde se procedió a tomar 15 tubos al azar y se hizo el recuento total de semillas y de semillas germinadas, para luego obtenerse el porcentaje de germinación en cada tubo evaluado por medio de la formula general.

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

d) **Rompimiento de testa.**

Se evaluó el rompimiento de testa de las semillas en el medio de cultivo (germinación). Se procedió a tomar los 20 tubos establecidos y observar la velocidad de rompimiento de testa de las semillas por cada tubo, esto cada 7 días en 4 evaluaciones.

4.5.2. Etapa de multiplicación

Se estableció 3 medios de cultivo para multiplicación, con 10 repeticiones (tubos) y por cada tubo se colocó 3 protocormos.

a) Color verde y Marrón.

Se evaluó el estado de protocormos en buen estado (verdes) y fenolizados o muertos (marrón) a 90 días después de la siembra, donde contamos el número de protocormos vivos y muertos de los 10 tubos establecidos por los 3 tratamientos.

b) Número de hojas.

Se evaluó el número de hojas de las plántulas, donde se procedió a contar el número de hojas de cada plántula (3 plántulas/tubo) obteniéndose un promedio final que representara el número de hojas/tubo, esto a los 10 tubos evaluados en los 3 tratamientos, para luego realizar el Análisis de Varianza y Duncan.

c) Altura de plántulas

Se evaluó la altura de las plántulas, donde se procedió a medir la longitud de las plántulas con una regla en mm. De cada plántula (3 plántulas/tubo) obteniéndose un promedio final que representara la altura de plántulas/tubo, esto a los 10 tubos evaluados en los 3 tratamientos, para luego realizar el Análisis de varianza y Prueba de Duncan.

4.5.3. Etapa de Enraizamiento.

Se estableció 3 medios con 10 repeticiones (tubos), y por cada tubo se colocó 3 plántulas.

a) Número de hojas.

Se evaluó el número de hojas, donde se procedió a contar las hojas de cada plántula (3 plántulas/tubo) obteniéndose un promedio final que representara el número de hojas/tubo, esto a los 10 tubos evaluados en los 3 tratamientos.

b) Altura de plántulas.

Se evaluó la altura de las plántulas, donde se midió la longitud con una regla en mm (3 plántulas/tubo) obteniéndose un promedio final que representara la altura de plántula/tubo, esto a los 10 tubos evaluados en los 3 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 (3 plántulas/tubo) obteniéndose un promedio final de raíces/tubo, esto a los 10 tubos evaluados en los 3 tratamientos, para luego realizar el Análisis de Varianza y Prueba de Duncan.

d) Longitud de raíces

En esta etapa de enraizamiento se procedió a medir con una regla la longitud de raíces (mm) de cada plántula (3 plántulas/tubo) obteniéndose un promedio final que representa la longitud de raíces/tubo, esto a los 10 tubos evaluados en los 3 tratamientos, para luego realizar el Análisis de Varianza y Prueba de Duncan.

V. RESULTADOS

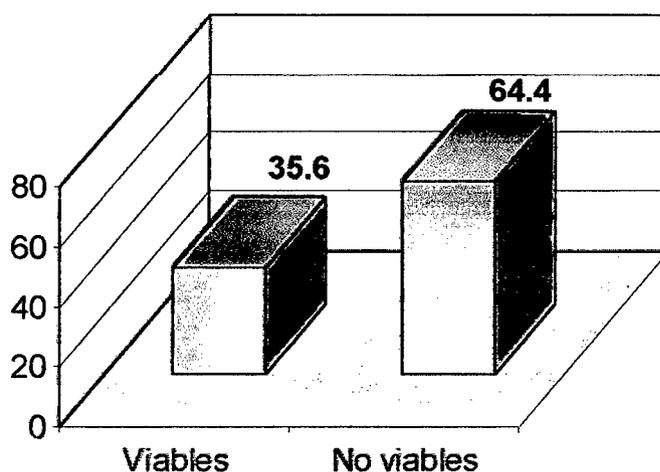
5.1. Evaluación del establecimiento de las semillas

5.1.1. Viabilidad.

Cuadro N° 05: Viabilidad de las semillas de *Phragmipedium kovachii*, expresado en porcentajes antes de la siembra.

N° de muestras	Cantidad de semillas	Viables o buenos (%)	No Viable o Vanos (%)
1	85	36.5	63.5
2	92	37	63
3	84	37	63
4	83	48.2	51.8
5	51	43.1	56.9
6	53	30.2	69.8
7	90	25.5	74.5
8	53	34	66
9	55	40	60
10	70	24.3	75.7
X	71.6	35.6	64.4

Gráfico N° 01: Viabilidad de las semillas



5.1.2. Contaminación.

Cuadros N° 06: Número de tubos con *Phragmipedium kovachii* contaminados en medio de cultivo (Germinación) expresado en dos momentos de siembra, después de 2 semanas.

Cuadro N° 06.a: Primer momento de siembra: 22 – 03 - 04

N°	Cantidad de tubos	Contaminados	No contaminados
1*	13	7	6
%	100	54	46

Cuadro N° 06.b: Segundo momento de siembra: 01 – 04 - 04

N°	Cantidad de tubos	Contaminados	No contaminados
2	30	15	15
%	100	50	50

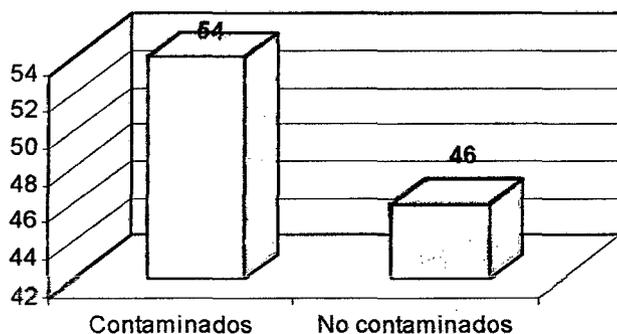


Gráfico N° 06.a: Siembra 1

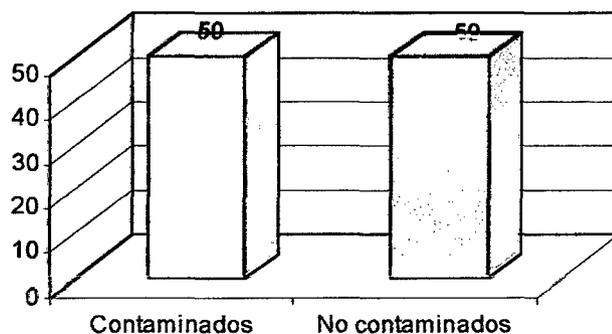


Gráfico N° 06.b: Siembra 2

5.1.3. Porcentaje de Germinación.

Cuadro N° 07: Porcentaje de germinación de semillas de *Phragmipedium kovachii* en un medio de germinación a 30 días de la siembra.

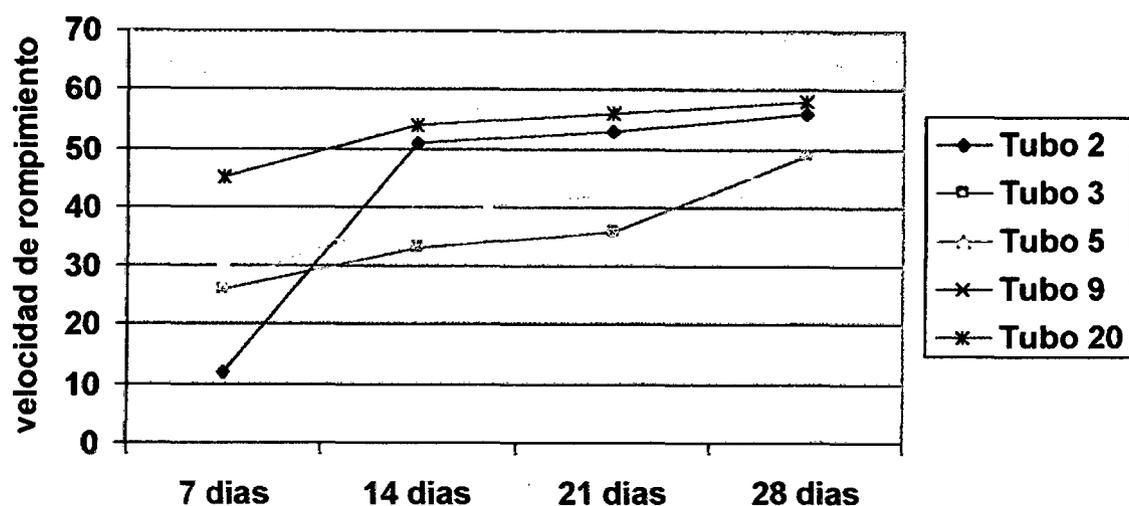
N°	Cantidad	Semillas evaluadas	Porcentaje de germinación
1	163	53	32.5
2	195	27	13.8
3	92	8	8.7
4	105	28	26.7
5	121	41	33.9
6	225	58	25.8
7	139	36	25.9
8	183	41	22.4
9	42	7	16.7
10	221	44	19.9
11	122	40	32.8
12	104	38	36.5
13	145	31	21.4
14	131	47	35.9
15	201	55	27.4
x	145.9	36.9	25.4

5.1.4. Rompimiento de testa.

Cuadro N° 08: Velocidad de rompimiento de testa de semillas de *Phragmipedium kovachii* a 60 días después de la siembra, en un medio de germinación durante 4 evaluaciones expresado en cantidad.

N° tubos	Velocidad de rompimiento de testa en un medio de cultivo (germinación) expresado en proporción.			
	7 días	14 días	21 días	28 días
1	15	34	39	40
2	12	51	53	56
3	26	33	36	49
4	32	34	36	37
5	31	37	45	45
6	14	22	23	37
7	11	18	21	23
8	12	18	20	22
9	27	39	42	42
10	19	25	38	40
11	15	20	24	25
12	3	3	3	4
13	2	4	4	4
14	10	12	14	14
15	1	2	2	2
16	15	22	23	27
17	23	32	34	34
18	7	10	14	15
19	28	35	36	40
20	45	54	56	58
Total	348	505	563	614

Gráfico N° 03: Velocidad de rompimiento de testa



Nota: Se tomaron cinco datos al azar del cuadro N° 09.

5.2. Etapa de multiplicación

5.2.1. Color verde y marrón.

Cuadro N° 09: Cuadro de observación del número de protocormos de color verde (Vivos) y marrón o fenolizados (muertos) a los 90 días después de la siembra.

repeticiones	Tratamiento I		Tratamiento II		Tratamiento III	
	Verdes	Marrones	Verdes	Marrones	Verdes	Marrones
1	2	1	2	1	3	0
2	3	0	3	0	2	1
3	3	0	3	0	3	0
4	2	1	2	1	2	1
5	3	0	3	0	3	0
6	3	0	3	0	2	1
7	2	1	2	1	3	0
8	3	0	3	0	3	0
9	3	0	3	0	2	1
10	3	0	2	1	3	0
Total	27	3	26	4	26	4

5.2.2. Número de hojas.

Cuadro N° 10: Análisis de varianza para determinar el número de hojas de *Phragmipedium kovachii* en etapa de multiplicación a 20 semanas después de la siembra.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Significación 0.05 – 0.01
Tratamientos	2	0.698	0.34	58.1611	* *
Error	27	0.162	0.006		
Total	29	0.86	0.355		

* * Altamente significativo

$$\bar{X} = 3.3$$

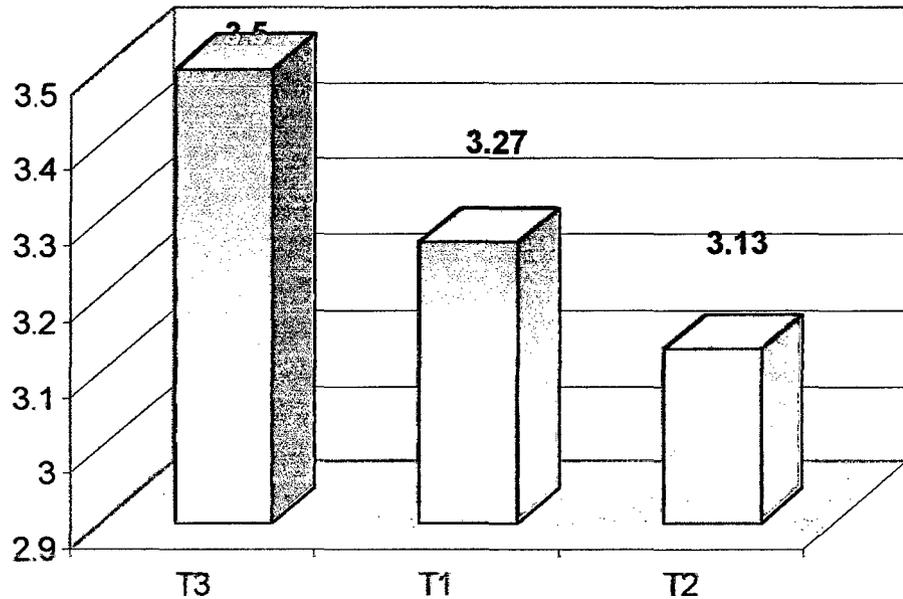
$$C. V. = 2.30\%$$

$$R^2 = 81.20\%$$

Cuadro N° 11: Prueba de Duncan para determinar el número de hojas de *Phragmipedium kovachii* a 20 semanas después de la siembra.

N° de Orden	Tratamientos	Promedios	Significación Duncan (0.01)
1	T3	3.5	a
2	T1	3.27	a b
3	T2	3.13	b

Gráfico N° 04: promedio de número de hojas en medio de multiplicación.



5.2.3. Altura de plántulas.

Cuadro N° 12: Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas de *Phragmipedium kovachii* en fase de multiplicación a 20 semanas después de la siembra.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Significación 0.05 – 0.01
Tratamientos	2	7.4939	3.7469	49.8579	* *
Error	27	2.0291	0.0752		
Total	29	9.523	3.8221		

* * : Altamente significativo

$$\bar{X} = 5.77$$

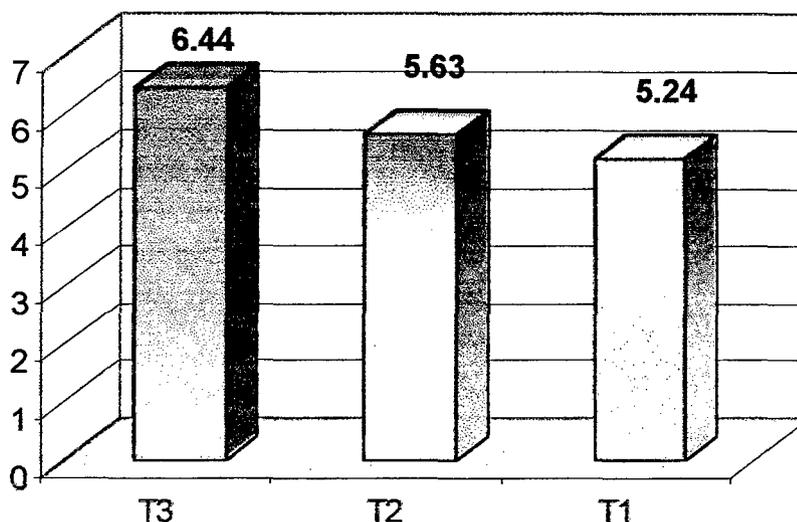
$$C. V. = 4.75\%$$

$$R^2 = 78.69\%$$

Cuadro N° 13: Prueba de Duncan para determinar la altura de plántulas de *Phragmipedium kovachii* a 20 semanas después de la siembra.

N° de Orden	Tratamientos	Promedios	Significación Duncan (0.01)
1	T3	6.44	a
2	T2	5.63	b
3	T1	5.24	c

Gráfico N° 05: Promedio de Altura de Plántulas en fase de multiplicación.

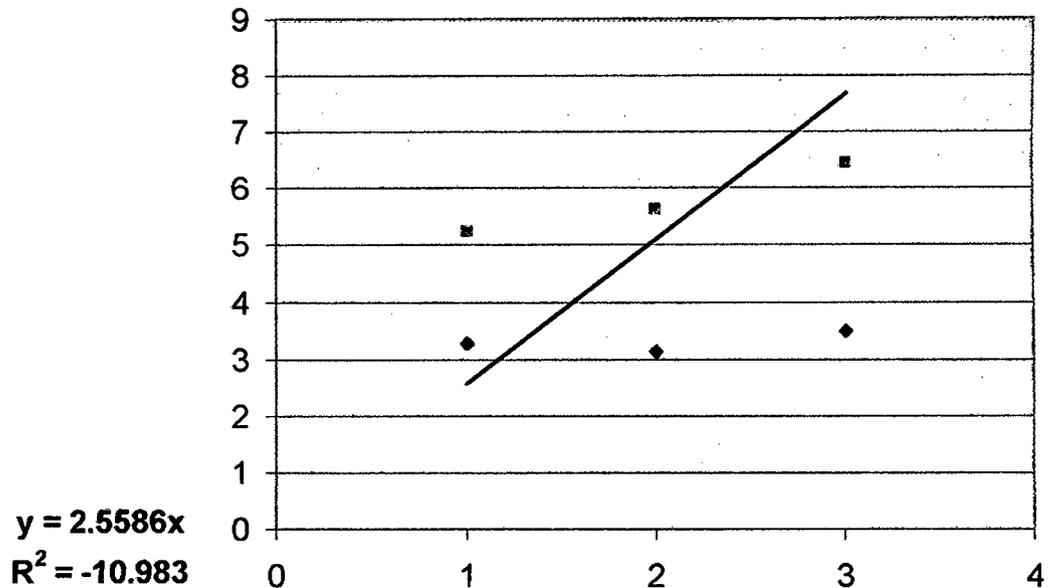


5.3.3 Correlación: Número de hojas y Altura de plántula

Cuadro N° 14: Correlación promedio entre número de hojas y altura de plántulas en fase de multiplicación

Tratamiento	Promedio de hojas	Promedio de altura (mm)
T1	3.27	5.24
T2	3.13	5.63
T3	3.5	6.44

Grafico N° 06: Correlación entre número de hojas y altura de Plántula en fase de multiplicación



5.3. Etapa de enraizamiento

5.3.1. Número de hojas

Cuadro N° 15: Análisis de varianza para determinar el número de hojas de *Phragmipedium kovachii* en fase de enraizamiento a 35 semanas después de la siembra.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Significación 0.05 – 0.01
Tratamientos	2	3.1580	1.5790	77.5205	* *
Error	27	0.5500	0.0204		
Total	29	3.7080	1.5994		

* * : Altamente significativo

$\bar{X} = 3.88$

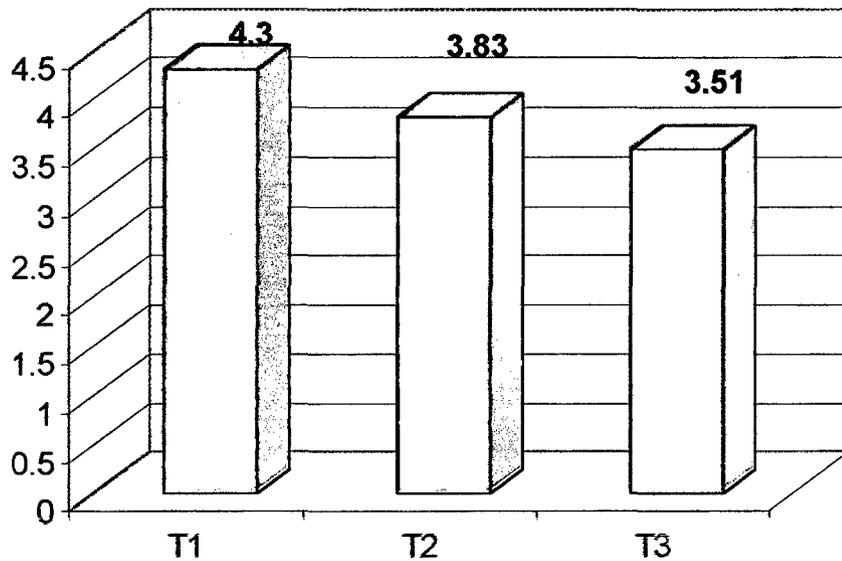
C. V. = 3.68

R² = 85.17%

Cuadro N° 16: Prueba de Duncan para determinar el número de hojas de *Phragmipedium kovachii* a 35 semanas después de la siembra.

N° de Orden	Tratamientos	promedios	Significación Duncan (0,01)
1	T1	4.3	a
2	T2	3.83	b
3	T3	3.51	c

Gráfico N° 07: Promedio del número de hojas en medio de enraizamiento



5.3.2. Altura de las plántulas.

Cuadro N° 17: Análisis de varianza para determinar la altura de plántulas en mm de *Phragmipedium kovachii* en fase de enraizamiento a 35 semanas después de la siembra.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Significación 0.05 – 0.01
Tratamientos	2	2.4827	1.2414	57.4169	* *
Error	27	0.5837	0.0216		
Total	29	3.0664	1.2630		

* * : Altamente significativo

$$\bar{X} = 6.67$$

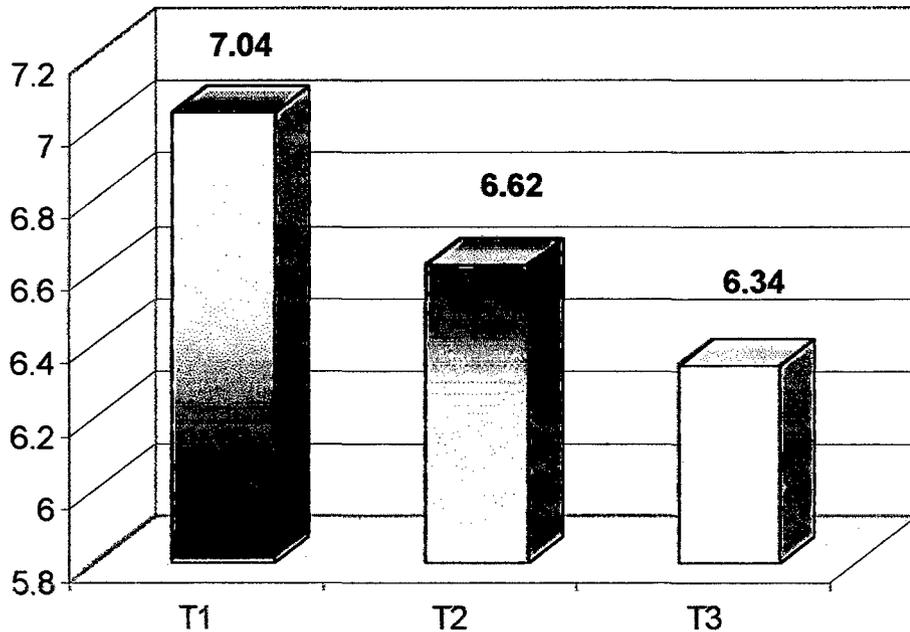
$$C. V. = 2.20$$

$$R^2 = 80.96\%$$

Cuadro N° 18: Prueba de Duncan para determinar la altura de plántulas en mm de *Phragmipedium kovachii* a 35 semanas después de la siembra.

N° de Orden	Tratamientos	promedios	Significación Duncan (0.01)
1	T1	7.04	a
2	T2	6.62	b
3	T3	6.34	c

Gráfico N° 08: Promedio de altura de plántulas en medio de enraizamiento.



5.3.3. Número de raíces.

Cuadro N° 19: Análisis de varianza para determinar el número de raíces del *Phragmipedium kovachii* en fase de enraizamiento a 40 semanas después de la siembra.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Significación 0.05 – 0.01
Tratamientos	2	0.7247	0.3623	65.2195	* *
Error	27	0.1500	0.0056		
Total	29	0.8747	0.3679		

* * = Altamente significativo

$\bar{X} = 0.84$

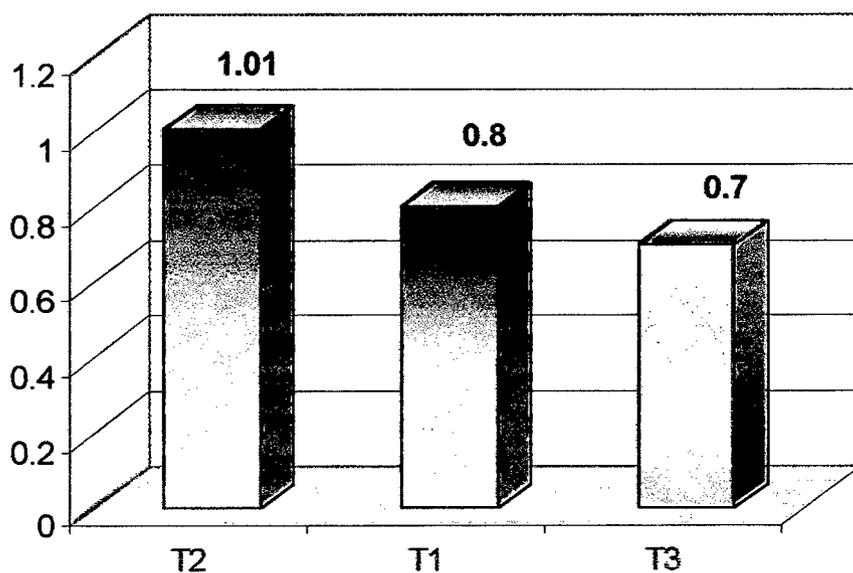
C. V. = 8.91%

R² = 82.85%

Cuadro N° 20: Prueba de Duncan para determinar el número de raíces de *Phragmipedium kovachii* a 40 semanas después de la siembra.

N° de Orden	Tratamientos	promedios	Significación Duncan (0.01)
1	T2	1.01	a
2	T1	0.8	b
3	T3	0.7	c

Gráfico N° 09: Promedio del número de raíces



5.3.4. Longitud de las raíces

Cuadro N° 21: Análisis de varianza para determinar la longitud de la raíces en mm *Phragmipedium kovachii* en fase de enraizamiento a 40 semanas después de la siembra.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Significación 0.05 – 0.01
Tratamientos	2	0.0380	0.0190	59.6510	* *
Error	27	0.0086	0.0003		
Total	29	0.0466	0.0193		

* * = Altamente significativo

$\bar{X} = 0.56$

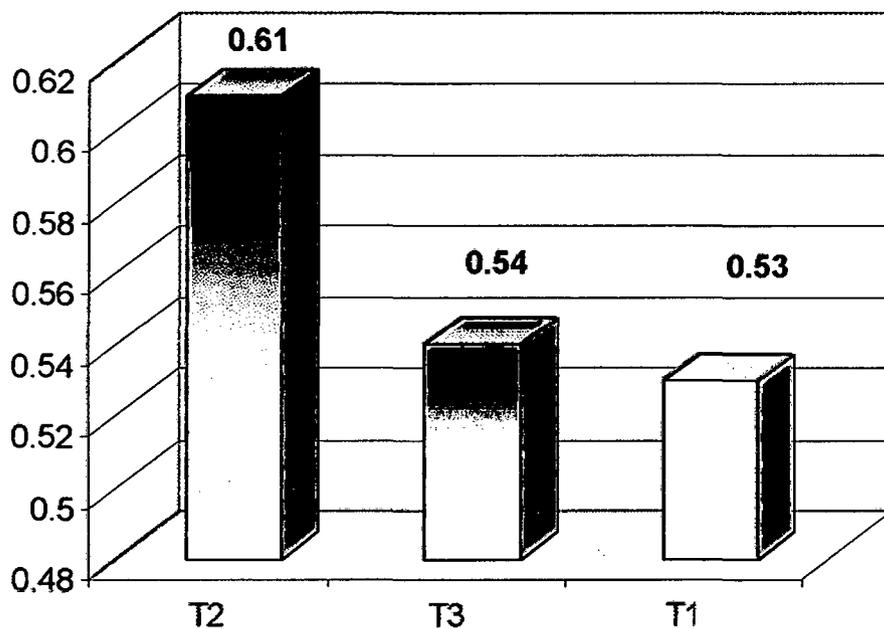
C. V. = 3.10%

R² = 81.56%

Cuadro N° 22: Prueba de Duncan para determinar la longitud de raíces en mm. de *Phragmipedium kovachii* a 40 semanas después de la siembra.

N° de Orden	Tratamientos	promedios	Significación Duncan (0.01)
1	T2	0.61	a
2	T3	0.54	a b
3	T1	0.53	c

Gráfico N° 10: promedio de longitud de raíces.

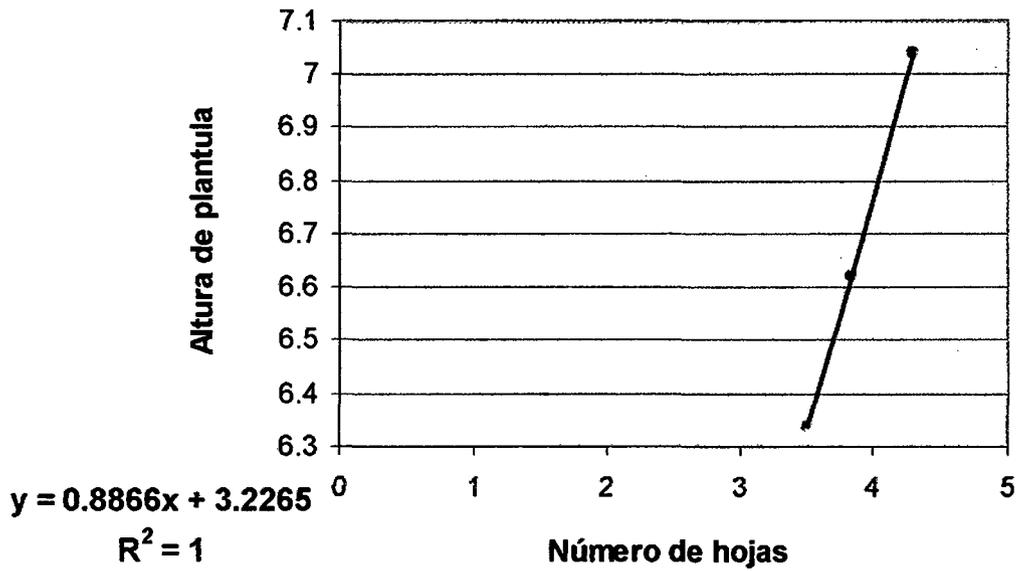


5.3.4 Correlaciones en fase de enraizamiento para el *Phragmipedium kovachii*

**Cuadro N° 23: Correlación entre promedio del número de hojas
Y promedio de altura de plántula.**

Tratamiento	Número de hojas	Altura (mm)
T1	4.3	7.04
T2	3.83	6.62
T3	3.51	6.34

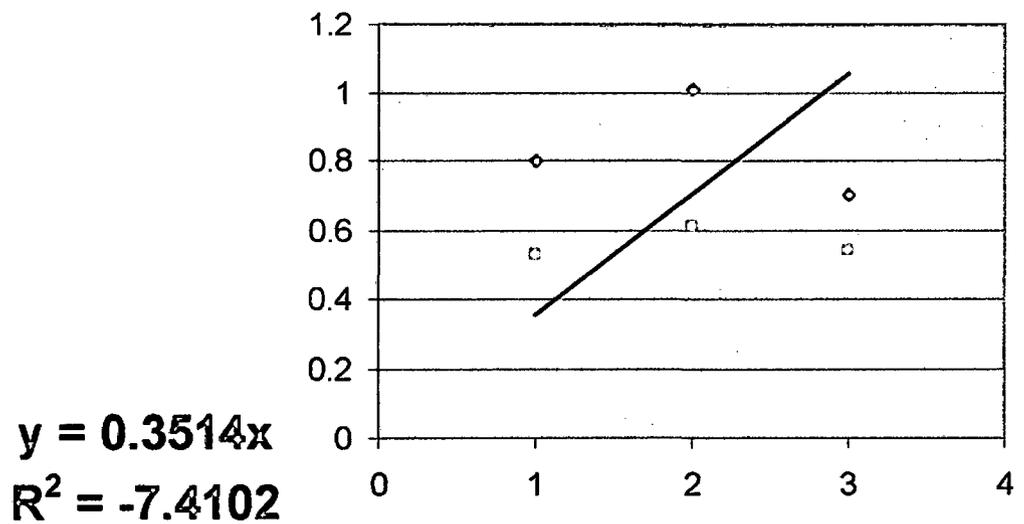
Grafico N° 11: Correlación número de hojas y Altura de plántula



Cuadro N° 24: Correlación entre promedio del número de raíces y longitud de raíces

Tratamiento	Número de raíces	longitud (mm)
T1	0.8	0.53
T2	1.01	0.61
T3	0.7	0.54

Grafico N° 12: Correlación número y longitud de raíces



VI. DISCUSIÓN

6.1. Viabilidad

El cuadro N° 05, nos muestra los resultados de la prueba de viabilidad de las semillas de *Phragmipedium kovachii* antes de la siembra, registrando un 35.6% promedio de semillas viables, de un total de 71.6 semillas evaluadas, en medio de germinación, la razón es que realizamos la prueba de viabilidad por medio del microscopio, para saber si las semillas eran viables o no, también que puedan estar contaminadas o en mal estado lo cual afectaría al medio de cultivo y pérdida de mano de obra.

Esto conforme lo realizado por **RODRÍGUEZ 1 996**, que menciona que para determinar la viabilidad de las semillas de *Phragmipedium kovachii*, se puede realizar por medio del microscopio electrónico, donde se observan las semillas a simple vista, y se reconoce las viables o las no viables.

Existe otro método como es el 2,3, 5 trifenil-tretazolium (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 lo mencionado por **LEÓN (1 995)**.

6.2. Porcentaje de contaminación

El cuadro N° 06, de 2 semana de sembradas las semillas del *Phragmipedium kovachii*, se encontró que un 50% estaban contaminadas y un 50% buenos, esto debido a la acción de algún patógeno (*Fusarium*) que actuó en el medio en la siembra, el cual fue necesario eliminar los tubos contaminados. Por eso es necesario las medidas de asepsia, es decir realizar una desinfección ya sea con hipoclorito de sodio al 0.5 – 1%, para

tener semillas libres de contaminantes y así reducir las probabilidades de contaminación.

Conforme lo indicado por **DONAYRE 2 000**, 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 (peróxido de hidrógeno) y alcoholes, en concentraciones mínimas (0.1 – 0.5%).

Referente a lo que son desinfectantes utilizado por **ARDITTI 1 999**, 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.

El cuadro N° 07, nos muestra al cabo de 5 semanas después de la siembra del *Phragmipedium kovachii* en el medio de cultivo (germinación), a las 35 a 40 días, se evaluó un total de 145.9 semillas, germinadas un promedio de 36.9 con un porcentaje de 25.4%, 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). 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.

Este resultado concuerda con lo planteado para el proceso de propagación *in Vitro* de *Phragmipedium*, por **RODRÍGUEZ 1 996**, donde menciona que

las semillas del *Phragmipedium* pueden germinar a 30 a 75 días y 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.

Referente al tiempo de germinación de las semillas de *Phragmipedium*, se menciona que pueden llegar a germinar de 40 a 70 días, gracias al medio de cultivo empleado y las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, fotoperiodo 18/6), el cual permite un buen desarrollo, esto conforme lo mencionado por **DONAYRE 2 000**.

6.4. Rompimiento de testa.

Se observó que al cabo de 60 días después de la siembra, en 4 etapas de evaluación, se produjo el rompimiento de la testa con un resultado total de 614 semillas, la razón es porque la testa al ser una estructura reticulada que cubre al embrión y compuesta por células indiferenciadas con cuerpos lipidito, proteínas, al entrar en contacto con el medio de cultivo, comienza a desarrollarse y activarse para poder realizar el rompimiento, posteriormente formar protocormo y luego plántula.

Este resultado tiene relación con lo afirmado por **PIERIK 1 989**, cuando menciona que el proceso de rompimiento de testa es rápido y se da por las condiciones ambientales brindadas a la semilla (temperatura, fotoperiodo 18/6, 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. Color verde y marrón.

En el cuadro N° 09, nos muestra que al cabo de 2 semanas después de la siembra en medio de multiplicación, se observó que del total de protocormos, 11 estaban sufriendo problema de fenolización o muerte (color marrón) y un 79 mantenían un color verde (Vivos), esto se da debido al tiempo transcurrido de repique, ya que es necesario el reemplazo cada cierto tiempo (30 días), como también las dosis aplicadas de BAP, la cual impulso un mayor desarrollo de protocormos y fueron eliminando sustancias como fenoles y anhídrido carbónico, contaminando el medio de cultivo, creemos que es necesario la adición de carbón activado o 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 lo que es repique indica **RODRÍGUEZ 1 999**, 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 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 lo que es repique, indicada **DONAYRE 2 000**, 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 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 2 001**

6.6. Número de hojas en fase de desarrollo (multiplicación).

Los cuadros 10 y 11 representan el análisis de varianza y prueba de Duncan; respecto al promedio de número de hojas de *Phragmipedium kovachii*, con valores para el C. V. con 2.30% y R2 con 81.20% que corroboran la confiabilidad de la información obtenida y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

En el Cuadro N° 11, se observa el resultado de la prueba de Duncan en fase de multiplicación, con respecto al número de hojas promedio/tratamiento, con resultados de T1 con 3.27 promedio de hojas, T2 con 3.13 y T3 con 3.5, esto nos indica que hubo poca diferencia en lo que respecta a número de hojas, posiblemente el factor determinante para la formación de brotes (desarrollo de hojas) y formación de raicillas sea la incorporación de BAP y ANA a los medios de cultivo empleados ya que ambos interactúan, aparte incluyendo otros reguladores de crecimiento que son sintetizados por los protocormos. Como lo sostiene **ARDITTI 1 990**, cuando menciona que las auxinas (ANA) y citoquininas (BAP) actúan directamente en el desarrollo de las plántulas, hojas e induce la salida de raíces, gracias a que las hormonas actúan en los procesos fisiológicos y metabólicos específicos dentro de un órgano, siempre con la ayuda de las condiciones ambientales brindadas en la cámara de incubación.

Se puede observar que el T2 obtuvo un bajo promedio de número de hojas con 3,13, con respecto al T1 con 3.27 y T3 con 3.50, esto debido a que en su composición de este medio no contenía algunos componentes que permitían un mayor desarrollo, como es el caso del agua de coco, el cual ayuda a un mejor desarrollo por contener fitohormonas, también no contenía un anti oxidante (myo – inositol) que evita fenolización o retraso en el crecimiento. Tal como sostiene **ESPINOZA 2 001**, que afirma que para un mejor desarrollo se puede utilizar un aditivo como es el caso del agua de coco, el cual posee una gran cantidad de componentes, entre ellos

encontramos fitohormonas con diferentes concentraciones como: auxinas, citoquininas y giberelinas, así mismo **SELENA 1 999**, menciona que las sales minerales y otras fuentes como vitaminas (biotina), glucosa (fuente de carbono), hormonas, empleadas en el medio de cultivo M&S actúan directamente en el desarrollo de los protocormos y formación de hojas e induce la salida de raíces.

6.7. Altura de plántula en fase de desarrollo (multiplicación).

Los cuadros 12 y 13 representan el análisis y la prueba de Duncan respectivamente, respecto al promedio de altura de plántulas de *Phragmipedium kovachii* con valores de C. V. con 4.75% y R^2 con 78.69% el cual corrobora la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudios.

Según el cuadro N° 13, nos muestra el análisis de Duncan para los promedios de altura (longitud) de plántula/tratamiento, donde muestra los valores de T1, con **5.24 mm**, T2, con **5.63 mm**. y T3 con **6.44 mm**. El cual nos indica que hubo una mínima diferencia estadística, pero se observa que el T3 es de mayor altura, de un mejor desarrollo, demostrando que puede existir un equilibrio en las concentraciones del medio de cultivo. En los demás tratamientos el crecimiento fue variado (T1 y T2), gracias a un menor desarrollo de hojas, lo cual es debido posiblemente a la reacción que muestran los protocormos a diversas concentraciones que son sometidas y las variaciones que pueda contener el medio de cultivo y así estimular, inhibir o modificar el desarrollo de los protocormos.

ARDITTI 1 982, menciona que existe diferentes medios para especies de orquídeas aparte del **KNUDSON**, donde incluye en su composición reguladores de crecimiento como son hormonas (en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico), tales como

auxinas, citoquinas, giberelinas, vitaminas (biotina) que actúan sobre los vegetales, algunos actúan en forma rápida, otros lo hacen menos rápido y otros impiden el normal desarrollo de la planta. Así mismo **ARDITTI 1 990**, menciona que las combinaciones de auxinas y citoquininas puede favorecer el mejor desarrollo de las plántulas, induciendo la formación de raíces, siempre y cuando el medio donde se emplea permita interactuar los componentes, como también las condiciones ambientales brindadas.

6.8. Número de hojas en etapa de enraizamiento.

Los cuadros 14 y 15 representan el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente, respecto al promedio de número de hojas, con valores de C. V. con 3.68% y R^2 con 85.17% corroboran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

El cuadro N° 15 de la prueba de Duncan para el promedio de número de hojas de *Phragmipedium kovachii*, en el factor medio de cultivo se observa que existe diferencia estadística. Los tratamientos donde el **T1** con **4.3** supero al **T2** con **3.83** y **T3** con **3.51**, supero a T1 y T2 respectivamente, el cual ha provocado la mayor formación de hojas promedios en las diferentes plántulas por cada tratamiento. La adición de ANA fue el que permitió un mayor desarrollo y permitiendo la salida de raíces, esto corroborado por **ACEVES 2 000**, que afirma que la fase de enraizamiento, se utiliza las sales minerales en el medio de cultivo omitiéndose las citoquininas (BAP) complementando con 1.5 g/l de carbón activado, 20g/l de sacarosa y agregado auxinas (ANA) para favorecer el desarrollo de las plántulas.

De la interacción de los medios de cultivos con respecto al número de hojas en fase de enraizamiento, respondieron mejor el que tubo una dosis mas alta de hormona (auxina) y agua de coco como se observa en el cuadro N° 15, pero el tratamiento T2 en su composición contenía citoquinina

VII. CONCLUSIONES

- 7.1. El protocolo establecido durante el proceso de propagación *in Vitro* del *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalström & Fernández, permitió la germinación de las semillas, formación de protocormos y enraizamiento de las plántulas.
- 7.2. Antes de la siembra se realizó la prueba de viabilidad de las semillas del *Phragmipedium kovachii*, dándonos un resultados en 10 evaluaciones de 35.6% de germinación.
- 7.3. El medio de cultivo empleado para el proceso de germinación, dio buenos resultados a los 30 días después de la siembra con un 25.4%, permitiendo que a los 60 días después de la siembra, se produzca el rompimiento de testa con un número total de 614.
- 7.4. En la etapa de multiplicación, en lo referente a número de hojas y altura de plántula del *Phragmipedium kovachii*, el tratamiento que nos dio buenos resultados fue el T3 con resultado de 6.44 mm y 3.5, esto a 20 semanas después de la siembra y cambiada de medio cada 30 días.
- 7.5. En la etapa de enraizamiento, en lo referente al número de hojas y altura de plántula del *Phragmipedium kovachii*, el tratamiento que nos dio buenos resultados fue el T1 con 4,3 y 7,04 respectivamente, esto a 35 semanas después de su siembra y repicada con anterioridad.
- 7.6. En la etapa de enraizamiento, en lo referente a número de raíces y longitud de raíces del *Phragmipedium kovachii*, el tratamiento que nos dio buenos resultados fue el T2 con 1,01 y 0,61 respectivamente, esto a 40 semanas después de la siembra y repicada con anterioridad.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1. Emplear pequeñas cantidades de semillas de *Phragmipedium* por tubos de ensayo, para así evitar competencias, fenómenos de vitrificación o fenolización y malformación de plántulas.
- 8.2. Realizar ensayos con hormonas citoquininas (BAP) y auxinas (ANA) en especies de *Phragmipedium* para determinar la relación adecuada a la multiplicación de protocormos.
- 8.3. Establecer un protocolo general para especies de *Phragmipedium* que puedan ayudar a recuperar estas especies, que con el tiempo pueden llegar a desaparecer.
- 8.4. Evaluar posteriormente otros medios de cultivos para especies de *Phragmipedium*, que puedan favorecer mejores resultados, logrando así plantas más vigorosas y de buen tamaño en menor tiempo.
- 8.5. Continuar con diferentes trabajos de investigación en especies de *Phragmipedium*, evitando así su extinción de su habitat.
- 8.6. La Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, debe contar con un banco de germoplasma de especies de orquídeas, para su conservación y servir como material genético para el cultivo de tejidos vegetales.
- 8.7. Que el Gobierno Regional se preocupe por la ilegalidad de nuestros recursos (flora), en cuanto a la extracción indiscriminada, para ser exportados y comercializados al exterior, sin que podamos hacer algo para impedirlo.

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 tres medios de cultivo *in Vitro* (germinación, multiplicación y enraizamiento) en *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalström & Fernández a partir de semillas, para plántulas libres de patógenos y se adecuó un diseño completamente al azar, 3 x 10 (medios de cultivo) y 10 repeticiones.

Las semillas a 30 días después de la siembra en un medio de germinación, comenzaron a germinar y a 60 días comenzó el proceso de rompimiento de testa que cubre el embrión para su desarrollo y formación de protocormos, observando un bajo nivel de contaminación luego de 2 semanas, esto debido a la asepsia que se manejó mas adelante y en todo momento durante el repique y transplante.

A 20 semanas después de la siembra en medio de desarrollo (multiplicación), las plántulas mostraron resultado promedio de 3.5 número de hojas y 6.44 mm altura de plántula en el medio M3, en comparación a M1 con 3.27 número de hojas y 5.63 mm altura de plántula y M2 con 3.13 número de hojas y 5.24 mm altura de plántula.

A las 35 semanas después de la siembra y en medio de enraizamiento las plántulas mostraron resultados promedios de 4.3 número de hojas y 7.04 mm altura de plántula en el medio M1; 3.83 número de hojas y 6.62 mm altura de plántulas en el medio M2; 3.51 número de hojas y 6.34 mm altura de plántulas en el medio M3.

A las 40 semanas después de la siembra y en medio de enraizamiento las plántulas mostraron resultados de 0.8 número de raíces promedio y 0.53 mm longitud de raíces promedio en el medio M1; 1.01 número de raíces promedio y 0.61 mm de longitud de raíces promedio en el medio de enraizamiento M2; 0.7 número de raíces promedio y 0.54 mm de longitud de raíces promedio en el M3.

IX. SUMMARY

The investigation of the present job was done at the Laboratory of Cultivation of Tejidos Vegetales of the a San Martin University of Tarapoto with the objective to evaluate the efficiency of three methods of cultivating in Vitro (germination, multiplication, and rooting) in *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalström & Fernandez, to separate seeds for plants free of pathogens and a design was completed at random. 3x10 (methods of cultivating) and 10 repetitions.

The seeds in 30 days after the planting in one form of germinating they began to germinate, at 60 days the process of tearing the sprout that covers the embryo for its development and formation of protocormos observing a low level of contamination, after 2 weeks because of the asepsis manner in which it was conducted earlier and during the entire time of chime transplant.

At 20 weeks after the planting between the growth (multiply) the plants demonstrate average result 3.5 of leafs and 6.44 mm, high of the plant in the middle M3, in comparison of M1 3.27 number of leafs and 5.63 mm high of plant and M2 with 3.13 number of leafs and 5.24 mm high of plant.

At 35 weeks after the planting and in between the rooting of the plants they demonstrate average results of 4.3 number of leafs and 7.04 mm high of the plant and in the middle M1; 3.83 number of leafs and 6.62 mm high of the plant in the middle M2 3.5 number of leafs and 6.34 mm high of the plants in the middle of M3.

At 40 weeks after the planting and in between the process of rooting, the plants demonstrate average results of 0.8 number of roots and 0.61 mm the length of roots, average in the middle M1; 1.01 number of roots average and 0.61 mm the length of roots, average between rooting and 0.54 mm the length of roots average in the M3.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **ACEVES R. J.L. 2 000.** Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in Vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. Veracruz - México
2. **ARDITTI J. 1 977.** 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.
3. **ARDITTI, J. 1 982.** Orchid seed germination and seedling culture – A. Manual. En J.
4. **ARDITTI, J. 1 984.** An History of Orchid Hibridation, Seed Germination and Tissue Culture. Bot. J. Linn. Soc. 89 New York. Pp: 359 – 381.
5. **ARDITTI, J. 1 990.** Lewis Knudson: His Science, His times and his legacy. Lindleyana. 5 Pp 1 – 79.
6. **ARDITTI J. 1 993.** Micropropagation of orchids. J. Wiley & Sons Inc. New York. Pp 520 – 521.
7. **ATWOOD J. 2 002.** *Phragmipedium kovachii*. Jardín botánico de Missouri. EE.UU.
8. **BENNETT, D. 1 999.** *Phragmipedium* – híbrido natural. Lima, Peru, Doc 5 Pag.
9. **CALZADA B. 1982.** Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial Milagros S. A. Lima – Perú 644p

10. **CIRGERV. 1 994.** Resúmenes del primer curso de propagación *in Vitro* de plantas ornamentales. Centro de investigación en Recursos genéticos y biotecnología. UNALM. Lima – Perú. Pp 35- 40.
11. **COOKE, L. 1 999** ORCHIDS. Ortho Books. Editor Meredith. Books. United States of America. Pp 88.
12. **DONAYRE T. A. 2000.** Métodos en la Propagación de semillas de orquídea Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. UNMSM. Lima – Perú.
13. **ESPINOZA G. A. 2 001.** Proliferación de *rhynchostele bictoniense* (orchidaceae) a partir de semillas y explantes de material cultivado *in Vitro*. Universidad Nacional Autónoma de México – Laboratorio de Cultivo de Tejido vegetales.
14. **HOLDRIDGE, L. R. 1 978.** Ecología Basada en zonas de vida. IICA. San José – Costa Rica. 216 p.
15. **HOUCH R. 2 000.** O mundo das Orquídeas. IBC – Instituto de cultura de Brasil. Brasil – Río De Janeiro. Pp 46 – 48.
16. **IMES R. 1 997** Orquídeas. Editorial Zendrela Zariquiey. Barcelona - España. Pp 46 – 52
17. **LEON, M. 1 995** Tesis "Conservación de Especies Peruanas de Orquídeas Utilizando Técnicas de Cultivo de Tejidos In Vitro. UNALM. Pp 14 – 15.
18. **MC COOK, M. 1 998.** The Genus *Phragmipedium*, wets Palm Beach; Florida USA. 200 Pag.

19. **MC HATTON R.2 003.** OCHID DIGEST. Volumen 67. Editorial Board.
Oxford Road, san Marino – EEUU. Pp 216, 248 – 252.
20. **MOSQUIN D. 2 003.** El ladrón de orquídeas Sociedad Peruana de la
Orquídea. Lima – Perú. [http://www. Phragmipedium kovachii](http://www.Phragmipediumkovachii.com)el ladrón
de orquídeas. com. pe.
21. **OAKES, A. & DONAVAN, S. 1 952.** Orchid of Guatemala United States of
America, 400 Pag.
22. **PIERIK R. L. M. 1 989.** Cultivo in Vitro de las plantas superiores.
23. **RACH N. 2 004.** El kovachii, emocionante *Phragmipedium* , supplement de
Selbyana 23: 1, f.1.Houston - EEUU. [Http://www.Phragmipeium
kovachii.com](Http://www.Phragmipeiumkovachii.com).
24. **RODRIGUEZ M.1 996.** Estudio Comparativo de los Medios de cultivo *In Vitro*
a partir de semillas en la especie *Phragmipedium besseae Dodson &
Kuhn*. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Maestría en Biología.
Lima – Perú.
25. **SELENA L. A. 1 999.** Propagación in Vitro de orquídeas a partir de semilla
sexual. Universidad de Caldas – A. A. – Manizales - Colombia
26. **ZUIDERWIR R. 2 003.** *Phragmipedium* web site (including *mexipedium* &
selenipedium). New York - EEUU. <Http://www.Phragmipedium.com>.

XI. ANEXOS

Grafico N° 13: Esquema del proceso de propagación *in Vitro* del *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalström & Fernández.

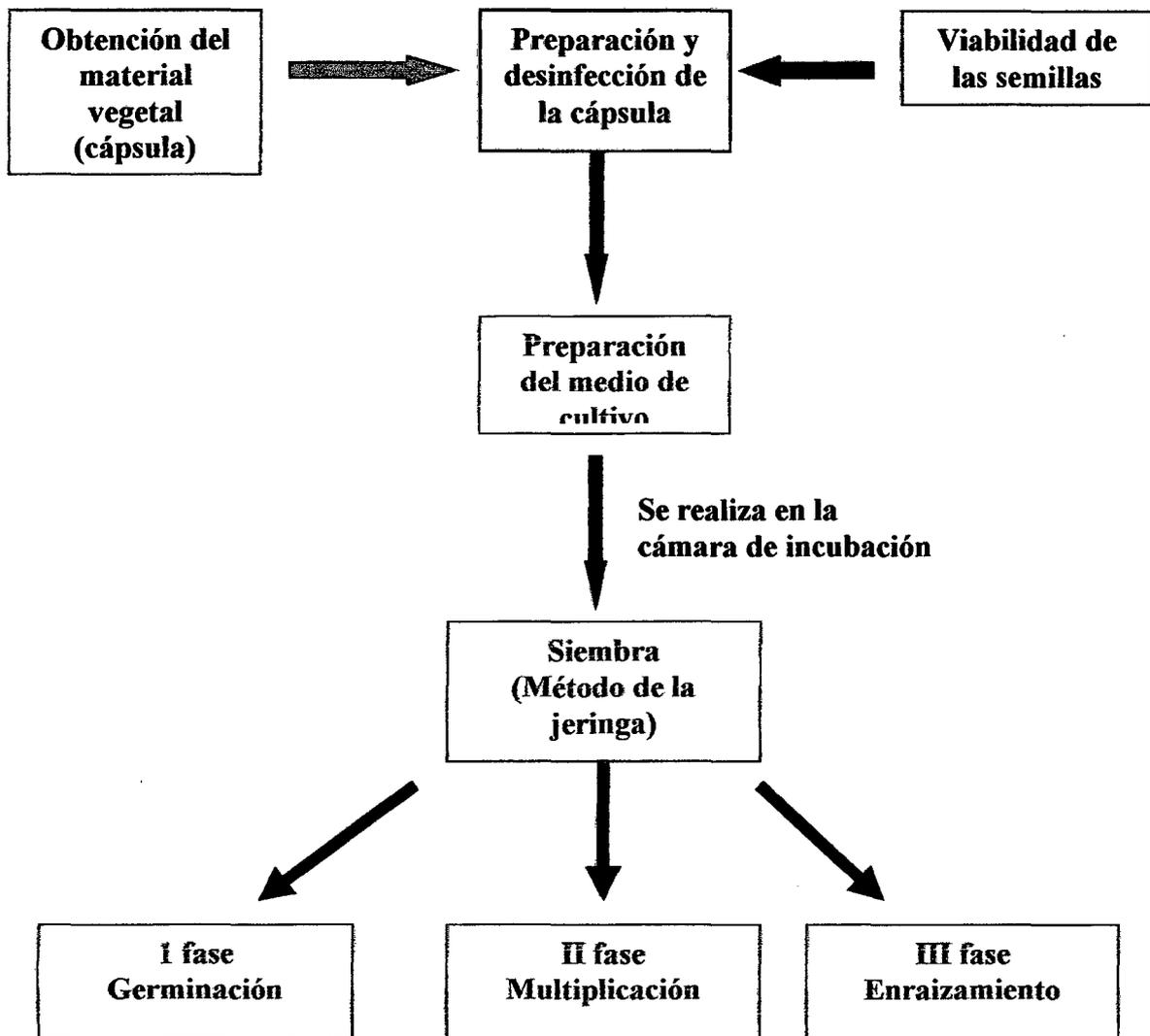




Foto N° 29: preparación de medio de cultivo. LCTV – UNSM - T

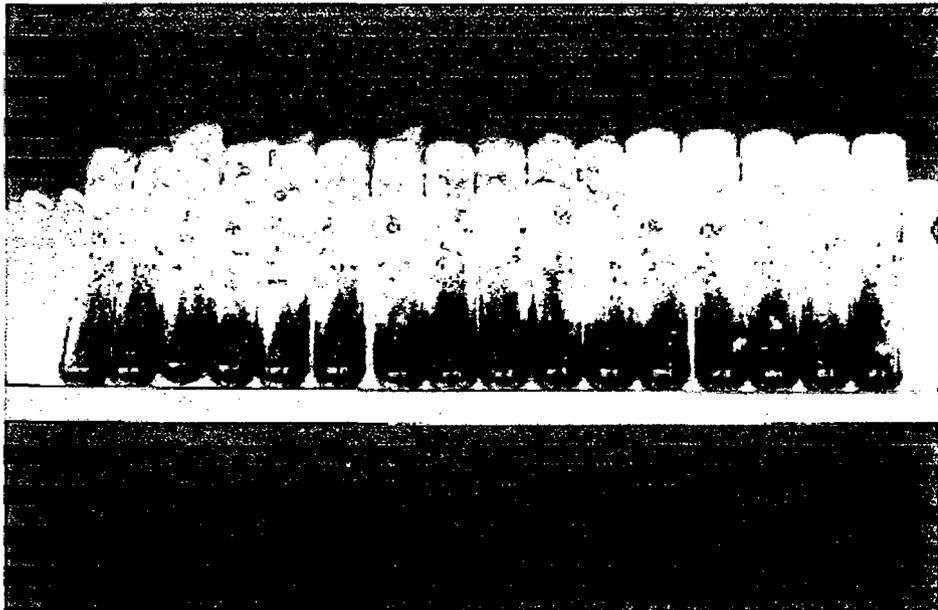
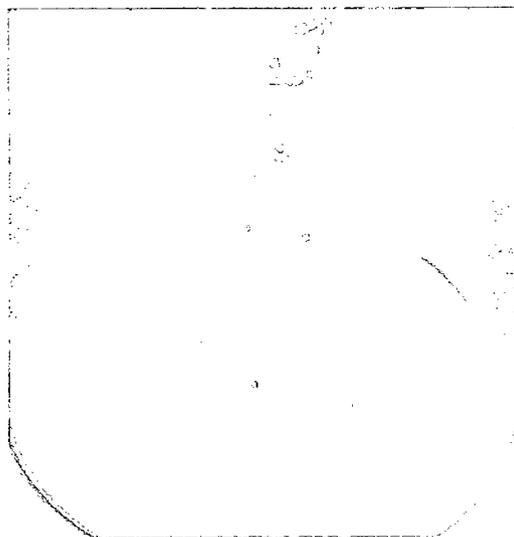


Foto N° 30: Tubos de ensayo con medio de cultivo para *Phragmipedium kovachii*. LCTV – UNSM - T

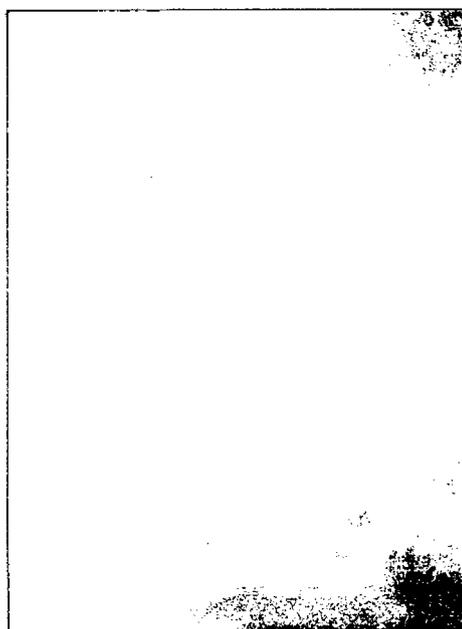
Foto N° 31:
Phragmipedium en fase
de enraizamiento



A



B



C

Foto N° 32(a), 33(b), 34(c) Fase de
enraizamiento. LCTV - UNSM - T



Foto N° 35: Proceso de floración del *Phragmipedium kovachii*
Atwood Dalström & Fernández

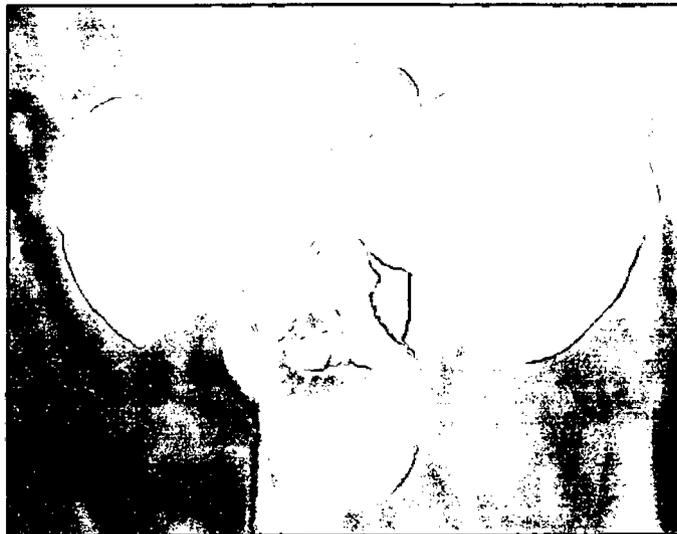
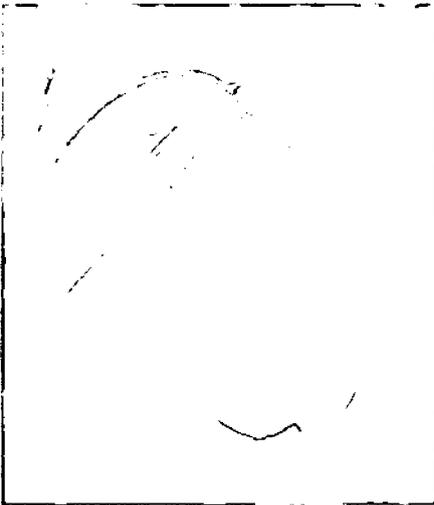
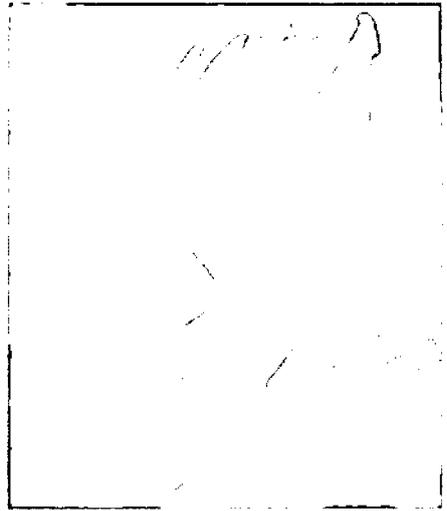
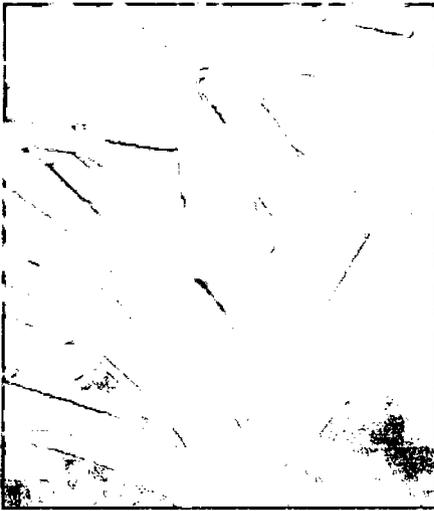


Foto N° 36: Ubicación de la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalström & Fernández en el departamento de San Martín.

