

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE QUITO**

**CARRERA:**  
**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Tesis previa a la obtención del Título de: INGENIERO EN**  
**BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**  
**Determinación de los protocolos para cultivo *in-vitro* de las especies**  
***Epidendrum schistochilum* y *Oncidium cultratum***

**AUTOR:**  
**EDGAR FERNANDO PAREDES SANDOVAL**

**DIRECTOR:**  
**DR. MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

**QUITO, ABRIL DEL 2012**

## **DECLARACIÓN**

Yo, Edgar Fernando Paredes Sandoval, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación personal; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Politécnica Salesiana, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de prioridad intelectual, por su reglamento y por su normatividad institucional vigente.

-----  
Edgar Fernando Paredes Sandoval.  
CI: 171944055-2

## **DEDICATORIA**

La presente investigación va dedicada primeramente a Dios quien ha sido mi sendero y pilar principal de mi vida. A mis padres, a mi familia, quienes por su comprensión y ayuda en momentos malos y menos malos me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento; me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia, mi empeño y todo ello con una gran dosis de amor sin pedir nunca nada a cambio; han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante buscando siempre el mejor camino.

A la persona que amo, aprecio y comparto momentos inolvidables; mi compañera, mi fortaleza y mi mejor amiga; por su paciencia, por su comprensión, por su empeño, por su fuerza, por su sencillez, mi Isa la dedicatoria de este trabajo realizado es para ti.

A mis amigos, quienes me han brindado su apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida.

## AGRADECIMIENTO

Me complacería agradecer sinceramente, a mi director de Tesis y maestro el Dr. Marco Cerna por su asesoramiento, por sus valiosas aportaciones en mi trabajo; sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia, su motivación, su responsabilidad y rigor académico han sido fundamentales para el desarrollo de mi investigación y mi formación como investigador.

También me gustaría agradecer a la Ing. Diana Calero Directora de la Carrera, la Dra. Tatiana Mosquera, quienes han permitido y facilitado la elaboración de mi investigación en los laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana.

Un agradecimiento especial a Philip Seaton y a Leonardo Vaca por las sugerencias, recomendaciones y todas las aportaciones brindadas, que fueron valiosas para continuar con mi trabajo investigativo.

De igual manera agradecer a los compañeros de carrera que conformaron el grupo de trabajo en el proyecto de Investigación de manejo *in-vitro* de Orquídeas, los cuales colaboraron y prestaron ayuda en mi trabajo: María Isabel Novillo, Pablo Inga, Gabriel Salazar y Rommel Rodríguez.

Y a todas las demás personas que de una u otra manera ayudaron en el desarrollo de mi trabajo de Tesis, les doy mis agradecimientos.

## ÍNDICE GENERAL

TEMA	PÁGINA
DECLARACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Tema</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Hipótesis</b>	<b>3</b>
2.2.1 Hipótesis alterna	3
2.2.2 Hipótesis Nula	3
<b>2.3 Objetivos</b>	<b>4</b>
2.3.1 General	4
2.3.2 Específicos	4
<b>2.4 Justificación</b>	<b>5</b>
<b>3 MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Descripción Botánica/Ecológica de la Familia <i>Orchidaceae</i></b>	<b>6</b>
3.1.1 Historia	6
3.1.2 Taxonomía	6
3.1.2.1 Distribución en Ecuador	7
3.1.2.2 Endemismo	7

3.1.3	Morfología y descripción	8
3.1.4	Hábitat	10
3.1.5	<i>Género Epidendrum</i>	11
3.1.5.1	Generalidades	11
3.1.5.2	Taxonomía	12
3.1.5.3	Distribución en el Ecuador	12
3.1.5.4	Anatomía	12
3.1.5.5	Fisiología	12
3.1.5.6	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr	13
3.1.6	<i>Género Oncidium</i>	14
3.1.6.1	Generalidades	14
3.1.6.2	Taxonomía	15
3.1.6.3	Distribución en el Ecuador	15
3.1.6.4	Anatomía	15
3.1.6.5	Fisiología	16
3.1.6.6	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl	16
<b>3.2</b>	<b>Identificación, almacenamiento y conservación de semillas de orquídea</b>	17
3.2.1	Generalidades	17
3.2.2	Identificación del material vegetal colectado	18
3.2.3	Evaluación de la calidad de las semillas	19
3.2.4	Distinción y secado de las semillas	19
3.2.5	Método de almacenaje al vacío	19
<b>3.3</b>	<b>Cultivo <i>in-vitro</i></b>	20
3.3.1	Protocolo para cultivo <i>in-vitro</i>	21
3.3.2	Proceso de desinfección y siembra <i>in-vitro</i> del explante	21
3.3.3	Germinación <i>in-vitro</i> de semillas de orquídeas	23
3.3.3.1	Crecimiento <i>in-vitro</i> de las semillas de orquídea	23
3.3.4	Medios de Cultivo	24
3.3.4.1	Las sales inorgánicas	25
3.3.4.2	Los compuestos orgánicos	25
3.3.4.3	Las preparaciones naturales complejas	25
3.3.4.4	Los Materiales inertes	25
3.3.5	Medios de cultivo para orquídeas	26
3.3.5.1	Medio Murashige y Skoog (mg/l)	27

3.3.5.2	Medio Phytamax (mg/l)	27
3.3.5.3	Medio Knudson modificado (mg/l)	28
3.3.5.4	Medio de Coco (g/l)	29
3.3.5.5	Medio de plátano (g/l)	29
3.3.5.6	Medio de piña (g/l)	29
3.3.5.7	Medio Knudson (mg/l)	30
3.3.6	Cámara de flujo laminar	30
3.3.7	Cámara de crecimiento	31
<b>3.4</b>	<b>Aclimatación</b>	<b>32</b>
3.4.1	Generalidades	32
3.4.2	Invernadero	33
3.4.2.1	Cámara de aclimatación	33
3.4.3	Sustratos	34
3.4.4	Sustrato para <i>Epidendrum</i> sp y <i>Oncidium</i> sp	35
3.4.5	Condiciones ambientales para <i>Epidendrum</i>	35
3.4.6	Condiciones ambientales para <i>Oncidium</i>	35
3.4.7	Abonos y fertilizantes	36
<b>4</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Recolección, identificación y almacenamiento del material genético</b>	<b>38</b>
4.1.1	Materiales	38
4.1.2	Equipos	38
4.1.3	Procedimiento	38
<b>4.2</b>	<b>Medios de cultivo</b>	<b>42</b>
4.2.1	Preparación de los medios	42
4.2.1.1	Materiales	42
4.2.1.2	Reactivos	42
4.2.1.2.1	Medios de cultivo estándares y caseros	42
4.2.1.2.2	Medios de cultivo modificados	43
4.2.1.3	Equipos	45
4.2.1.4	Procedimiento	45
4.2.2	Siembra de las semillas	47
4.2.2.1	Materiales	47

4.2.2.2	Reactivos	47
4.2.2.3	Equipos	47
4.2.2.4	Procedimiento	47
4.2.2.4.1	Desinfección de las semillas	47
4.2.2.4.2	Siembra en la cámara de flujo laminar	48
4.2.2.5	Análisis de datos	50
4.2.2.5.1	Medios estándares y caseros:	50
4.2.2.5.2	Medios modificados:	50
4.2.2.5.3	Variables evaluadas:	50
4.2.2.6	Análisis estadístico	53
<b>4.3</b>	<b>Aclimatación de las plántulas</b>	<b>54</b>
4.3.1	Materiales	54
4.3.2	Reactivos	54
4.3.3	Equipos	54
4.3.4	Procedimiento	54
4.3.5	Análisis de datos	57
4.3.5.1	Variables evaluadas	57
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Recolección, identificación y almacenamiento del material genético</b>	<b>59</b>
5.1.1	Discusión	63
<b>5.2</b>	<b>Evaluación de los medios de cultivo</b>	<b>64</b>
5.2.1	Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	65
5.2.2	Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	67
5.2.3	Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	69
5.2.4	Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer mes de siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	74
5.2.5	Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	76
5.2.6	Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la	

siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	79
5.2.7 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	84
5.2.8 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl.	86
5.2.9 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	89
5.2.10 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer mes de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	93
5.2.11 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	95
5.2.12 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	97
5.2.13 Discusión	102
5.3 Comportamiento de las plántulas en la fase de aclimatación	104
5.3.1 Aclimatación de <i>E. schistochilum</i> Schltr	104
5.3.2 Aclimatación de <i>O. cultratum</i> Lindl	106
5.3.3 Comparación en la adaptación entre <i>E. schistochilum</i> Schltr y <i>O. cultratum</i> Lindl durante la aclimatación	108
5.3.4 Discusión	109
<b>5.4 Protocolo para el cultivo <i>in-vitro</i> de <i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr</b>	110
5.4.1 <u>Manejo del material genético</u>	110
5.4.1.1 Obtención de las semillas a partir de cápsula madura	110
5.4.1.2 Identificación de la calidad de las semillas	110
5.4.1.3 Secado y almacenamiento al vacío	111
5.4.1.4 Desinfección	111
5.4.2 <u>Medios de cultivo</u>	112
5.4.2.1 Preparación de los medios óptimos	112
5.4.2.2 Siembra <i>in-vitro</i>	113
5.4.3 <u>Aclimatación</u>	114
5.5 Protocolo para el cultivo <i>in-vitro</i> de <i>Oncidium cultratum</i> Lindl.	116
5.5.1 <u>Manejo del material genético</u>	116
5.5.1.1 Obtención de las semillas a partir de cápsula madura	116
5.5.1.2 Identificación de la calidad de las semillas	116

5.5.1.3	Secado y almacenamiento al vacío	117
5.5.1.4	Desinfección de semillas a partir de cápsula madura	117
5.5.1.5	Desinfección de semillas a partir de cápsula (verde) no madura	118
5.5.2	<u>Medios de cultivo</u>	118
5.5.2.1	Preparación de los medios óptimos	118
5.5.2.2	Siembra <i>in-vitro</i>	120
5.5.3	<u>Aclimatación</u>	121
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	123
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	125
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	126

## LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro N° 1. Formulación medio Murashige y Skoog	27
Cuadro N° 2. Formulación medio Phytamax	28
Cuadro N° 3. Formulación medio Knudson modificado	28
Cuadro N° 4. Formulación medio de Coco	29
Cuadro N° 5. Formulación medio de plátano	29
Cuadro N° 6. Formulación medio de piña	29
Cuadro N° 7. Formulación medio Knudson	30
Cuadro N° 8. Requerimientos de cultivo para algunos géneros de orquídeas	36
Cuadro N° 9. Proceso de elaboración de medios de cultivo	45
Cuadro N° 10. Proceso de siembra de las semillas en cámara de flujo laminar y traspaso a la cámara de crecimiento	48
Cuadro N° 11. Método de evaluación para el estado de desarrollo de las semillas de <i>E. schistochilum</i> Schltr, y <i>O. cultratum</i> Lindl, en medios de cultivo estándares y caseros	52
Cuadro N° 12. Método de evaluación para el estado de desarrollo de las semillas de <i>E. schistochilum</i> Schltr, y <i>O. cultratum</i> Lindl, en medios de cultivo modificados	52
Cuadro N° 13. Comportamiento de las plántulas en el propagador y medio externo	58
Cuadro N° 14. Identificación de las especies colectadas.	59
Cuadro N° 15. Evaluación al primer mes de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios estándares y caseros	65
Cuadro N° 16. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios estándares y caseros.	66
Cuadro N° 17. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	66
Cuadro N° 18. Evaluación al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr, en los medios estándares y caseros	67
Cuadro N° 19. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios de cultivo estándares y caseros	68
Cuadro N° 20. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	69

Cuadro N° 21. Evaluación al primer semestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios estándares y caseros	69
Cuadro N° 22. Test de Kruskal-Wallis de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr.	70
Cuadro N° 23. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	71
Cuadro N° 24. Desempeño de los medios estándares y caseros a través de los rangos promedio del Test de Kruskal Wallis en <i>E. schistochilum</i> Schltr.	72
Cuadro N° 25. Evaluación al primer mes de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios modificados	74
Cuadro N° 26. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios de cultivo modificados	75
Cuadro N° 27. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer mes de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	75
Cuadro N° 28. Evaluación al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios modificados	76
Cuadro N° 29. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios de cultivo modificados	77
Cuadro N° 30. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	78
Cuadro N° 31. Evaluación al primer semestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios modificados	79
Cuadro N° 32. Test de Kruskal-Wallis al primer semestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr en los medios de cultivo modificados	80
Cuadro N° 33. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la siembra de <i>E. schistochilum</i> Schltr	80
Cuadro N° 34. Desempeño de los medios modificados a través de los rangos promedio del Test de Kruskal Wallis en <i>E. schistochilum</i> Schltr	81
Cuadro N° 35. Evaluación al primer mes de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios estándares y caseros	84
Cuadro N° 36. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios de cultivo estándares y caseros	85
Cuadro N° 37. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	86

Cuadro N° 38. Evaluación al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios estándares y caseros	86
Cuadro N° 39. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios de cultivo estándares y caseros	87
Cuadro N° 40. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	88
Cuadro N° 41. Evaluación al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios estándares y caseros	89
Cuadro N° 42. Test de Kruskal-Wallis al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios de cultivo estándares y caseros	90
Cuadro N° 43. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	90
Cuadro N° 44. Desempeño de los medios estándares y caseros a través de los rangos promedio del Test de Kruskal Wallis en <i>O. cultratum</i> Lindl.	91
Cuadro N° 45. Evaluación al primer mes de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios modificados	93
Cuadro N° 46. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios de cultivo modificados	93
Cuadro N° 47. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer mes de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	94
Cuadro N° 48. Evaluación al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios modificados	95
Cuadro N° 49. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios de cultivo modificados	96
Cuadro N° 50. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	96
Cuadro N° 51. Evaluación al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios modificados	97
Cuadro N° 52. Test de Kruskal-Wallis al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl, en los medios de cultivo modificados	98
Cuadro N° 53. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la siembra de <i>O. cultratum</i> Lindl	99
Cuadro N° 54. Desempeño de los medios modificados a través de los rangos promedio del Test de Kruskal Wallis en <i>O. cultratum</i> Lindl.	100

Cuadro N° 55. Comportamiento de <i>E. schistochilum</i> Schltr en el propagador y al medio externo	104
Cuadro N° 56. Comportamiento de <i>O. cultratum</i> Lindl en el propagador y al medio externo.	106

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO	PÁGINA
Gráfico N° 1. Partes de una flor de Orquídea	8
Gráfico N° 2. Semillas de <i>O. cultratum</i> Lindl., con embrión y sin embrión.	9
Gráfico N° 3. Especie representativa del género <i>Epidendrum</i>	11
Gráfico N° 4. <i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr	13
Gráfico N° 5. Especie representativa del género <i>Oncidium</i>	14
Gráfico N° 6. <i>Oncidium cultratum</i> Lindl	17
Gráfico N° 7. Desarrollo de una orquídea epífita	24
Gráfico N° 8. Cabina de flujo laminar vertical	31
Gráfico N° 9. Cámara de crecimiento	32
Gráfico N° 10. Cámara de aclimatación (propagador)	34
Gráfico N° 11. Procedimiento de la colección e identificación del material vegetal	40
Gráfico N° 12. Procedimiento del secado y almacenamiento del material vegetal	41
Gráfico N° 13. Proceso de elaboración de los medios de cultivo	46
Gráfico N° 14. Procedimiento para la siembra de las semillas	49
Gráfico N° 15. Procedimiento para la aclimatación de las plántulas	55
Gráfico N° 16. Semillas de <i>E. schistochilum</i> Schltr y <i>O. cultratum</i> Lindl vista en el microscopio	60
Gráfico N° 17. Semillas de <i>E. schistochilum</i> Schltr y <i>O. cultratum</i> Lindl en el desecador empleando sílica gel como desecador	61
Gráfico N° 18. Tubos almacenados al vacío de <i>E. schistochilum</i> Schltr	62
Gráfico N° 19. Tubos almacenados al vacío de <i>O. cultratum</i> Lindl	62
Gráfico N° 20. Estadíos de crecimiento de <i>E. schistochilum</i> Schltr	64
Gráfico N° 21. Histograma de desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros en <i>E. schistochilum</i> Schltr, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis	73
Gráfico N° 22. Histograma de desempeño de los medios de cultivo modificados en <i>E. schistochilum</i> Schltr, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis	82
Gráfico N° 23. Estadíos de crecimiento en <i>O. cultratum</i> Lindl.	84
Gráfico N° 24. Histograma de desempeño de los medios de cultivo estándares y	

caseros en <i>O. cultratum</i> Lindl, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis	92
Gráfico N° 25. Histograma de desempeño de los medios de cultivo modificados en <i>O. cultratum</i> Lindl, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis	101
Gráfico N° 26. Tiempo de adaptación de las plántulas de <i>E. schistochilum</i> Schltr. en el propagador y al medio externo	105
Gráfico N° 27. Plántulas de <i>E. schistochilum</i> Schltr al medio externo	106
Gráfico N° 28. Tiempo de adaptación de las plántulas de <i>O. cultratum</i> Lindl en el propagador y al medio externo	107
Gráfico N° 29. Plántulas de <i>O. cultratum</i> Lindl al medio externo	108
Gráfico N° 30. Comparación de la adaptación de las especies dentro y fuera del propagador	108

UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA  
SEDE QUITO

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Determinación de los protocolos para cultivo *in-vitro* de *Epidendrum schistochilum* Schltr y *Oncidium cultratum* Lindl.

Autor: Fernando Paredes

Director de tesis: Dr. Marco Cerna

Fecha: abril 2012.

**RESUMEN**

Esta investigación tiene como objetivo establecer protocolos para el manejo en el cultivo *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr y *O. cultratum* Lindl mediante el ensayo de las técnicas de manejo de semillas, medios de cultivo y trasplante, con el propósito de disponer de material genético para su conservación. La colecta de las plántulas se realizó en las cercanías de la Reserva Yanacocha, provincia de Pichincha y en los taludes de la carretera vía Salcedo-Píllaro Km 5, provincia de Cotopaxi. Las cápsulas fueron secadas utilizando sílica gel como desecante y almacenadas después al vacío en tubos de ensayo para su conservación. Para la siembra, se efectuó el proceso de desinfección de las semillas utilizando el método del sobre y el de cápsula verde. Después de la siembra se evaluaron medios de cultivo estándares (Murashige&Skoog, Knudson, Knudson modificado y Phytamax); medios caseros (piña, coco y plátano); y medios modificados (Murashige&Skoog y Knudson; suplementados con extractos de plátano y coco cada uno); para determinar el más apto para cada especie. Posteriormente se realizó la aclimatación de las dos especies en sustratos de musgo *Sphagnum* más corteza de pino fina y de musgo *Sphagnum* con fibra de coco y piedra volcánica, respectivamente; dentro de un propagador en condiciones controladas para su evaluación de adaptación en el tiempo. Los resultados mostraron que el uso de sílica gel fue idónea en *Epidendrum* pero desfavorable en *Oncidium*, ya que las semillas de esta especie se secaron excesivamente imposibilitando su germinación. En el crecimiento *in-vitro* se determinó que los medios: Phytamax y Murashige & Skoog más harina de plátano fueron los más aptos en *Epidendrum*; a su vez, los medios Knudson y Knudson suplementado con harina de plátano a partir de cápsula verde fueron los más eficientes para *Oncidium*. En la aclimatación, las plántulas se adaptaron positivamente en los sustratos propuestos; para *Epidendrum* se determinó que el tiempo apto para su adaptación fue al día 45 en el propagador y *Oncidium* necesitó de 30 días en el propagador; posteriormente las plántulas fueron sacadas al medio externo.

Palabras clave: *Epidendrum*, *Oncidium*, cultivo *in-vitro*, medios de cultivo, orquídea, germinación, aclimatación.

## ABSTRACT

This research aims to establish protocols for handling *in-vitro* cultivation of *E. schistochilum* Schltr and *O. cultratum* Lindl, by testing the seed management techniques, culture media and transplantation, with the purpose of providing genetic material for conservation. The collection of seedlings was made near the Yanacocha Reserve Pichincha's province and the slope of the road, Km 5 Píllaro-Salcedo, in the Cotopaxi's province. The capsules were dried using silica gel as a desiccant and stored after vacuum test tubes for storage. For planting took place using a process of disinfecting the seeds, using the envelope method and the green capsule method. After sowing culture media were assessed standards: (Murashige and Skoog, Knudson, Knudson modified and Phytamax) home media (pineapple, coconut, banana) and modified media (Murashige and Skoog medium supplemented with Knudson and banana extracts coco each), to determine the most suitable for each species. After determining which method worked best, both species were acclimated respectively in substrates of *Sphagnum* moss more fine pine bark and *Sphagnum* moss mixed with coconut fiber and volcanic rock inside a propagator under controlled conditions for evaluation of adaptation over time. The results showed that the use of silica gel was suitable in *Epidendrum* but unfavorable in *Oncidium* because the seeds of this species were over-dried and which made impossible germination. The *in-vitro* growth was determined in the media: Phytamax and (Murashige and Skoog more bananas) were the fittest in *Epidendrum*, which in turn the media: Knudson and (Knudson supplemented with banana) from green capsules were the most efficient for *Oncidium*. During the acclimation period the seedlings adapted positively to the proposed substrates, it was determined that *Epidendrum* required 45 days in the propagator and *Oncidium* needed 30 days in the propagator; after which the seedlings were moved to in external environment.

Keywords: *Epidendrum*, *Oncidium*, *in-vitro* Culture, Culture media, Orchid, Germination, Acclimation.

## 1 INTRODUCCIÓN

Las orquídeas se consideran plantas de una belleza enigmática y exótica que ha cautivado al ser humano desde la antigüedad, principalmente por el exuberante colorido de las flores y fragancias de las especies de climas tropicales, que han sido cultivadas y mejoradas para fines de ornamentación y que hoy en día constituyen una de las principales flores en el mercado florícola a nivel mundial (Novoa y otros, 2006).

Ecuador, es el país con la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, debido principalmente a que cuenta con una extensa variedad de microclimas que circunscriben especies en áreas muy restringidas, con características peculiares y muy específicas; identificándose en los bosques primarios del país cerca de 4187 especies y se estima que sobrepasarán las 5000, lo que representa cerca del 60% de las especies reconocidas en América del Sur y 40% de las especies del Continente Americano (Carrión, 2009).

Según la empresa Ecuagenera, pionera en la producción a gran escala y en la exportación de estas flores en el país, el promedio de ventas externas es de 40 mil plantas por año destinadas a un mercado de 60 países, entre los cuales los principales compradores son: Francia, Estados Unidos, Alemania, Japón y Sudáfrica (Andrade, 2008).

Endara (2007) por otro lado menciona que el proceso de extinción de las orquídeas del Ecuador, está siendo marcado por la destrucción de su hábitat, sumado al problema del tráfico de especies, por su alto valor comercial

Como dato se tiene que el 82,5% de las especies de la familia *Orchidaceae* se encuentran amenazadas, 35 se encuentran en peligro crítico, 132 en peligro, 920 son vulnerables, 123 están casi amenazadas, 33 tienen preocupación menor y de 62 no se tienen datos suficientes. Lamentablemente el 86,9% de las especies están fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) debido a la falta de exploración por el difícil acceso o a la falta de condiciones apropiadas para la investigación. Lo que

contrasta con las reservas y bosques privados que tienen una mayor investigación y registro de las orquídeas del país (Valencia, 2000).

Los métodos aplicados de cultivo *in-vitro*, han tenido un considerable efecto en la conservación de las orquídeas, debido a que, las orquídeas pueden multiplicarse en grandes cantidades, con el propósito de cultivarlas, reintroducirlas o comercializarlas. Las plántulas cultivadas en el laboratorio llegan a ser más sanas y más vigorosas que aquellas recolectadas en la naturaleza (Seaton y Ramsay, 2009).

Este trabajo de investigación, ha desarrollado un protocolo propio, donde las semillas de *Epidendrum schistochilum* Schltr y *Oncidium cultratum* Lindl fueron almacenadas y reproducidas *in-vitro*, con el fin de permitir estandarizar los procedimientos y medios utilizados, conservar el material genético y obtener plántulas sanas adaptadas al medio externo, para contribuir a la conservación y comercialización de las mismas.

## **2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **2.1 Tema**

Determinación de los protocolos para cultivo *in-vitro* de las especies *Epidendrum schistochilum* Schltr y *Oncidium cultratum* Lindl.

### **2.2 Hipótesis**

#### 2.2.1 Hipótesis alterna

Se pueden desarrollar protocolos para el cultivo *in-vitro* de las especies *Epidendrum schistochilum* Schltr y *Oncidium cultratum* Lindl.

#### 2.2.2 Hipótesis Nula

No se pueden desarrollar protocolos para el cultivo *in-vitro* de las especies *Epidendrum schistochilum* Schltr y *Oncidium cultratum* Lindl.

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 General

- Establecer protocolos para el manejo en el cultivo *in-vitro* de las especies *Epidendrum schistochilum* Schltr y *Oncidium cultratum* Lindl, mediante el ensayo de las técnicas de manejo de semillas, medios de cultivo y trasplante; con el propósito de disponer de material genético para su conservación y comercialización.

### 2.3.2 Específicos

- Colectar, identificar y almacenar el material genético, mediante el tratamiento de muestras vivas, para su conservación y posterior trabajo en el laboratorio.
- Definir los medios de cultivo específicos para cada especie estudiada, mediante el ensayo de las semillas sobre los medios en el laboratorio, para determinar el medio más apto en el crecimiento *in-vitro* de las semillas.
- Determinar los métodos de aclimatación de orquídeas de *Epidendrum* y *Oncidium*, mediante el trasplante de plantas *in-vitro* al medio externo en un sustrato adecuado para complementar el procedimiento del manejo de plantas *in-vitro*.

## 2.4 Justificación

Las orquídeas constituyen una de las familias de plantas de mayor demanda entre las ornamentales. La explotación irracional a la que han sido sometidas unida a las exigencias medio ambientales para su reproducción y desarrollo natural, han contribuido a que muchas especies se encuentren amenazadas (Rodríguez y otros, 2005).

Jørgensen y León-Yáñez (1999) mencionan que tanto *Epidendrum schistochilum* Schltr. y *Oncidium cultratum* Lindl, representan especies de orquídeas nativas, andinas y silvestres del Ecuador. Las orquídeas silvestres tienen muchos beneficios conservacionistas, científicos y recreacionales; se ha comprobado, que ciertas familias de orquídeas en los bosques, actúan como indicadoras de referencia de la salud de los ecosistemas (Moreno, 2000).

Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in-vitro*. Sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar, por lo que es indispensable investigar cuál es el medio de germinación idóneo para cada una de ellas (Ruiz y otros 2008).

Bajo estas perspectivas, el diseño de este protocolo es una alternativa para solucionar la creciente pérdida de especies de orquídeas nativas y andinas, debido a la alteración del medio ocasionada por la industria maderera, la extensión de actividades agrícolas, los incendios forestales, así como el impacto que genera la apertura de nuevas carreteras. De esta manera, se puede rescatar el material genético, que constituye una respuesta rápida a las necesidades de conservación. Por otro lado, representa una herramienta valiosa al conocimiento científico y tecnológico, puesto que, define las técnicas de manejo *in-vitro* y de aclimatación de estas especies en particular; además ayuda a la reproducción de orquídeas a gran escala y en corto tiempo, siendo una forma de propagación sostenible, pudiendo satisfacer la gran demanda comercial.

### 3 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Descripción Botánica/Ecológica de la Familia *Orchidaceae*

##### 3.1.1 Historia

La palabra “orquídea” proviene del término griego *orchis* que apareció mencionada por vez primera en un manuscrito del filósofo griego Theophrastus (371-285 a.C.); el nombre significa testículo y hace alusión a los pseudobulbos de algunas especies y al uso medicinal que se le asignaba a esta flor como afrodisíaca y potenciadora de la fertilidad. Con el tiempo, la palabra *orchis* pasó a ser *Orchidaceae*; término con el que se designó a la familia más numerosa del reino vegetal con más de 20000 especies alrededor de los países cálidos y templados de todo el mundo (Munguía y Ripa, 2009).

En 1840 el profesor de origen inglés John Lindley, considerado padre fundador del estudio taxonómico de orquídeas y figura relevante en el tema por más de cuarenta años, escribió “ los géneros y especies de las plantas orquidáceas”; años más tarde en 1922 Lewis Knudson realizó estudios sobre germinación simbiótica *in-vitro* sustituyendo las hifas del hongo simbiote por los elementos nutritivos en un sustrato de cultivo químico artificial, al cual se le agregaba glucosa, agar-agar, agua y sales minerales. A principios de 1960, George Morel aplicó los principios de la multiplicación meristemática en las orquídeas de los géneros *Cymbidium*. Esta técnica de clonación de orquídeas fue revolucionaria, y como consecuencia llevó al mercado infinidad de especies e híbridos (Freuler, 2008).

##### 3.1.2 Taxonomía

Su clasificación menciona:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Monocotyledoneae

Orden: *Asparagales*

Familia: *Orchidaceae*

Subfamilias: *Spiranthoideae*, *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae*. A nivel mundial la familia *Orchidaceae* consta de un total de 788 géneros con 19.500 especies, según la Angiosperm Phylogenic Group (2010).

#### 3.1.2.1 Distribución en Ecuador

Jørgensen y León-Yáñez (1999) señalan que Ecuador posee 219 géneros de orquídeas distribuidos en la sierra con 2 322 especies, la costa con 563 especies y el oriente con 579, dando un total de 3 464 especies en todo el país.

Hasta el año 2008, se han descrito 4 200 especies de orquídeas, total que representa el 14% de las especies del planeta Tierra. Constituyen un trofeo para muchos cazadores por su belleza seductora, lamentablemente, sus hábitats son agredidos de manera tan frecuente como la salida del astro rey, generando disminución poblacional y/o extinción de ciertas especies, generando desajustes en el balance impuesto de manera sabia por la naturaleza (Sánchez, 2009).

La gran variedad de especies de orquídeas que presenta Ecuador, se debe a la gran variedad de microclimas y cambios considerables a cortas distancias, puesto que, Ecuador, se sitúa en la línea ecuatorial, presenta la Cordillera de los Andes, que impone diversidad, alturas y por lo tanto condiciones climáticas. La flora orquideológica ecuatoriana ha sido recolectada y estudiada desde principios del siglo XVIII, sin embargo, ha sido durante los últimos 50 años que Calaway Dodson y Carlyle Luer han realizado una labor de clasificación extensa, gracias a la cual, la flora orquidácea del Ecuador está considerablemente bien descrita (Portilla, 2007).

#### 3.1.2.2 Endemismo

La familia *Orchidaceae*, junto a otras 8 familias, posee el más alto endemismo en el país, con 1 710 especies endémicas, que representan casi el 70% de todas las especies endémicas del país. El 82,5% de las especies de la familia *Orchidaceae* en el Ecuador se encuentra amenazada, 35 se encuentran en peligro crítico, 132 en peligro, 920 son vulnerables, 123 están casi amenazadas, 33 tienen preocupación menor y de 62 no se tienen datos suficientes. Lamentablemente el 86,9% de las

especies están fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), debido a la falta de exploración por el difícil acceso o a la falta de condiciones apropiadas para la investigación. Lo que contrasta con las reservas y bosques privados que tienen una mayor investigación y registro de las orquídeas del país (Valencia, 2000).

### 3.1.3 Morfología y descripción

Existen dos formas básicas de acuerdo a su eje de crecimiento. Las orquídeas monopodiales, que poseen un único y esbelto tallo de crecimiento vertical; en su centro van generando constantemente nuevas hojas; las hojas viejas se van haciendo amarillentas y se marchitan. Las orquídeas simpodiales generan de uno a varios tallos anualmente a partir de su rizoma; su crecimiento es aparentemente horizontal, poseen unos órganos abultados denominados bulbos o pseudobulbos, los mismos que la planta emplea como órganos de reserva de agua y nutrientes (Rollke, 2006).

La orquídea siendo una monocotiledónea, presenta dos ciclos florales de tres piezas cada uno: el cáliz, formado por sépalos y la corola formada por pétalos, uno de ellos distinto denominado labelo. La flor posee una simetría bilateral y considerando los dos ciclos reproductivos, tanto el gineceo como el androceo están soldados, formando una sola estructura denominada columna, la cual, en su interior mantiene al ovario, que fecundado y maduro dará origen al fruto (Freuler, 2008).

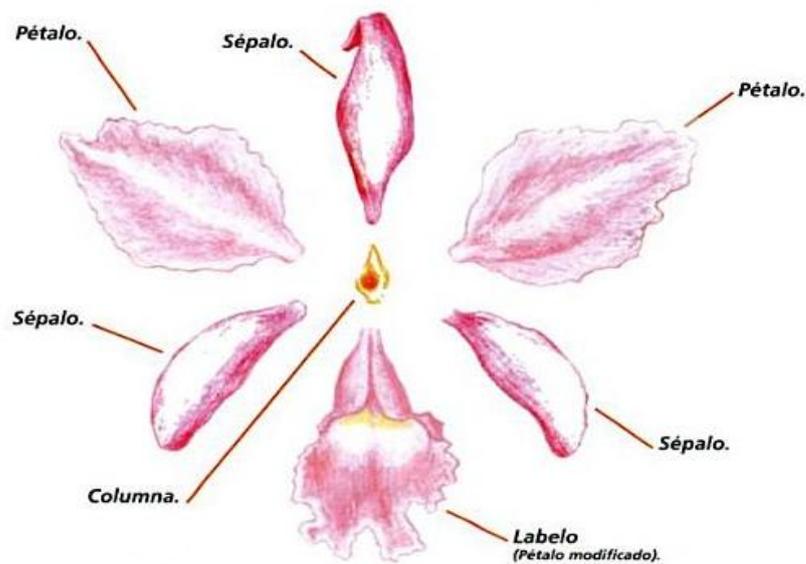


Gráfico N° 1. Partes de una flor de Orquídea. Fuente: (Freuler, 2008).

La columna es un órgano central en el cual se encuentran los elementos para la reproducción. En el extremo inferior de éstos, se localiza la parte receptiva del polen o superficie estigmática; la antera con el polen está cerca del extremo superior, protegido por una capa o cubierta de la antera llamada capucha. El polen de las orquídeas puede aparecer en polvo o granular, pero la mayoría de las veces se presenta de forma compactada en cuerpos redondos o aplastados llamados polínios. En algunos géneros, los polínios están pegados a una estructura llamada estípite, en la base de la cual está el viscidio, que tiene viscina (sustancia pegajosa), la cual favorece que el polen quede adherido al insecto polinizador y lo pueda llevar a otra flor (Murguía, 2007).

El fruto o también llamada cápsula contiene las semillas, las cuales poseen dos partes: el embrión y la testa que lo recubre. Un detalle interesante que hace que estas semillas sean diferentes de las semillas de otras plantas, es que no tienen una parte llamada endosperma, que se encarga normalmente de suplir de alimento al embrión. Este es uno de los motivos por los que no se puede simplemente tirarlas en cualquier maceta y esperar que crezcan, debido a que, el embrión necesita de una fuente de nutrición que la proporciona una micorriza, para que pueda germinar y que, luego aporta también con nutrientes a las jóvenes plántulas (Ackerman y Castillo 1992).

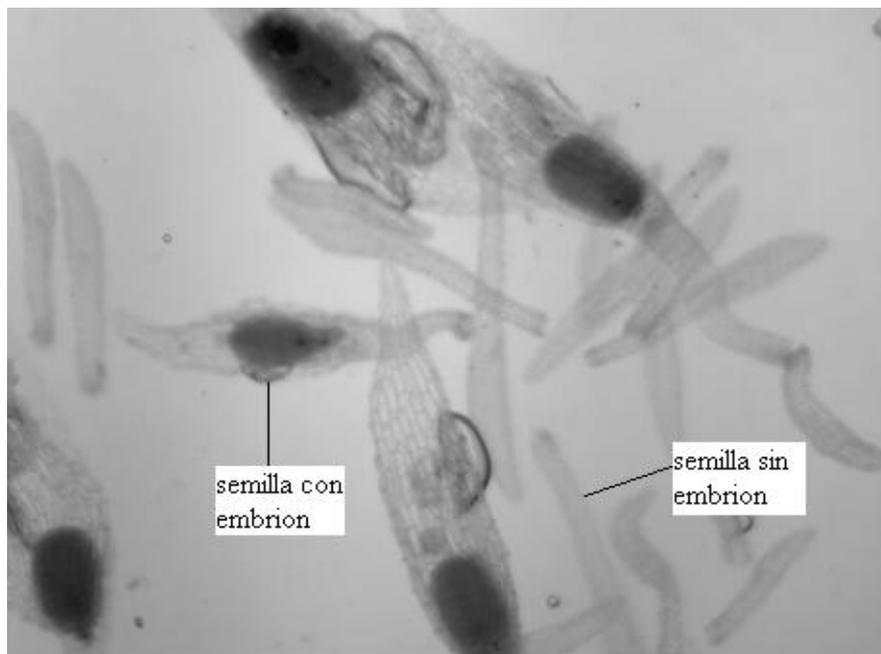


Gráfico N° 2. Semillas de *O. cultratum* Lindl., con embrión y sin embrión.

El sistema radical de las orquídeas, tiene notables modificaciones del tipo normal de raíz. Sin embargo, al igual que en el resto de las plantas es un órgano vital para el anclaje de la planta y la absorción de nutrientes. En las orquídeas terrestres, las raíces son estructuras alargadas y ramificantes, cubiertas de pelillos absorbentes. Las raíces de las epífitas son aún más especializadas que las de las orquídeas terrestres. En ellas, muchos pelillos radicales se han sustituido por una funda de células muertas, esponjosas, que se llama le “velamen”, el cual facilita la absorción de agua y minerales del aire, agua de lluvia o de la superficie de los troncos en que crece. En las epífitas, las raíces pueden originarse en cualquier punto del tallo, en todas direcciones y no sólo hacia abajo. Su tendencia positiva a hacer contacto, les permite servir de soporte, además, éstas raíces pueden fotosintetizar, la cual explica la coloración verdosa de sus puntas (Murguía, 2007).

#### 3.1.4 Hábitat

Se puede considerar a las orquídeas como plantas “todo terreno”. Existen unas pocas especies de orquídeas que logran sobrevivir en pantanos, charcos o en condiciones similares húmedas. Las orquídeas según su hábitat de crecimiento son clasificadas de acuerdo a sus preferencias afines ya sea en arboles denominándose epífitas, en el suelo definiéndose como terrestres, y en las rocas como litófitas. Es por esto, que se encuentran divididos en tres principales grupos: epífitas, terrestres y litófitas (Tibbs, 2008).

De acuerdo al lugar donde crecen, las orquídeas se clasifican de la siguiente manera:

- Terrestres.- Se desarrollan en el suelo.
- Epífitas (no parásita).- Utiliza al árbol como soporte para crecer, la mayoría de las orquídeas tropicales se sitúan en esta categoría.
- Litófitas.- Crecen sobre rocas (Villalobos y otros, 2005).

Se las encuentra desde los cálidos bosques tropicales hasta los helados páramos. Sólo están ausentes en el hielo de los glaciares y en las dunas de las arenas, es por ello, que se las encuentra prácticamente en todo el planeta, ya que son cosmopolitas. Su hábitat varía de acuerdo con su ubicación geográfica; las plantas de regiones frías son terrestres y vivaces; las de regiones cálidas son en su mayoría epífitas, aunque las hay también terrestres (Salazar, 2005).

### 3.1.5 Género *Epidendrum*

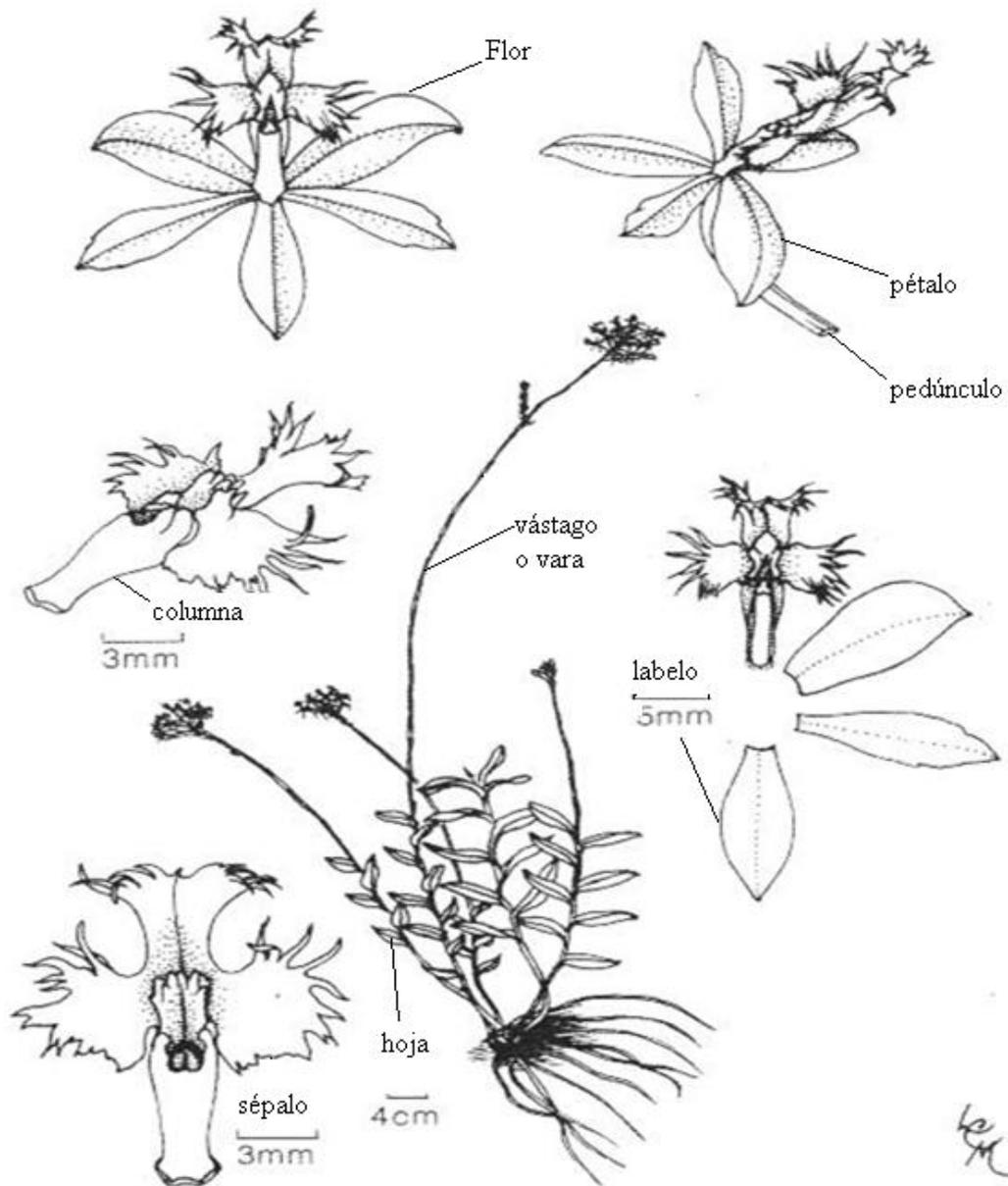


Gráfico N° 3. Especie representativa del género *Epidendrum*. Fuente: (Dodson, 2003)

#### 3.1.5.1 Generalidades

Según su etimología proveniente del griego *epi* “sobre” y *dendrom*, “árbol” en alusión al hábito de la mayoría de las especies de vivir sobre los árboles. Sin embargo, a pesar del significado, no todas las *Epidendrum* son de característica epífita, puesto que muchas de ellas son además litófitas y terrestres (Portilla, 2007).

Por ser un género amplio, los estudios de DNA han posibilitado que se separen cada vez más géneros nuevos. Por mencionar un ejemplo, la especie actual *Prostechea cochleata* fue en un principio del género *Epidendrum* y más tarde del género *Encyclia* (Fischer, 2007).

#### 3.1.5.2 Taxonomía

*Epidendrum* pertenece a la subfamilia: *Epidendroideae*, Tribu: *Epidendrae*, subtribu: *Laeliinae*; tiene más de 1 000 especies (AGC, 2010).

Las especies de este género son bastante conocidas en México y América Central, sin embargo el género no está bien conocido en Colombia, Ecuador y Bolivia (Dodson, 2003).

#### 3.1.5.3 Distribución en el Ecuador

En el Ecuador se han registrado 295 especies; de la cuales 100 especies son endémicas (Jørgensen y León-Yáñez 1999).

#### 3.1.5.4 Anatomía

Esta familia se caracteriza porque muchas de ellas poseen pseudobulbos en forma de caña, las cuales pueden alcanzar alturas de hasta 2 metros, no se superponen las hojas planas, la inflorescencia es terminal y rara vez lateral. Sus flores sin articulaciones entre el ovario; el pedicelo unido a los labios, a la columna y a su ápice; con callos; los polínios duran cuatro años, a excepción del grupo *Vincentenum* en el que duran dos años, retardadamente aplanado u ovoide con viscidios distintos (Dodson, 2003).

#### 3.1.5.5 Fisiología

La mayoría de especies de *Epidendrum* que se había informado de las observaciones de los polinizadores, ha demostrado ser polinizada por polillas, colibríes o mariposas. Las especies se encuentran en casi todos los hábitats, pero el mayor número se producen como epífitas en el bosque húmedo de niebla en las laderas de los Andes y su distribución es a lo largo de la América tropical desde el nivel del mar hasta los 3 700 metros de elevación (Dodson, 2003).

### 3.1.5.6 *Epidendrum schistochilum* Schltr

Se encuentra en Ecuador en elevaciones de 500 a 2 500 metros, en las provincias de Bolívar y Sucumbíos. Especie herbácea, epífita, nativa andina y amazónica del Ecuador; con tallos erectos, algo sencillo de ramificación, con hojas oblongas y obtusas. No presenta sinónimos; el tamaño de su flor es de aproximadamente 2,5 cm, las flores de *Epidendrum schistochilum* se producen en una terminal del tallo de la flor que se desarrolla en los tallos maduros; generalmente la floración se produce en la primavera; su crecimiento se mantiene a una temperatura de cálido a frío. *Epidendrum schistochilum* fue descrita por primera vez a la comunidad científica en 1924 (Jørgensen y León-Yáñez 1999).



Gráfico N° 4. *Epidendrum schistochilum* Schltr. Fuente: (Orchidspecies, 2011).

### 3.1.6 Género *Oncidium*

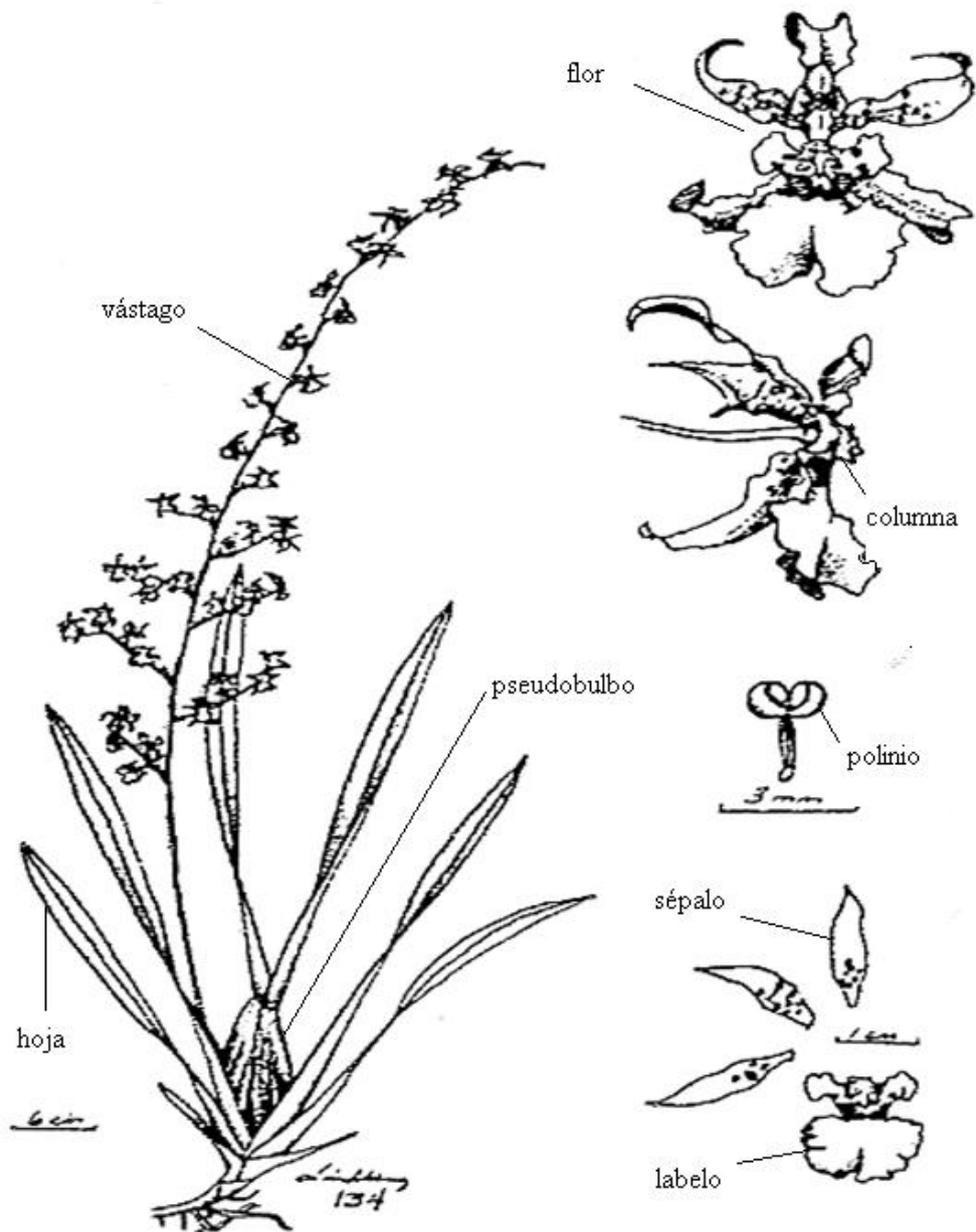


Gráfico N° 5. Especie representativa del género *Oncidium*. Fuente: (Dodson, 2003).

#### 3.1.6.1 Generalidades

El nombre *Oncidium* se debe a la pequeña callosidad que presenta en la base del labio que aparenta ser una hinchazón, que en griego significa “*Onkos*” (Atwood y Mora, 1999).

El género fue propuesto por Olaf Swartz en 1800. El género es muy grande y polimórfico. Muchas de las especies son denominadas “damas bailarinas”, debido a la dispersión floral que se asemeja a un conjunto de bailarinas de ballet (Cavero, 2008).

*Oncidium*, es un género que abarca las plantas con gran diversidad en sus hábitos de crecimiento, así como los tipos de flores, vienen en muchos tamaños, formas y colores característicos, tal como se encuentra en los robustos y brillantes de las *Oncidium* más grandes, las cuales son espectaculares y elegantes, mientras que los picos delicados de las especies más pequeñas son una delicia. Los colores amarillo y café son predominantes en las flores, aunque las hay también en tonos morado, rosa y verde (Mckinley, 2005).

#### 3.1.6.2 Taxonomía

*Oncidium*, perteneciente a la subfamilia: *Epidendroideae*, Tribu: *Maxillarieae* y subtribu: *Oncidiinae*, la cual consta con más de 600 especies (AGC, 2010).

#### 3.1.6.3 Distribución en el Ecuador

En el Ecuador se han registrado 131 especies; de las cuales 34 especies son endémicas (Jørgensen y León-Yáñez 1999).

#### 3.1.6.4 Anatomía

Se caracteriza por la presencia de pseudobulbos unifoliados o bifoliados de un solo entrenudo, generalmente sostenidas por dísticas vainas de las hojas; la inflorescencia es extremadamente variable, solitaria, a menudo paniculada, producida a partir de las axilas de las vainas. La parte basal del labio se extiende desde ó paralelamente a la columna, a veces unidos por una corta distancia en la base; el labio, por lo general, con un callo en el disco, la columna sin pie, por lo común con las alas con detalles sobre cada lado de la estigmatización, y los polínios son dos duros conectados a una banda relacionada con un viscidio (Dodson, 2003).

Debido a que este género presenta diferencias morfológicas entre sus especies, ha dado lugar a divisiones en secciones, incluso algunas de ellas han sido reconocidas

como géneros independientes, como es el caso de *Cyrtorchilum* y *Tolumnia* entre otros (Portilla, 2007).

#### 3.1.6.5 Fisiología

La mayoría de las especies parece ser polinizada por las abejas del género *Centris*. Las abejas hembras recogen el aceite en su tibia y son engañadas por la similitud de las flores *Oncidium* a los de la familia *Malpighiaceae* que las abejas visitan normalmente. Las abejas machos establecen territorios y la unidad de otros insectos de distancia. Algunas especies de *Oncidium* producen flores con imágenes ultravioleta de los insectos; el cultivo de la mayoría de las especies de *Oncidium* puede llevarse a cabo en la casa bajo luz intermedia en macetas con drenado y con abundante agua en el riego durante todo el año. Algunas especies provienen de las elevaciones más altas y requiere condiciones más frescas (Dodson, 2003).

Son principalmente epífitas, unas pocas son terrestres. La mayoría tiene pseudobulbos; las flores son comúnmente amarillas, además las hay marrones, blancas y rosadas. El tamaño de las flores varía desde 1 cm hasta 10 cm de longitud aproximadamente. (Cavero 2008).

#### 3.1.6.6 *Oncidium cultratum* Lindl

La especie fue descrita por primera vez por Lindley en 1838. Orquídea epífita, herbácea, nativa andina del Ecuador. Se encuentra en elevaciones de entre 1500-3500 m, en las provincias de Azuay, Cañar, Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Sucumbíos; su tamaño de flor es de 3 cm. Se presentan como pseudobulbos de epífitas, vainas imbricadas con la parte superior foliácea; las hojas son basales y florece en un pie, paniculada; inflorescencia de flores diversas que surgen en un pseudobulbo maduro, en la mayoría ocurre en cualquier época del año (Jørgensen y León-Yáñez 1999).



Gráfico N° 6. *Oncidium cultratum* Lindl. Fuente: (orchidspecies.2011).

### **3.2 Identificación, almacenamiento y conservación de semillas de orquídea**

#### 3.2.1 Generalidades

Las semillas son estructuras reproductoras que garantizan la supervivencia del embrión, desde que éste se separa de la planta progenitora hasta que se inicia el crecimiento de la nueva plántula (Martínez, 2006)

El tamaño de la semilla de orquídea es de 0,25 a 1,2 mm de longitud y desde 0,90 a 0,27 mm de diámetro; son muy ligeras y se producen desde mil trescientas hasta cuatro millones o más por cápsula (Pierk 1990).

Por lo general, para la obtención de semillas ocurre la polinización entre flores de distintas plantas, proceso llamado polinización cruzada o alogamia; de manera ocasional, pero no frecuente, la polinización ocurre entre flores de la misma planta, fenómeno denominado autopolinización o autogámia, ya que algunas flores son autocompatibles (Ackerman y otros., 1992).

Existen adaptaciones morfológicas especiales que minimizan la posibilidad de una autopolinización; una de ellas es que la planta es hermafrodita, es decir, que posee ambos sexos, y éstos no llegan a su madurez al mismo tiempo; por consiguiente, es necesario que existan medios diversos para que los órganos masculinos de una flor sean transportados hasta una flor cuyos órganos sexuales femeninos hayan alcanzado una completa madurez (Ottolenghi, 1945).

Por su variabilidad genética, las orquídeas tienen una gran importancia ecológica, tanto para la flora como para la fauna silvestre. El elevado peligro de extinción que presentan las orquídeas, se debe a la tala de bosques y su entorno se ve amenazado; por ello, es necesario la evaluación de métodos eficientes de preservación de su material genético (Ossenbach, Arce y Warne, 2007).

Según Arditti (1992), en la conservación *in situ* se corre un mayor riesgo de perder esta variabilidad, por lo que, la conservación *ex situ* adopta un papel predominante en estas situaciones; además, se tiene como antecedente, que la autopolinización conlleva a una reducción de la variabilidad genética, mientras que, como producto de la polinización cruzada se obtiene un aumento de la variabilidad genética.

### 3.2.2 Identificación del material vegetal colectado

Se entiende como identificación, al proceso de la confirmación de nombres científicos existentes para determinadas especies, que se asignan al material recolectado en campo. En general, se refiere a la asignación del nombre científico completo (género y especie); también, cuando se le asigna al material solamente el nombre de la familia o género. En ocasiones, se habla de tres niveles: familia, género y especie (conceptualmente éste último se interpreta como la unidad de género y especie). Además, la identificación es una fase que se debe hacer con un rigor científico, por lo que, se requiere recurrir con paciencia y dedicación a herramientas

de apoyo (la literatura apropiada, el estudio y la comparación cuidadosa del material de referencia (CECON y otros, 2008).

### 3.2.3 Evaluación de la calidad de las semillas

Para examinar semillas de orquídea se puede utilizar una lupa de 10 aumentos o con un microscopio de menor aumento, en los cuales, es posible observar semillas vacías y semillas con embriones esféricos. Las semillas con embriones esféricos y engrosados son las que tienen mayores posibilidades de germinar en condiciones apropiadas, así que, un grupo de semillas de buena calidad, es aquel que contiene un alto contenido de semillas con embriones (Seaton y Ramsay, 2009).

### 3.2.4 Distinción y secado de las semillas

Un método recomendable para el almacenamiento de semillas, es verificar primero si las cápsulas han madurado a través del cambio de color de verde a amarillo; luego las semillas pueden transferirse a un tubo u otro recipiente para su secado. El secado es importante para incrementar considerablemente la longevidad de las semillas y su almacenamiento a largo plazo. Existen soluciones como el cloruro de calcio que a temperatura ambiente produce una humedad relativa de 30%; el cloruro de litio a la misma temperatura produce una humedad relativa de 12%. Estos datos son importantes, debido a que, las semillas tienden a equilibrar su contenido de humedad con el del ambiente que las rodea; estas soluciones pueden utilizarse para secar las semillas a niveles de humedad conocidos. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda que las semillas tengan un contenido de humedad de 5- 6 %. Existen otros sustitutos como los granos de arroz secados o el uso de sílica gel; pero por tiempos no prolongados (preferentemente de 3 a 4 días) pueden conservarse a temperatura ambiente en un desecador de vidrio para que las semillas alcancen el contenido de humedad requerido, ya que, la sílica gel puede secar excesivamente las semillas y reducir su viabilidad (Seaton y Ramsay, 2009).

### 3.2.5 Método de almacenaje al vacío

Las semillas delicadas y de corta vida, pueden conservarse durante varios meses en recipientes que cierren herméticamente, en los cuales, se ha producido un vacío

parcial (alrededor de 1 mm de presión) con una bomba de succión. Con este tipo de almacenaje se consigue que los procesos vitales de la semilla se mantengan constantes (Pérez, 2009).

En silvicultura, es más frecuente recurrir al secado previo de la semilla hasta obtener el contenido de humedad adecuado, y después, almacenarla en recipientes herméticos y llenos. Siempre que los recipientes no se abran con demasiada frecuencia y que el cierre hermético sea eficaz; mediante este método se puede mantener bajo el contenido de humedad durante muchos años (FAO, 2006).

El almacenaje sellado herméticamente en las semillas, forja que la humedad no pueda entrar ni escapar de un frasco. Lo ideal, es almacenar las semillas en un recipiente sellado herméticamente para mantener un contenido de humedad constante (Seaton y Ramsay, 2009).

### **3.3 Cultivo *in-vitro***

La expresión cultivo *in-vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento; en la que, a partir de un pequeño segmento inicial de tejido, es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre; esto se puede lograr, mediante la aplicación de estímulos físicos y químicos controlados en un medio de cultivo a un tejido vegetal (Roca y Mroginski 1991).

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

Así pues, se cultiva una determinada parte de la planta original, se induce la formación de brotes, se multiplican y las plantas o brotes obtenidos deben someterse a un proceso de aclimatación para adaptarlas de nuevo a las condiciones *in vivo*, donde se cultivan hasta diferentes estadios según la finalidad (Estopa, 2005).

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta técnica biológica permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. El enorme potencial de la técnica, ha favorecido en los últimos años el incremento del número de laboratorios de cultivo de tejidos para la producción comercial de plantas ornamentales, medicinales y frutales, lo que ha motivado que, algunos floricultores la estén utilizando como una alternativa viable en sus programas de producción (Arena y Martínez 1997).

### 3.3.1 Protocolo para cultivo *in-vitro*

El término protocolo, procede del latín "protocollum", y del griego "protos", primero y "kollom", pegar; se refiere a la "primera hoja pegada con engrudo". En su significado original, venía a decir que "protocollum" era la primera hoja de un escrito (la primera hoja en la que se marcan unas determinadas instrucciones). Esta definición marca el inicio de lo que más tarde será el verdadero significado del término protocolo. En consecuencia, un protocolo, es un documento de tipo científico, administrativo o legal que acoge puntualidades detalladas, el cual brinda información precisa y pertinente (Barrio, 2005).

Con el desarrollo de protocolos de cultivo, es posible aumentar la proliferación y disminuir los tiempos de propagación de plantas que se da en forma natural, partiendo de explantes como semillas, yemas, fragmentos de hoja o tallo para contribuir a la conservación de la biodiversidad, preservación de hábitats naturales, de la ecología de la zona y salvaguardar bancos de germoplasma valiosos (Gómez, Cristiani y Villegas, 2010).

La creación de un protocolo para la reproducción *in-vitro* de orquídeas, ha permitido estandarizar los procedimientos y medios utilizados; gracias a esto se conservan *in-vitro* especies como: *Cattleya maxima*, *Miltonia vexl*, *Stanhopea tigrina* y *Scamburtia splendida*, entre otras (López, 2008).

### 3.3.2 Proceso de desinfección y siembra *in-vitro* del explante

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en las que, normalmente se incuban los cultivos, conforman un ambiente propicio para la proliferación de

microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito. Para establecer cultivos asépticos es necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes para liberarlos de microorganismos exógenos y d) manejar adecuadamente las normas de asepsia (Perla, 2007).

Las semillas adquieren la habilidad para germinar gradualmente a medida que crecen y maduran dentro de la cápsula; esto puede ser diferente para cada especie, y depende en alguna medida de las condiciones ambientales bajo las cuales la cápsula madura (Seaton y Ramsay, 2009).

Se puede sembrar semillas a partir de cápsulas verdes y su desinfección consiste en utilizar un cepillo de dientes suave para fregar suavemente la cápsula con una solución jabonosa, se enjuaga la cápsula en agua; se introduce la cápsula por 10 minutos aproximadamente en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y se transfiere la cápsula sumergida en la solución de cloro a la cámara de flujo laminar. Luego se sumerge en alcohol al 90% y se pasa rápidamente por el fuego (flameado) y se transfiere la cápsula a una superficie desinfectada (como una caja Petri esterilizada). Para su siembra, se corta longitudinalmente la cápsula en la mitad con la ayuda de un bisturí desinfectado y se levanta la una mitad de la cápsula con las pinzas y se golpea ligeramente sobre el medio para discernir las semillas (Mckendrick, 2000).

En el caso de las orquídeas, las semillas expuestas deben ser tratadas con un desinfectante. Las semillas son colocadas en un sobre de papel filtro, tubo o frasco pequeño y se cubren con cinco a diez veces su volumen con una solución de hipoclorito de calcio o de sodio más una o dos gotas de un agente humectante. Las semillas se dejan en remojo durante cinco minutos (a veces más) agitándolas periódicamente. Al final de ese tiempo, éstas se habrán ido al fondo del recipiente. Se vacía con cuidado el desinfectante y se agrega agua estéril hasta la mitad del frasco. Luego de agitar varias veces, se vacía el agua que contiene las semillas con un haza de alambre, o con una espátula y se procede a la siembra (Murguía, 2007).

### 3.3.3 Germinación *in-vitro* de semillas de orquídeas

La multiplicación de orquídeas se ha visto limitada por la germinación de la semilla en forma natural, considerándolas como estériles o no viables; además, el embrión no está diferenciado dentro de los distintos órganos como en la mayoría de los embriones vegetales, y por lo tanto, la germinación sólo ocurre cuando éste se desarrolla bajo condiciones favorables (Potisek, Puk y Sarmiento, 1994).

La obtención de orquídeas a partir de semillas germinadas *in-vitro*, fue introducida por Lewis Knudson en 1925, y se usa en la actualidad de forma ocasional en muchas orquídeas tropicales y subtropicales, debido a que se tiene presente también que, la propagación convencional vegetativa es extremadamente lenta (Martínez, 2006).

La germinación *in-vitro* de semillas, es muy importante para la producción comercial de muchas especies e híbridos de orquídeas, siendo la única manera de aprovechar las semillas fuera de su entorno natural (Arditti y Ernst, 1993).

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

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

#### 3.3.3.1 Crecimiento *in-vitro* de las semillas de orquídea

La germinación de las orquídeas epífitas, puede darse en poco tiempo (dos semanas) o puede tomar varios meses. El tiempo promedio es cuatro semanas. Los primeros signos de germinación se observan cuando las semillas embeben agua y se engruesan; esto seguido por un cambio de color en las semillas (amarillo paja), que luego cambia a verde cuando comienzan a producir clorofila. Cuando la semilla de una orquídea germina en la luz, en lugar de formarse una hoja y una raíz inicial, se forma una pequeña esfera compuesta por células verdes que recibe el nombre de

protocormo; conforme éste crece, en su parte inferior aparecen pequeños pelos radicales, una vez que se acumula suficiente materia orgánica en la parte superior, aparece el primer brote; partir de esta estructura se formarán las primeras hojas y raíces, como se observan en el Gráfico N° 7, (Seaton y Ramsay, 2009).

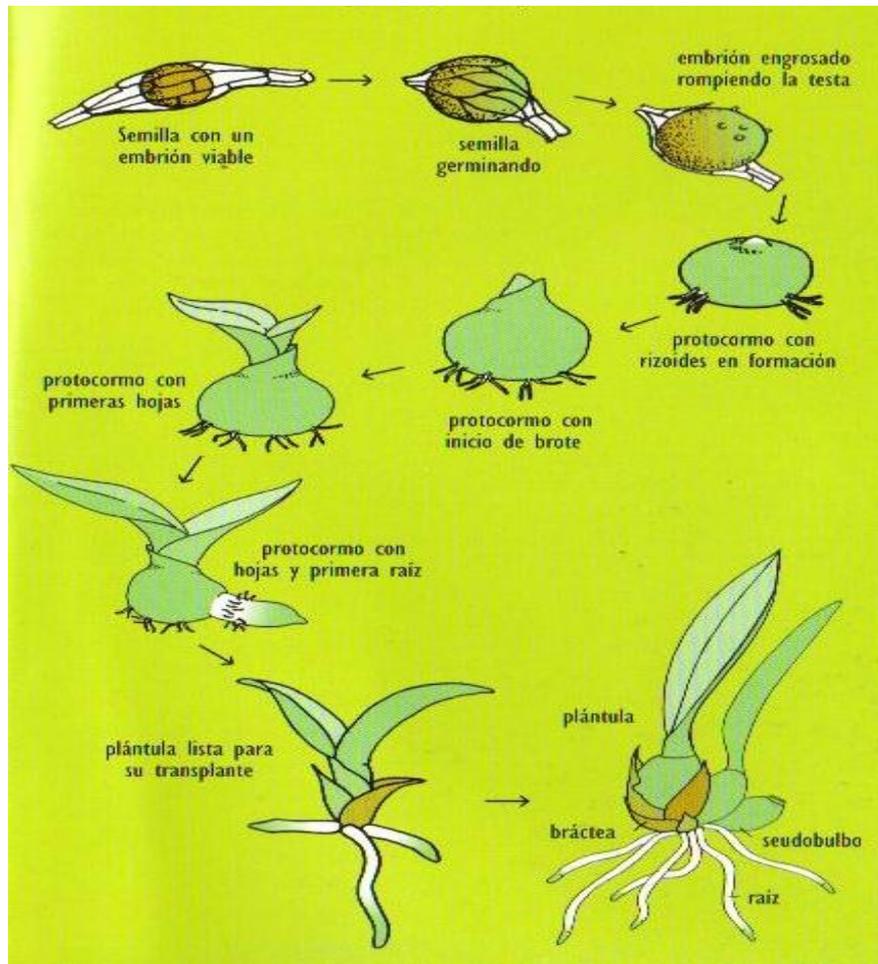


Gráfico N° 7. Desarrollo de una orquídea epífita. Fuente: (Seaton y Ramsay 2009).

### 3.3.4 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo vegetal puede ser definido, como una formulación de sustancias nutritivas, líquido o semisólido, en donde se desarrollan células vegetales, tejidos y órganos. En otras palabras, es un sustrato que sirve para el crecimiento vegetal (Chávez y Rincón 2006).

Los ingredientes de un medio de cultivo pueden clasificarse en los siguientes elementos básicos: a) Sales inorgánicas, b) Compuestos orgánicos, c) Preparaciones naturales complejas y e) Materiales inertes (Esquievel y Escalant, 1994).

#### 3.3.4.1 Las sales inorgánicas

Las sales inorgánicas contienen a los elementos mayores que son: N, P, K, S, Ca, Mg y Fe; y los elementos menores que son también necesarios pero se los agrega en pequeñas cantidades son: B, Zn, Mn, Cu, Mo, Co, Cl y I (Mroginski y Roca, 1991) y (Pierik, 1987).

#### 3.3.4.2 Los compuestos orgánicos

Los carbohidratos que proveen de elementos como el hidrógeno, carbono y oxígeno, los cuales suplen como fuente de azúcar a la planta, ya que, debido a la baja intensidad lumínica no pueden fabricar todo el azúcar que requieren; los más utilizados son: la sucrosa, D- amitol y D-sorbitol, éstos dos últimos como azúcares traslocables. Las hormonas actúan como reguladores de crecimiento, entre las más utilizadas están: las auxinas (ácido indolacético, ácido naftalénico; 2,4-D y picloram), las citoquininas (benzilaminopurina, kinetina y zeatina), giberelinas y el ácido abscísico. La vitamina que ha demostrado mucha utilidad es la tiamina; sin embargo, otras han sido utilizadas con frecuencia para estimular procesos específicos como el ácido nicotínico, piridoxina y riboflavina (Esquievel y Escalant, 1994).

#### 3.3.4.3 Las preparaciones naturales complejas

Para enriquecer los medios de cultivo, se utiliza una gran variedad de sustancias de composición indefinida, entre las cuales destacan: extracto de malta, agua de coco, harina o pulpa de banano, caseína hidrolizada y pulpas de tomate, piña y naranja (Lydiane, 1996).

#### 3.3.4.4 Los Materiales inertes

Los materiales inertes ó geles húmedos actúan como agentes de soporte, entre ellos están: el agar-agar, gelrite, phytagel, etc; y el carbón activado que en bajas

concentraciones actúa contrarrestando efectos negativos que producen algunas sustancias liberadas en el medio como los fenoles (Esquievel y Escalant, 1994).

### 3.3.5 Medios de cultivo para orquídeas

Hoy en día existen algunas fórmulas para la elaboración del medio de cultivo *in-vitro* de semillas de orquídea. Algunas se pueden preparar con ingredientes que se encuentran fácilmente o que se tiene en la cocina, otras requieren de compuestos químicos en toda su formulación, por lo que resulta más complicado su uso en cultivos caseros, y otras que se pueden obtener como fórmulas comerciales, listas, que sólo necesitan ser mezcladas con agua (Orquideoteca, 2010).

Los medios de cultivo para orquídeas, elaborados a base de nutrientes naturales provenientes de frutas o verduras, tienen como fin, remplazar a los reactivos químicos, debido a su alto costo y dificultad de conseguirlos. Por otro lado, es una forma factible para la reproducción de orquídeas en medios de cultivo menos complejos y elaborados con nutrientes naturales, siendo otra opción de medio de cultivo que puede reemplazar a los medios químicos ya existentes (Pardo, 2008).

En términos generales, un medio relativamente sencillo (como el Knudson C o Murashige y Skoog) será apropiado para la germinación. De acuerdo a la especie, una vez que las semillas han germinado, es aconsejable transferir los protocormos a un medio modificado o más concentrado, con aditivos como el homogenizado de banano que promueven un crecimiento más vigoroso (Seaton y Ramsay, 2009).

Las formulaciones de medios de cultivo que se mencionan a continuación, son las más utilizadas para la propagación de orquídeas (Sigma-Aldrich, 2009).

### 3.3.5.1 Medio Murashige y Skoog (mg/l)

Cantidad (mg)	Componente
1650	Nitrato de amonio
6.2	Ácido Bórico
332.2	Cloruro de Calcio
0.025	Cloruro de cobalto 6 H <sub>2</sub> O
0.025	Sulfato Cúprico 5 H <sub>2</sub> O
37.26	Na <sub>2</sub> EDTA
27.8	Sulfato Ferroso 7 H <sub>2</sub> O
180.7	Sulfato Magnesio
16.9	Sulfato Manganeso H <sub>2</sub> O
0.25	Ácido Molíbdico 2 H <sub>2</sub> O
0.83	Yoduro de Potasio
1900	Nitrato de Potasio
170	Fosfato de Potasio
8.6	Sulfato de Zinc 7 H <sub>2</sub> O
2000	Phytigel
pH: 3.9	

Cuadro N° 1. Formulación medio Murashige y Skoog. Fuente: (Sigma-Aldrich, 2009).

### 3.3.5.2 Medio Phytamax (mg/l)

Cantidad (mg)	Componente
825	Nitrato de amonio
3.1	Ácido Bórico
166	Cloruro de Calcio
0.0125	Cloruro de Cobalto 6 H <sub>2</sub> O
0.0125	Sulfato Cúprico 5 H <sub>2</sub> O
37.24	Na <sub>2</sub> EDTA
27.85	Sulfato Ferroso 7 H <sub>2</sub> O
90.35	Sulfato Magnesio
8.45	Sulfato Manganeso H <sub>2</sub> O

0.125	Ácido Molíbdico 2 H <sub>2</sub> O
0.415	Yoduro de Potasio
950	Nitrato de Potasio
85	Fosfato de Potasio
5.3	Sulfato de Zinc 7 H <sub>2</sub> O
1000	MES (ácido libre)
100	Mioinositol
1	Ácido Nicotínico
2000	Peptona
1	Piridoxina HCl
20000	Sacarosa
10.0	Tiamina
2000	Phytigel
pH: 5.4	

Cuadro N° 2. Formulación medio Phytamax Fuente: (Sigma-Aldrich, 2009).

### 3.3.5.3 Medio Knudson modificado (mg/l)

Cantidad (mg)	Componente
500	Nitrato de amonio
500	Sulfato de amonio
347.2	Nitrato de calcio
25.0	Sulfato ferroso 7 H <sub>2</sub> O
122.125	Sulfato de magnesio
5.682	Sulfato de manganeso H <sub>2</sub> O
250.0	Fosfato de potasio monobásico
20000	Sacarosa
2000	Phytigel
pH: 4.8	

Cuadro N° 3. Formulación medio Knudson modificado. Fuente: (Sigma-Aldrich, 2009).

### 3.3.5.4 Medio de coco (mg/l)

Cantidad (mg)	Componente
1000	Abono Mineral 20-20-20
2000	Phytigel
1000	Azúcar comercial
1000	Extracto de levadura
5 ml	Complejo B
20 ml	Agua de coco
c.s.p. 1000 ml	Agua destilada
pH: 5.2	

Cuadro N° 4. Formulación medio de Coco. Fuente: (Orquideoteca, 2010).

### 3.3.5.5 Medio de plátano (mg/l)

Cantidad (mg)	Componente
10000	Harina de plátano
2000	Phytigel
15000	Azúcar comercial
1200	Tiamina
c.s.p. 1000 ml	Agua destilada
pH: 5.2	

Cuadro N° 5. Formulación medio de plátano. Fuente: (Orquideoteca, 2010).

### 3.3.5.6 Medio de piña (mg/l)

Cantidad (mg)	pH: 5.4	Componente
200 ml		Pulpa de piña
2000		Phytigel
15000		Azúcar comercial
1200		Tiamina
c.s.p. 1000 ml		Agua destilada

Cuadro N° 6. Formulación medio de piña. Fuente: (Orquideoteca, 2010).

### 3.3.5.7 Medio Knudson (mg/l)

Cantidad (mg)	Componente
500	Sulfato de amonio
0.056	Ácido bórico
694.4	Nitrato de calcio
0.0624	Sulfato cúprico 5 H <sub>2</sub> O
25.0	Sulfato ferroso 7 H <sub>2</sub> O
122.125	Sulfato de magnesio
5.682	Sulfato de manganeso H <sub>2</sub> O
0.016	Trióxido molibdeno
250.0	Fosfato de potasio monobásico
0.031	Sulfato de zinc 7 H <sub>2</sub> O
20000	Sacarosa
2000	Phytigel
pH: 4.7	

Cuadro N° 7. Formulación medio Knudson. Fuente: (Sigma-Aldrich, 2009).

### 3.3.6 Cámara de flujo laminar

Es un habitáculo con un operario en un ambiente estéril donde se realizan todas las manipulaciones con el material vegetal (Santos, 2009).

En las cámaras de flujo laminar, un flujo continuo de aire pasa horizontalmente por la superficie de trabajo, usualmente de acero inoxidable, después de pasar previamente por un filtro. La cámara tiene los costados y la parte superior cubiertos. El aire en el interior se mantiene con una presión positiva con respecto al aire circundante, de forma tal que, la posibilidad de que un microorganismo ingrese es mínima (Seaton y Ramsay 2009).



Gráfico N° 8. Cabina de flujo laminar vertical. Fuente: Labculture, 2011.

### 3.3.7 Cámara de crecimiento

Es un receptáculo para permitir el control de algunas variables del ambiente físico. Habitualmente se pueden controlar la temperatura, iluminación y fotoperiodo (Santos, 2009).

En el cuarto de crecimiento, tanto la luz como la temperatura son constantes. En el laboratorio, normalmente se puede cultivar a  $25 \pm 2$  °C, bajo una intensidad luminosa de 2000 lux (lámparas fluorescentes) por 14 horas diarias (Mckendrich, 2000), (Martínez, 2006) y (Cerna, 2009).

Aproximadamente un año después de la siembra, las plantas jóvenes se trasladan a macetas o recipientes adecuados para su tamaño (Murguía, 2007).



Gráfico N° 9. Cámara de crecimiento. Fuente: Laboratorio CIVABI.

### 3.4 Aclimatación

#### 3.4.1 Generalidades

Una vez finalizado el proceso de multiplicación y obtenida la cantidad deseada de plántulas, se procede a la aclimatación, proceso que consiste en la adaptación de las plántulas a condiciones óptimas, es decir, similares a las del cultivo *in-vitro* y poco a poco a las condiciones naturales del medio ambiente (Curtis y otros, 2008).

En los frascos, las plántulas se han desarrollado en un ambiente cerrado y aséptico, por lo que, deben acostumbrarse de una manera gradual y progresiva al medio externo antes de ser trasplantadas a las macetas. La humedad en los frascos es alta y las plantas están protegidas de ataques de hongos y bacterias. En el medio natural, la temperatura y la luz varían constantemente. Las nuevas plantas deben estar protegidas de manera especial de la fuerte luz solar, ya que, una pequeña cantidad de ésta, podría quemar las hojas de las orquídeas que usualmente crecen en la sombra. Además, las plántulas que han crecido en condiciones de alta humedad, tendrán cutículas débiles, por esta razón, necesitan acostumbrarse gradualmente a medios

más secos antes de ser trasplantadas. Finalmente, tanto en la fase de aclimatación como en la de trasplante, las plántulas deben ser cuidadas diariamente para evitar inconvenientes (Mckendrich, 2000).

### 3.4.2 Invernadero

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

#### 3.4.2.1 Cámara de aclimatación

Llamadas también pequeños propagadores o mini-invernaderos, que ofrecen condiciones espléndidas para la protección de las plántulas. En ellas, se pueden cultivar plantas de interior exóticas o delicadas, ya que, el ambiente que ofrecen es una temperatura regular, corriente de aire y un ambiente húmedo; tienen la ventaja de ocupar poco espacio. El propagador consta fundamentalmente, de una bandeja para colocar las plántulas con una tapa alta y transparente. Lo ideal es que tenga una rendija ventiladora en la tapa; si no la tiene, se deberá abrir la tapa varias veces al día para que no se condense demasiada humedad; las bandejas interiores móviles o los recipientes individuales son muy útiles, porque permiten extraer las plántulas fácilmente cuando están listas para ser trasplantadas y reemplazarlas en su espacio por otras (Pereira, 2009).

Los cultivos de las plántulas de orquídeas se deben mantener dentro del invernadero a una temperatura mínima de 21 a 22° C con una intensidad lumínica máxima de 1600 lux (Murguía, 2007).

Las plántulas sacadas de los frascos son muy susceptibles a cambios bruscos de temperatura, humedad y luz, así como al ataque de hongos patógenos. Esto se debe a que, las plántulas tienen menor cantidad de cera epicuticular; para ello es necesario una ventilación en el propagador con el propósito de que las plántulas puedan

generar una mayor cantidad de cera epicuticular para promover su fortaleza o vigor a condiciones desfavorables (Seaton y Ramsay, 2009).



Gráfico N° 10. Cámara de aclimatación (propagador). Fuente: (Growzone, 2011).

### 3.4.3 Sustratos

Un sustrato adecuado para orquídeas debe ser muy poroso, accesible y barato. En Ecuador, son bastante utilizados: la corteza de pino, el musgo (*Sphagnum*) y el helecho arbóreo (*Cyatea* sp), mezclados con trozos de carbón, cerámica o grava; en Colombia, por ejemplo, se utiliza la cáscara de coco picada. En consecuencia, el material no es muy importante pero sí lo es el tamaño de los trozos del material (Portilla, 2007).

Se pueden mencionar dos tipos básicos de sustratos: los materiales orgánicos y los materiales inorgánicos. Los primeros, son aquellos que se han originado de alguna forma viva, por ejemplo, la corteza de árbol, la raíz de helecho, musgo, fibra de coco, corcho, caña de azúcar, coquito de palma aceitera, carbón, musgo blanco, cáscara de coco, granza de arroz, hueso seco picado, mantillo de hojas, espuma de poliestireno, etc. Entre los materiales inorgánicos se pueden citar: oasis, piedra volcánica, lana mineral, vermiculita, perlita, trozos de ladrillo o de barro cocido, piedra pómez, arena de río, tabique usado en construcción, etc (Murguía, 2007).

#### 3.4.4 Sustrato para *Epidendrum* sp y *Oncidium* sp

Para el género *Epidendrum*, por lo general, se recomienda cultivar en una mezcla de pino tipo 2 (tipo de grosor del pino) con musgo *Sphagnum* en partes iguales. A su vez, para el género *Oncidium*, la corteza de pino es un buen medio de cultivo, el grosor de la misma va a depender de la planta, pero por lo general, la mayoría de las especies utilizan un grosor intermedio de pino tipo 2; para plantas que provienen de alturas mayores y requieren humedad constante (aquellas de raíces finas) se recomienda utilizar una mezcla de pino y musgo *Sphagnum* en proporciones iguales (Portilla, 2007).

#### 3.4.5 Condiciones ambientales para *Epidendrum*

Al ser un género tan variado, no se pueden establecer reglas generales de cultivo, teniéndose en cuenta los matices existentes entre una especie y otra, aunque la mayoría se cultiva con temperaturas intermedias y con riego todo el año. Existe un dicho que dice: a las *Epidendrum* les gusta tener los pies (raíces) a la sombra y su cara (flores) al sol (Fischer, 2007).

En cuanto a la iluminación, para una buena floración necesitan luz solar indirecta. Crecen bien con temperaturas nocturnas de 13° a 15 °C y diurnas de 20° a 25 °C. Las plantas crecen correctamente con humedad relativa de 50 a 75%. Deben estar bien ventiladas sin que se expongan a fuertes vientos. Durante la etapa de activo crecimiento no hay que dejar que el medio se seque totalmente entre riego y riego. Después de la floración, el riego debe ser espaciado (Portilla, 2008).

#### 3.4.6 Condiciones ambientales para *Oncidium*

Todas las *Oncidium* con pseudobulbos grandes, necesitan mucha luz, hasta pueden tolerar el sol directo una vez que la planta ya ha sido enraizada en su maceta. Las *Oncidium* con pseudobulbos pequeños, normalmente crecen en lugares húmedos y sombríos. Su temperatura ideal oscila entre los 15 y 20 °C, ya que requieren de ambientes con circulación de aire constante y una humedad relativa del 70 %; esto facilita el crecimiento y elimina a su vez bacterias y hongos. Los requerimientos de agua varían según la especie; plantas con raíces gruesas y hojas duras requerirán

riegos menos frecuentes que aquellas especies de raíces finas y hojas delgadas. Los riegos deben ser abundantes pero sin que se anegue el medio y deben ser realizados durante la mañana para que se pueda evaporar durante todo el día (Portilla, 2008).

Género	Temperatura (°C)	Luz (Pies candelas)	Humedad (%)	Fertilización
Bletia	15	2400 - 3600	40 - 60	Mensual 1:1:1
Brassavola	15 - 18	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Brassia	15 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Cattleya	15 - 18	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Chysis	15 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Cycnoches	15	2400 - 3600	40 - 70	Mensual 1:1:1
Cyrtopodium	10 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Epidendrum	10 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Góngora	15 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Isochilus	13 - 15	2400 - 3600	40 - 60	Mensual
Hexisea	15 - 18	2400 - 3600	40 - 60	Mensual
Laelia	15 - 18	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Lycaste	15 - 18	2400 - 3600	40 - 60	Mensual
Maxillaria	15 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Mimercophyla	15 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Oncidium	15 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual
Stanhopea	15	2400 - 3600	40 - 60	Mensual 1:1:1
Zygopetalum	15 - 21	2400 - 3600	40 - 70	Mensual

Cuadro N° 8. Requerimientos de cultivo para algunos géneros de orquídeas. Fuente: (Villalobos y otros, 2005).

### 3.4.7 Abonos y fertilizantes

Un buen abono muy utilizado en las plantas de orquídeas es el Biol, el cual, es una fuente de fitoreguladores obtenido como producto del proceso de descomposición anaeróbica de los desechos orgánicos en biodigestores; actúa como bioestimulante orgánico en pequeñas cantidades, promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas. Es considerado útil y conveniente debido a su fácil preparación, ya que, se usan insumos de la zona y se obtiene en un tiempo corto (1 a 4 meses). De esta manera, el Biol es la mezcla líquida del estiércol y agua, adicionando insumos como alfalfa picada, roca fosfórica, leche, pescado entre otros, que se descarga en un digestor, donde se produce el abono foliar orgánico (Colque y otros, 2005).

Los fertilizantes necesarios para el crecimiento y floración de las orquídeas deben usarse disueltos en agua para no quemar las raíces. Generalmente vienen en formulaciones de tres números separados por una línea. El primer número se refiere a

la concentración de nitrógeno, el cual promueve el crecimiento vegetal; el segundo indica el porcentaje de fósforo, el cual promueve la floración; y el tercero indica el porcentaje de potasio, el cual fortalece las raíces. Se recomienda aplicar un fertilizante para orquídea de tipo 15-10-15 cuando la planta tenga brotes, y un 13-40-13 una vez que la planta haya crecido y esté robusta. Un fertilizante utilizado frecuentemente para orquídeas, es el extracto de algas a una concentración de 5 ppm, a una frecuencia de una vez por cada dos semanas sobre las hojas (Portilla, 2008).

## 4 MARCO METODOLÓGICO

### 4.1 Recolección, identificación y almacenamiento del material genético

#### 4.1.1 Materiales

Se emplearon bolsas de plástico para la recolección, cuaderno de campo, lápiz, maskin, tijeras de podar, cámara fotográfica, tubos de ensayo, sílica gel, bisturí estéril, papel aluminio, pinzas de laboratorio, papel filtro, embudos, mechero, etiquetas, paletas, jeringuilla y material bibliográfico.

#### 4.1.2 Equipos

Desecador de vidrio y estufa modelo memmert Schutzart DIN 40050-IP 20.

#### 4.1.3 Procedimiento

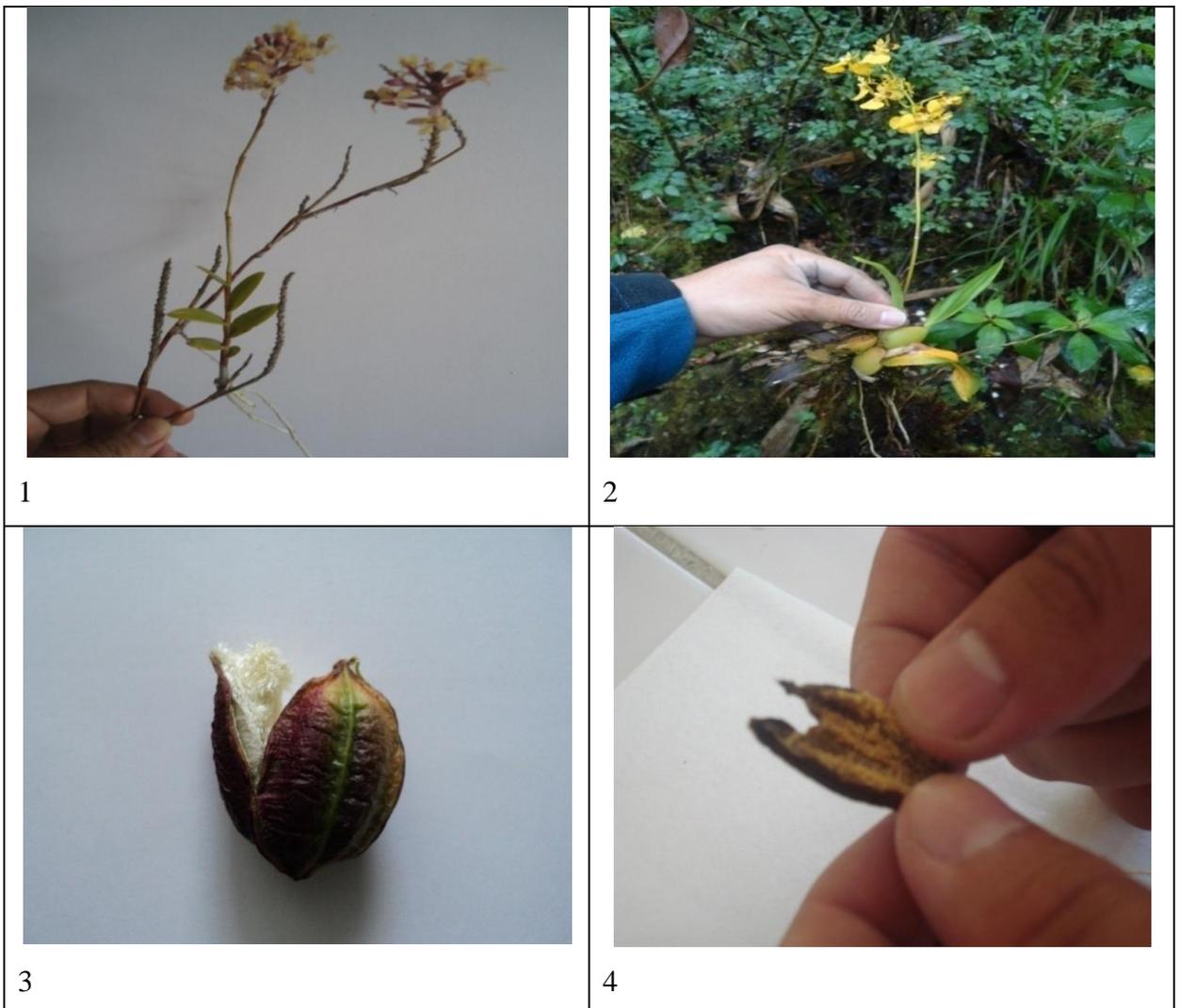
La recolección de plantas con cápsulas inmaduras de *O. cultratum* Lindl, se hizo en las cercanías de la Reserva Yanacocha, provincia de Pichincha, el 17 de julio del 2010; las plantas con cápsulas inmaduras de *E. schistochilum* Schltr, fueron recolectadas en los taludes de la carretera, vía al cantón Salcedo, provincia de Cotopaxi, el 5 de agosto del 2010. Posteriormente, las especies colectadas fueron cultivadas en macetas con sustrato *Sphagnum* más corteza de pino, con el propósito de su preservación y su posterior obtención de cápsulas maduras.

El material vegetal (plantas madre con cápsulas) fue llevado al laboratorio CIVABI, el 8 de octubre del 2010, donde se procedió a la identificación visual de las especies, a través del material bibliográfico “Native Ecuadorian Orchids” del autor (Dodson, 2003). Obteniendo un número de 8 individuos pertenecientes a la especie *E. schistochilum* Schltr, de 5 individuos, se obtuvo un número de 9 cápsulas maduras; y un número de 3 individuos pertenecientes a la especie *O. cultratum* Lindl, de los cuales, se obtuvieron 5 cápsulas maduras para sus posteriores almacenajes.

La distinción de las cápsulas maduras, se hizo a través de una identificación visual, en la cual, se observó el cambio de color de verde a una tonalidad amarilla o café; luego las cápsulas maduras fueron abiertas con la ayuda de un bisturí estéril para la

extracción de las semillas, las cuales fueron depositadas en papel aluminio, donde cualquier residuo, material extraño o fragmentos externos e internos de la cápsula, como pelos fueron removidos cuidadosamente con el uso de una pinza estéril.

Posteriormente, se procedió a examinar la calidad de las semillas de cada especie, utilizando el microscopio con el menor lente (4x) para visualizar la presencia o ausencia de embriones, con el fin de estimar si las semillas son aptas para la siembra, así como también, determinar la diferencia del tamaño en largo y ancho de las mismas, mediante el uso de papel milimetrado, (Gráfico N° 11).



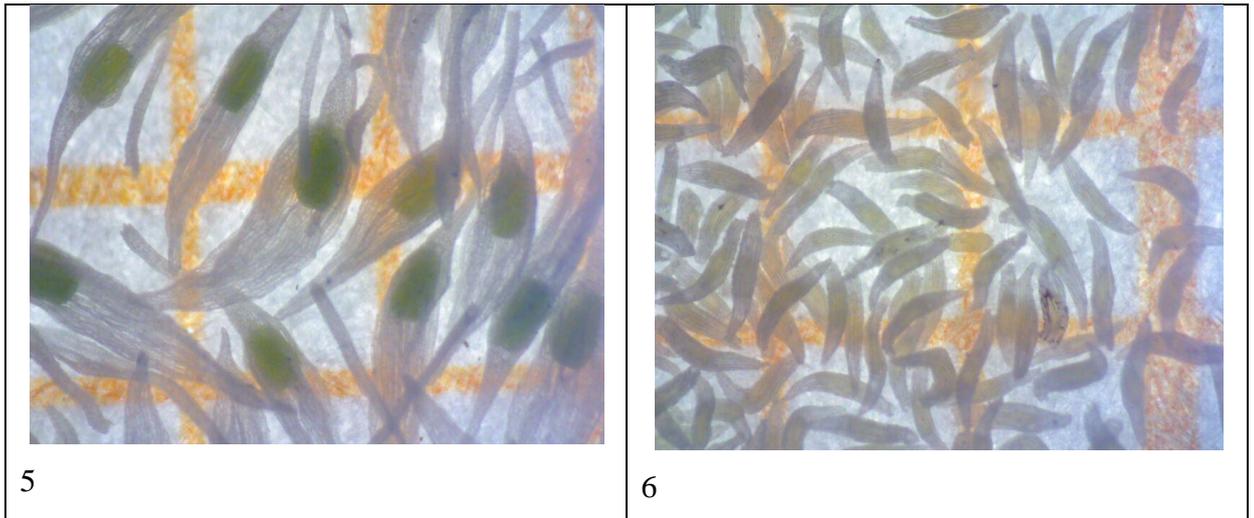


Gráfico N° 11. Procedimiento de la colección e identificación del material vegetal

Foto 1. Colección de *E. schistochilum* Schltr, Foto 2. Colección de *O. cultratum* Lindl, Foto 3. Cápsula de *E. schistochilum* Schltr, Foto 4. Cápsula de *O. cultratum* Lindl, Foto 5. Semillas de *E. schistochilum* Schltr vistas en el microscopio (lente 4x), Foto 6. Semillas de *O. cultratum* Lindl vista en el microscopio (lente 4x).

Enseguida las semillas fueron transferidas a tubos de ensayo (de 10 x 1,5 cm); considerando, que las semillas de cada cápsula madura se depositan en tubos individuales sin tapar y rotulados con el nombre de la especie, fecha de almacenamiento y los códigos de colección del libro de campo del Dr. Marco Cerna; correspondiendo el código: 1541 para las semillas de *E. schistochilum* Schltr y el código 1589 para las semillas de *O. cultratum* Lindl. La cantidad de semilla almacenada no sobrepasó el  $\frac{1}{4}$  del largo de cada tubo en ambas especies; de esta manera, se obtuvieron 9 tubos con semillas procedentes de 9 cápsulas maduras de *E. schistochilum* Schltr y 5 tubos con semillas procedentes de 5 cápsulas maduras de *O. cultratum* Lindl., para luego ser enviadas a un desecador de vidrio para su secado.

En el proceso de secado de las semillas, se utilizó sílica gel previamente calentada en la estufa a 70 °C por treinta minutos en desecadores de vidrio; luego, las semillas fueron colocadas en dichos desecadores, y al mismo tiempo se implementó un medidor de temperatura (20 °C) y humedad relativa en cada desecador, para estimar el contenido de humedad de las semillas durante 4 días. Este tratamiento se hizo con el propósito de que las semillas alcancen el contenido de humedad requerido (5 – 6%) para su posterior almacenaje a largo plazo.

Posteriormente, cada tubo con semillas, fue almacenado bajo un tratamiento, en el cual, fueron herméticamente sellados y sometidos a un vacío parcial con la ayuda de una jeringuilla, la misma que extrajo el aire contenido en los tubos, con el fin de que las semillas mantengan su contenido de humedad constante para que puedan ser conservadas a largo plazo, (Gráfico N° 12).

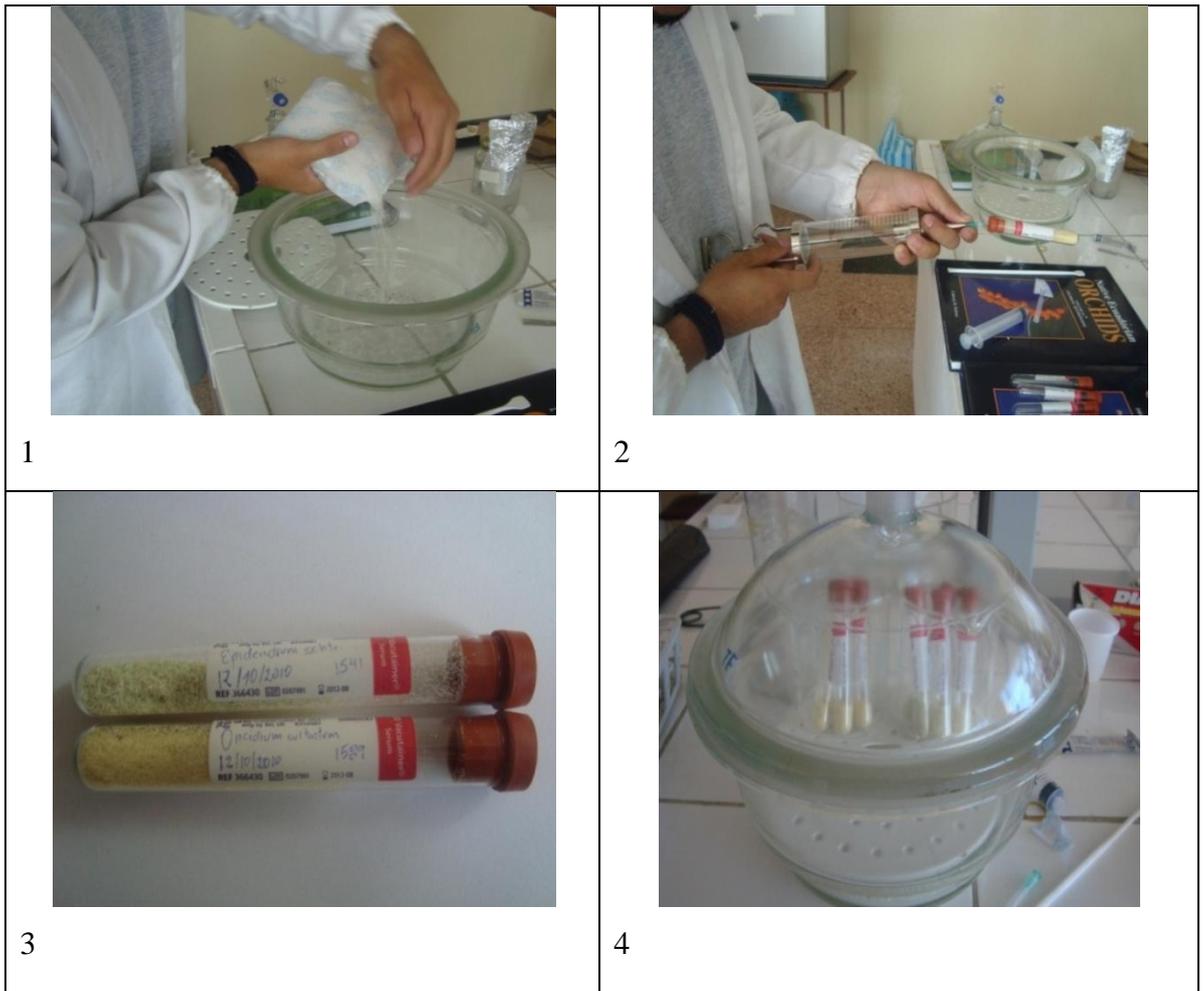


Gráfico N° 12. Procedimiento del secado y almacenamiento del material vegetal.

Foto 1. Adición de sílica gel en el desecador de vidrio, Foto 2. Tratamiento al vacío de las semillas, Foto 3. Tubos de ensayo rotulados con semillas de *O. cultratum* Lindl y *E. schistochilum* Schltr., Foto 4. Tubos de ensayo con semillas de *O. cultratum* Lindl y *E. schistochilum* Schltr., almacenadas al vacío.

## 4.2 Medios de cultivo

### 4.2.1 Preparación de los medios

#### 4.2.1.1 Materiales

Paletas de plástico, recipientes plásticos para pesaje de reactivos, vasos de precipitación de 800 ml y 100 ml, embudos, papel aluminio, plástico para embalaje (rollo-pack), pipetas de 10 ml y 0.2 ml, pipeteadores, probetas, tubos de ensayo, frascos para medio de cultivo de 600 ml, guantes, imanes, rejillas, etiquetas.

#### 4.2.1.2 Reactivos

##### 4.2.1.2.1 Medios de cultivo estándares y caseros

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Knudson modificado (M1) se utilizó: 500 mg de Nitrato de amonio, 500 mg de Sulfato de amonio, 347.2 mg de Nitrato de calcio, 25 mg de Sulfato ferroso 7 H<sub>2</sub>O, 122.12 mg de Sulfato de magnesio, 5.68 mg de Sulfato de manganeso H<sub>2</sub>O, 250 mg de Fosfato de potasio monobásico, 20g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 4.8.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio de coco (M2) se requirió: 2 g de Phytigel, 1 g de azúcar comercial, 1 g de extracto de levadura, 5 ml de complejo B, 20 ml de agua de coco, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Knudson (M3) se utilizó: 500 mg de Sulfato de amonio, 0.056 mg de ácido bórico, 694.4 mg de Nitrato de calcio, 0.0624 mg de Sulfato cúprico 5 H<sub>2</sub>O, 25 mg de Sulfato ferroso 7 H<sub>2</sub>O, 122.12 mg de Sulfato de magnesio, 5.68 mg de Sulfato de manganeso H<sub>2</sub>O, 0.016 mg de Trióxido de molibdeno, 250 mg de Fosfato de potasio monobásico, 0.033 mg de Sulfato de zinc 7 H<sub>2</sub>O, 20 g de sucrosa, 1 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico,

5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 4.7.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Murashige y Skoog (M4) se utilizó:  
4.4 g de sales de Murashige y Skoog, 2 g de Phytigel, 20 g de sucrosa, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 3.9.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Phytamax (M5) se utilizó:  
27.3 g de sales de Phytamax, 20 g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.4.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio de piña (M6) se utilizó:  
200 ml de jugo de pulpa de piña, 2.0 g de Phytigel, 15 g de azúcar comercial, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.4.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio de plátano (M7) se utilizó:  
25 g de harina de plátano, 2.0 g de Phytigel, 15 g de azúcar comercial, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2.

#### 4.2.1.2.2 Medios de cultivo modificados

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Murashige y Skoog más harina de plátano (MM1) se utilizó:  
4.4 g de sales de Murashige y Skoog, 2 g de Phytigel, 20 g de sucrosa, 25 g de harina de plátano, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Murashige y Skoog más agua de coco (MM2) se utilizó:  
4.4 g de sales de Murashige y Skoog, 2 g de Phytigel, 20 g de sucrosa, 100 ml de agua de coco, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Murashige y Skoog más harina de plátano, más agua de coco (MM3) se utilizó:

4.4 g de sales de Murashige y Skoog, 2 g de Phytigel, 20 g de sucrosa, 100 ml de agua de coco, 25 g de harina de plátano, 5 ml ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Knudson (MM4) más harina de plátano se utilizó:

25 g de harina de plátano, 500 mg de Sulfato de amonio, 0.056 mg de ácido bórico, 694.4 mg de Nitrato de calcio, 0.0624 mg de Sulfato cúprico 5 H<sub>2</sub>O, 25 mg de Sulfato ferroso 7 H<sub>2</sub>O, 122.12 mg de Sulfato de magnesio, 5.68 mg de Sulfato de manganeso H<sub>2</sub>O, 0.016 mg de Trióxido de molibdeno, 250 mg de Fosfato de potasio monobásico, 0.033 mg de Sulfato de zinc 7 H<sub>2</sub>O, 20g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Knudson (MM5) más agua de coco se utilizó:

100 ml de agua de coco, 500 mg de Sulfato de amonio, 0.056 mg de ácido bórico, 694.4 mg de Nitrato de calcio, 0.0624 mg de Sulfato cúprico 5 H<sub>2</sub>O, 25 mg de Sulfato ferroso 7 H<sub>2</sub>O, 122.12 mg de Sulfato de magnesio, 5.68 mg de Sulfato de manganeso H<sub>2</sub>O, 0.016 mg de Trióxido de molibdeno, 250 mg de Fosfato de potasio monobásico, 0.033 mg de Sulfato de zinc 7 H<sub>2</sub>O, 20g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

- Para una cantidad de 1000 ml de medio Knudson (MM6) más harina de plátano, más agua de coco se utilizó:

25 g de harina de plátano, 100 ml de agua de coco, 500 mg de Sulfato de amonio, 0.056 mg de ácido bórico, 694.4 mg de Nitrato de calcio, 0.0624 mg de Sulfato cúprico 5 H<sub>2</sub>O, 25 mg de Sulfato ferroso 7 H<sub>2</sub>O, 122.12 mg de Sulfato de magnesio, 5.68 mg de Sulfato de manganeso H<sub>2</sub>O, 0.016 mg de Trióxido de molibdeno, 250 mg de Fosfato de potasio monobásico, 0.033 mg de Sulfato de zinc 7 H<sub>2</sub>O, 20g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de

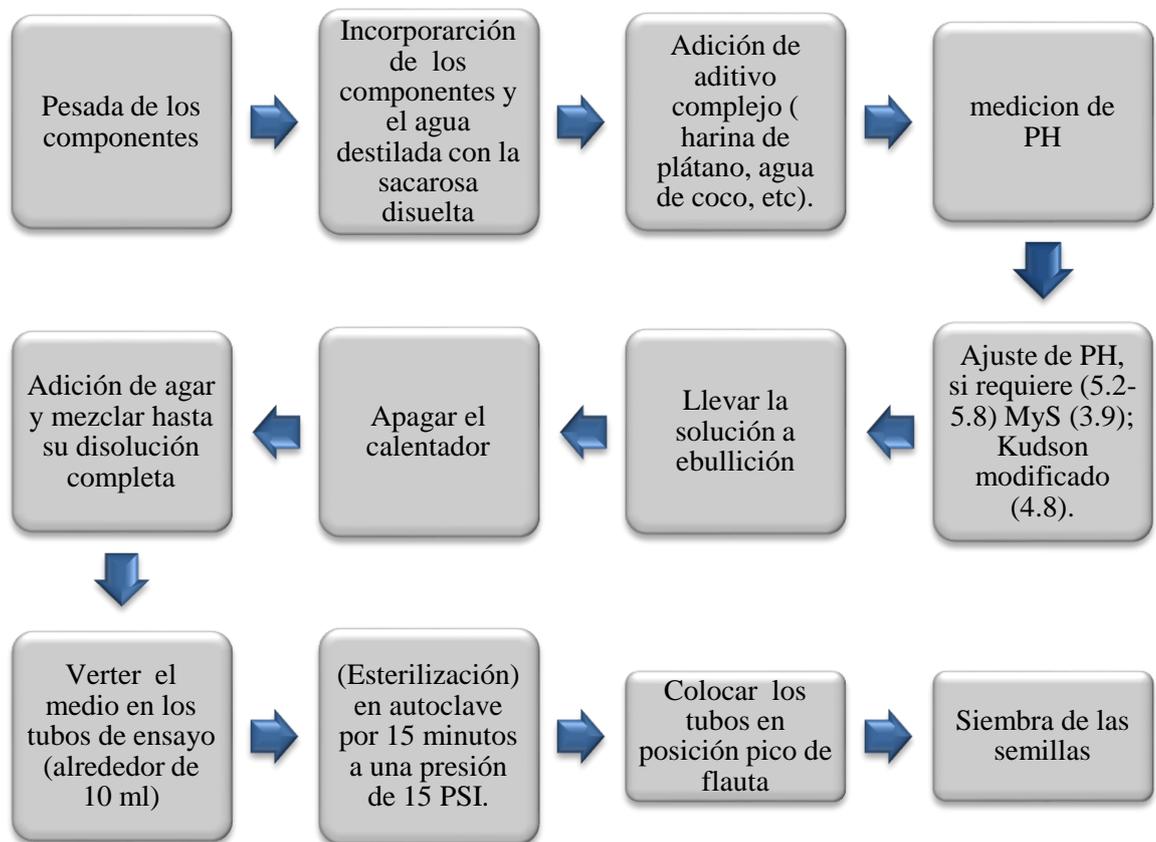
Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

#### 4.2.1.3 Equipos

Balanza analítica, agitador magnético, pH-metro, microondas, autoclave.

#### 4.2.1.4 Procedimiento

Para cada medio de cultivo se ha realizado el siguiente proceso, como se muestra en el Cuadro N° 9 y el Gráfico N° 13.



Cuadro N° 9. Proceso de elaboración de medios de cultivo.



1



2



3



4



5



6

Gráfico N° 13. Proceso de elaboración de los medios de cultivo.

Foto 1. Componentes químicos para los medios de cultivo, Foto 2. Preparación de los componentes en agitador magnético, Foto 3. Ajuste de pH en el medio, Foto 4. Esterilización de los medios en autoclave, Foto 5. Tubos de ensayo con medios estériles en posición pico de flauta, Foto 6. Medios estériles en cámara de flujo laminar para siembra de las semillas.

## 4.2.2 Siembra de las semillas

### 4.2.2.1 Materiales

Tubos de ensayo con medio de cultivo, bisturíes estériles, cepillo de dientes, vasos de precipitación de 100 ml, cajas Petri de vidrio pírex, pinzas, servilletas estériles, papel aluminio, plástico para embalaje (rollo-pack), atomizadores para agua y alcohol, papel filtro, bandejas plásticas para el traslado de medios y materiales, cofia, mascarilla, semillas de *E. schistochilum* Schltr y *O. cultratum* Lindl.

### 4.2.2.2 Reactivos

Agua estéril, Hipoclorito de sodio al 3%, alcohol al 70% y al 90%, solución jabonosa Tween 20.

### 4.2.2.3 Equipos

Estufa, cámara de flujo laminar, cámara de crecimiento, cronómetro.

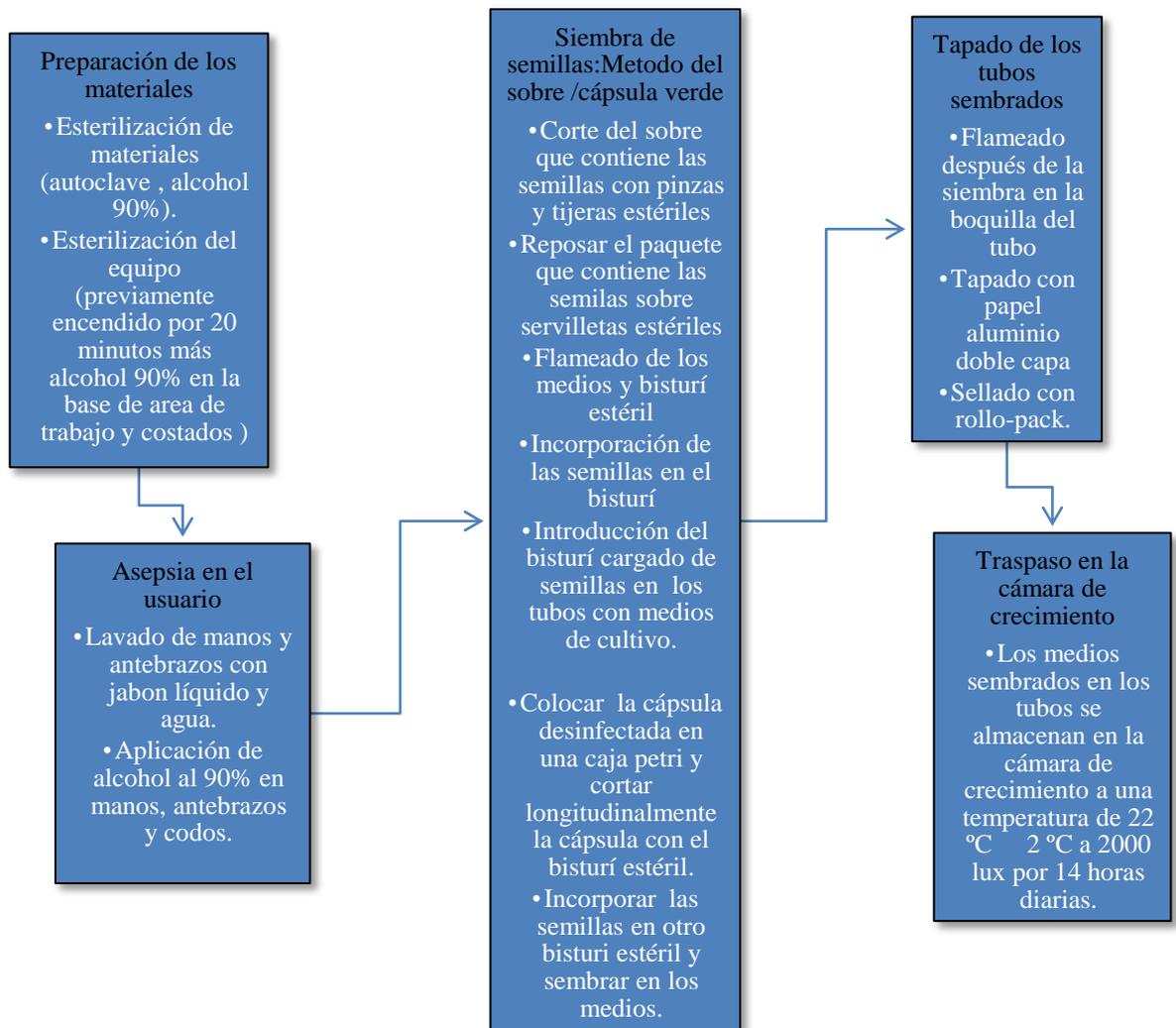
### 4.2.2.4 Procedimiento

#### 4.2.2.4.1 Desinfección de las semillas

De los tubos almacenados, solamente se utilizó un tubo con semillas de cada especie, de los cuales, una pequeña porción de semillas fue colocada en el centro del papel filtro (de 2 cm<sup>2</sup> de tamaño), éste fue doblado en forma de sobre y engrapado de tal forma que las semillas queden al lado opuesto de la grapa; se rotuló cada sobre con el código asignado, obteniéndose así 9 sobres con semillas de *E. schistochilum* Schltr y 5 sobres con semillas de *O. cultratum* Lindl., después, los sobres fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, a continuación en alcohol al 70 % por dos minutos y finalmente se enjuagaron en agua estéril por 1 minuto cada uno. Para la cápsula verde proveniente de *O. cultratum* Lindl se realizó un lavado de la misma con la solución jabonosa, utilizando el cepillo de dientes, se enjuagó la cápsula en agua estéril y se la sumergió en hipoclorito al 3% por 10 minutos. Finalmente, se volvió a enjuagar la cápsula, se roció con alcohol al 90%, fue flameada y depositada en una caja Petri estéril, para luego ser llevada a la cámara de flujo laminar.

#### 4.2.2.4.2 Siembra en la cámara de flujo laminar

Para la siembra, fueron utilizadas semillas provenientes de cápsula madura de *E. schistochilum* Schltr., mientras que, para *O. cultratum* Lindl., se recurrió a semillas de cápsula madura y no madura. Una vez desinfectadas las semillas, se realizó la siembra en los tubos de ensayo con medio de cultivo en la cámara de flujo laminar siguiendo el siguiente proceso como muestra el Cuadro N° 10 y el Gráfico N° 14.



Cuadro N° 10. Proceso de siembra de las semillas en cámara de flujo laminar y traspaso a la cámara de crecimiento.

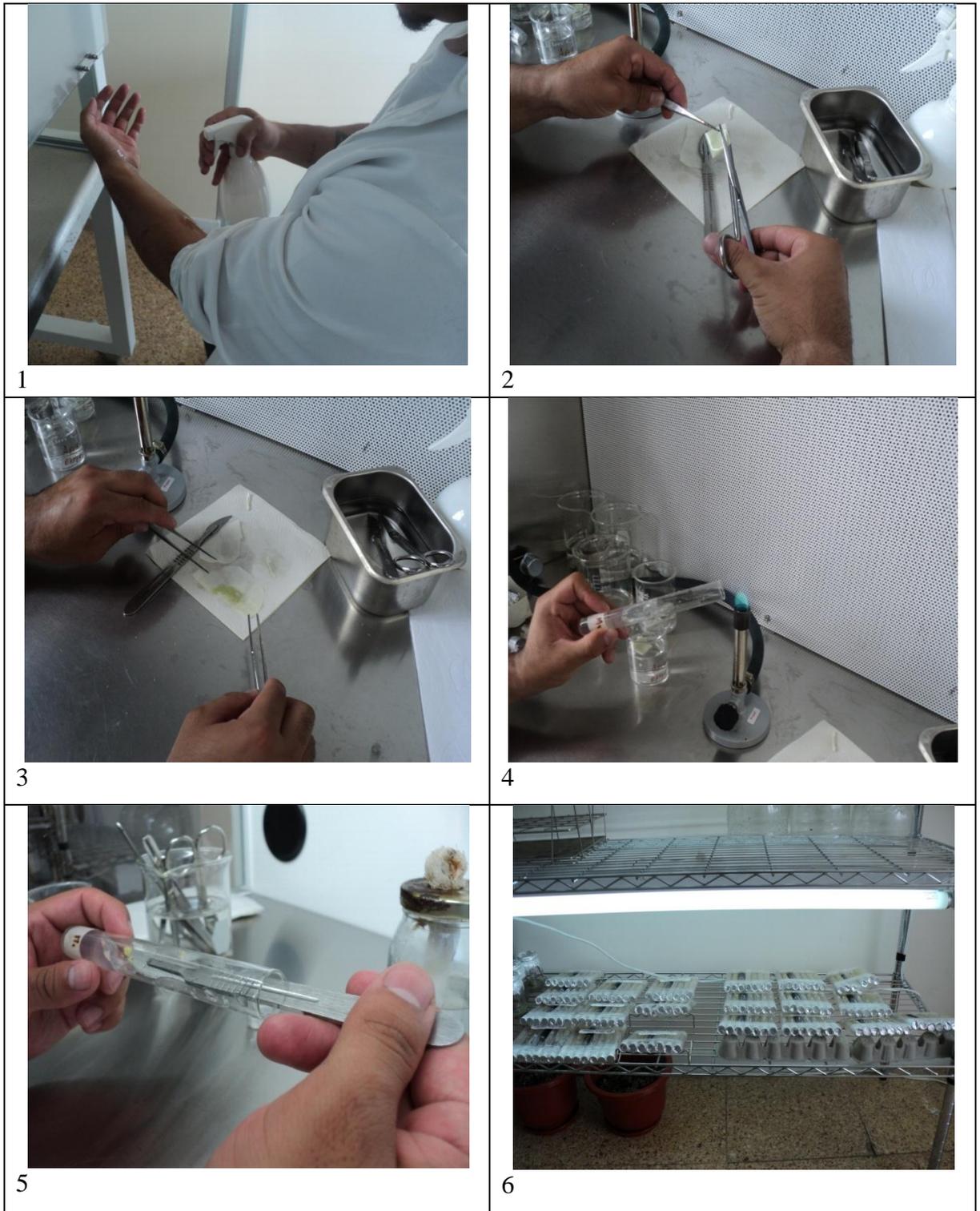


Gráfico N° 14. Procedimiento para la siembra de las semillas.

Foto 1. Asepsia del usuario, Foto 2. Corte del sobre con semillas estériles, Foto 3. Semillas estériles para la siembra, Foto 4. Flameado del tubo de ensayo previa a la siembra, Foto 5. Introducción de las semillas estériles en los medios de cultivo, Foto 6. Traspaso de los tubos con los medios sembrados a la cámara de crecimiento.

#### 4.2.2.5 Análisis de datos

En esta investigación se evaluaron trece medios de cultivo (tratamientos) en la propagación de *E. schistochilum* Schltr., y en la propagación de *O. cultratum* Lindl., distribuidos en dos grupos:

##### 4.2.2.5.1 Medios estándares y caseros:

M1= Medio Knudson modificado, M2= Medio de coco, M3= Medio Knudson, M4= Medio Murashige y Skoog, M5= Medio Phytamax, M6= Medio de piña, M7= Medio de plátano.

##### 4.2.2.5.2 Medios modificados:

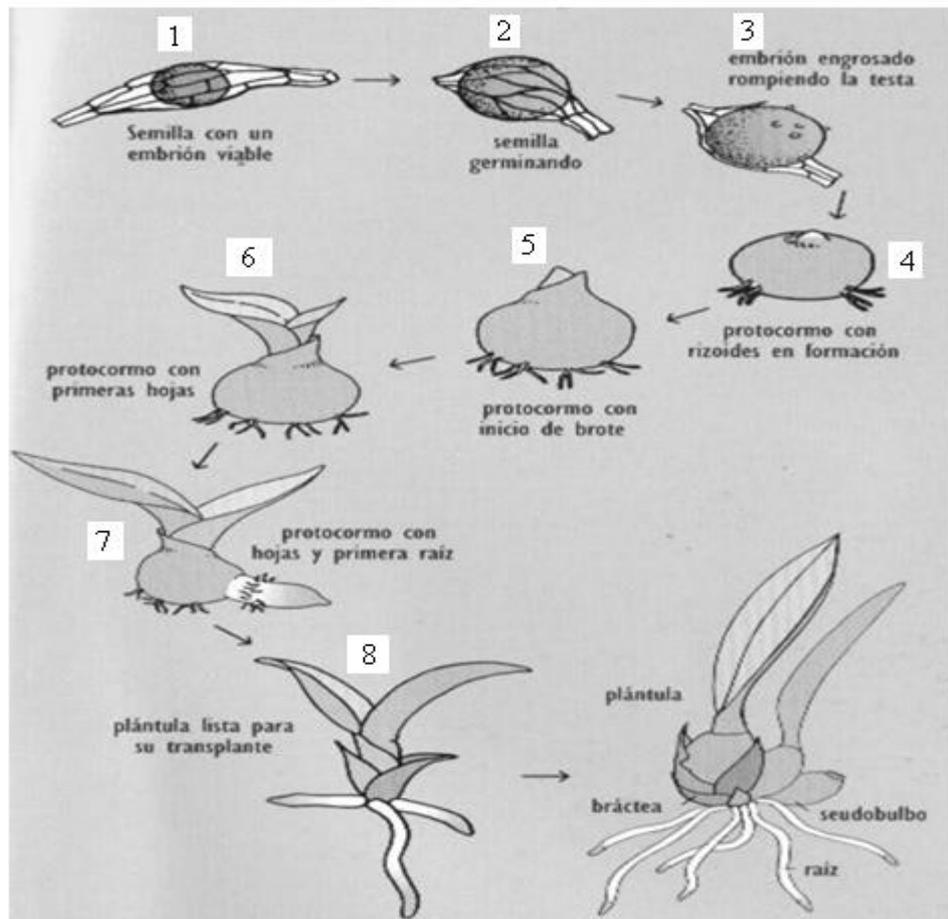
MM1= Medio Murashige y Skoog con harina de plátano, MM2= Medio Murashige y Skoog con agua de coco, MM3= Medio Murashige y Skoog con harina de plátano y agua de coco, MM4= Medio Knudson con harina de plátano, MM5= Medio Knudson con agua de coco, MM6= Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco.

Cada tratamiento constó de 10 repeticiones distribuidas en tubos de ensayo con aproximadamente 10 ml de medio de cultivo y adicionados con una pequeña porción de material genético como explante.

##### 4.2.2.5.3 Variables evaluadas:

###### 4.2.2.5.3.1 Variable de crecimiento del explante

El crecimiento de los explantes fue evaluado a los 30, 90 y 180 días después de efectuada la siembra; en cada muestreo, se tomaron todas las repeticiones por cada tratamiento, para verificar los siguientes estadios de crecimiento, basados en el ciclo de vida de una orquídea epífita que menciona (Seaton y Ramsay, 2009) del Gráfico N° 7; y adoptando una notación numérica asignada a cada estadio de crecimiento, en orden ascendente se tiene:



Estadíos de crecimiento:

- 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento.
- 2 = Semilla germinando.
- 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa.
- 4 = Protocormo con rizoides en formación.
- 5 = Protocormo con inicio de brote.
- 6 = Protocormo con primeras hojas.
- 7 = Protocormo con hojas y primera raíz.
- 8 = Plántula lista para su trasplante.

#### 4.2.2.5.3.2 Contaminación del cultivo

La contaminación se determinó a los 30, 90 y 180 días del experimento, a través del siguiente esquema nominal:

- H = Presencia de hongos.
- B = Presencia de bacterias.

Para la tabulación de datos de los resultados de la siembra se indica a través del Cuadro N° 11 y Cuadro N° 12.

Medios de cultivo	<i>E. schistochilum</i> Schltr/ <i>O. cultratum</i> Lindl									
Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M1										
M2										
M3										
M4										
M5										
M6										
M7										

Cuadro N° 11. Método de evaluación para el estado de desarrollo de las semillas de *E. schistochilum* Schltr., y *O. cultratum* Lindl., en medios de cultivo estándares y caseros.- M1 = Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio Murashige y Skoog, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 = Medio de plátano.

Medios de cultivo	<i>E. schistochilum</i> Schltr/ <i>O. cultratum</i> Lindl									
Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MM1										
MM2										
MM3										
MM4										
MM5										
MM6										
MM7										

Cuadro N° 12. Método de evaluación para el estado de desarrollo de las semillas de *E. schistochilum* Schltr., y *O. cultratum* Lindl., en medios de cultivo modificados.- MM1 = Medio Murashige y Skoog con harina de plátano, MM2 = Medio Murashige y Skoog con agua de coco, MM3 = Medio Murashige y Skoog con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco.

#### 4.2.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del crecimiento del explante se analizarán posteriormente mediante el procedimiento ANOVA del programa SPSS 2011; a través de la prueba de Kruskal-Wallis con una probabilidad  $P < \text{ó igual a } 0.05$ , con el fin de distinguir por medio de las medianas qué medios de cultivo son similares o diferentes estadísticamente.

Aplicando el método estadístico de Kruskal-Wallis se plantean las siguientes hipótesis:

Ha: Al menos un medio de cultivo presenta un desempeño diferente en el crecimiento de la especie sembrada *in-vitro*.

Ho: Los medios de cultivo analizados presentan un mismo desempeño en el crecimiento de la especie sembrada *in-vitro*.

Se determinará cuál es el medio de cultivo más eficiente con la prueba a posteriori de Kruskal-Wallis, la misma que, en función de los estadíos de crecimiento crea tablas de frecuencia y asocia una probabilidad estadística para cada medio de cultivo. De esta manera, el medio de cultivo que posea una mayor probabilidad estadística será el medio de cultivo más eficiente para cada especie estudiada.

### 4.3 Aclimatación de las plántulas

#### 4.3.1 Materiales

Cuaderno de notas, cámara de fotos, sustrato para orquídeas, tubos con plántulas, pinzas y bisturís estériles, regla para medición, mini brocha, mascarilla, cofia, bandeja de plástico para siembra (almácigo), recipientes de vidrio y atomizadores.

#### 4.3.2 Reactivos

Alcohol al 96 %, fungicida Carbenpac (Carbendazim....500mg/l), agua estéril, solución fertilizante Ecuagenera.

#### 4.3.3 Equipos

Autoclave, Cámara de aclimatación (propagador)

#### 4.3.4 Procedimiento

El sustrato utilizado para *E. schistochilum* Schltr, fue elaborado a base de una mezcla de musgo *Sphagnum* más corteza de pino fina, mientras que, para *O. cultratum* Lindl, se utilizó un sustrato a base de un mezcla de musgo *Sphagnum* con fibra de coco y piedra volcánica (piedra pómez). Los sustratos fueron esterilizados en la autoclave junto con los materiales de vidrio y metálicos por 30 minutos a 15 PSI. A continuación, se midió el tamaño de las plántulas, considerándose como apto de 3 a 5 cm de alto para su aclimatación. Luego, se extrajeron las plántulas de los tubos, se les adicionó 2 ml de agua estéril para suavizar el medio; con la ayuda de las pinzas, las plántulas fueron sacadas cuidadosamente y depositadas en el recipiente de vidrio con agua estéril. Aparte se realizó la incorporación del sustrato estéril en el almacigo, las plántulas se sembraron y después se rociaron con la solución fungicida a una concentración de 0.5 ml /l de agua. Finalmente, fueron llevadas al propagador, donde se evaluó su estado en el tiempo, controlando sus condiciones de humedad relativa (50-75%), luz artificial continua (2000 lux/14 horas), temperatura (20-25 °C) para *E. schistochilum* Schltr, y de humedad relativa (70%), luz artificial continua (2000 lux/14 horas), temperatura (15-20 °C) para *O. cultratum* Lindl., y ventilación

constante de 2300 rpm/ 14 horas para ambas especies para estimularlas a crear cera epicuticular como autodefensa y fortalecimiento, (Cuadro N° 15).

Gráfico N° 15. Procedimiento para la aclimatación de las plántulas.





Foto 1. Esterilización del sustrato, Foto 2. Medición de las plántulas, Foto 3. Extracción de las plántulas de los frascos, Foto 4. Reposo de las plántulas en agua estéril, Foto 5. Siembra de las plántulas en el sustrato, Foto 6. Plántulas sembradas en el sustrato, Foto 7. Plántulas en la cámara de aclimatación (Propagador), Foto 8. Plántulas aclimatadas al medio externo, Foto 9. Cámara de aclimatación (Propagador).

Para el mantenimiento de las plántulas se les suministró agua 3 veces por semana; además de una solución fertilizante orgánico a base de extracto de algas marinas para el crecimiento, resistencia a plagas y enfermedades a una dosis de 1 ml/l de agua cada 15 días y combinada con un bioregulador concentrado a base de cytokinina 0,001% a una dosis de 0,5 ml/l de agua cada 15 días para promover su floración.

#### 4.3.5 Análisis de datos

Para determinar el tiempo de adaptación de las plántulas dentro del propagador y posteriormente en el medio externo se realizó un cuadro indicativo Cuadro N° 13; el cual presenta el comportamiento de las plántulas luego de extraerlas del ambiente *in-vitro* en que permanecieron durante el experimento.

##### 4.3.5.1 Variables evaluadas

Las variables a evaluar como respuestas de las plántulas a la aclimatación fueron:

- Porcentaje de plántulas saludables: Menciona el porcentaje de plántulas que se encuentran visualmente en buen estado, mostrando una capacidad de adaptación satisfactoria en el proceso de aclimatación.
- Porcentaje de plántulas con estrés: Señala el porcentaje de plántulas con una capacidad de adaptación intermedia; expresando un estado de desestabilización inicial de sus funciones causada por factores del entorno manifestándose principalmente en síntomas como marchitamiento, decoloración y quemaduras en el follaje. Dicho estado abre la posibilidad a una normalización y mejora de la plántula o al agravamiento y declinación dando como resultado un efecto negativo y daño permanente.
- Porcentaje de plántulas muertas: Indica el porcentaje de plántulas que luego de reflejar un estrés vegetal, en seguida perecieron. Mostrando una capacidad de adaptación insuficiente en el proceso de aclimatación.

Las variables se evaluaron a los 8, 15, 30, 45 y 60 días; estimando de esta manera por medio de un porcentaje las plántulas que lograron adaptarse del total que se trasplantaron, (Cuadro N° 13).

Número de plántulas trasplantadas	Especie dentro del propagador				Especie Fuera del propagador
Variables Tiempo	Semana 1 (8 días)	Semana 2 (15 días)	Semana 3 (30 días)	Semana 4 (45 días)	Semana 5 (60 días)
% de Plántulas saludables					
% de Plántulas con estrés					
% de Plántulas muertas					

Cuadro N° 13. Comportamiento de las plántulas en el propagador y medio externo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Recolección, identificación y almacenamiento del material genético

En la colección del material vegetal, el reconocimiento de las especies fue realizado a través de una identificación visual y mediante el uso del material bibliográfico se obtuvieron los siguientes datos como muestra el Cuadro N° 14.

<p>N° de Colección: <u>1541</u>, del libro de campo de M. Cerna</p> <p>Familia: <i>Orchidaceae</i></p> <p>Género: <i>Epidendrum</i></p> <p>Especie: <i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr</p> <p>N° de especímenes colectados: 8</p>	
<p>N° de Colección: <u>1589</u>, del libro de campo de M. Cerna</p> <p>Familia: <i>Orchidaceae</i></p> <p>Género: <i>Oncidium</i></p> <p>Especie: <i>Oncidium cultratum</i> Lindl</p> <p>N° de especímenes colectados: 3</p>	

Cuadro N° 14. Identificación de las especies colectadas.

Al evaluar la calidad del material genético, a través del microscopio electrónico de menor aumento (lente 4X) se pudo visualizar la presencia de embriones en las dos especies, lo que indica que son aptas para la siembra.

Se logró determinar, por otro lado, el tamaño de las semillas en cada especie, siendo de: (2 mm x 0,3 mm) en las semillas de *E. schistochilum* Schltr y de (0,5 mm x 0,16 mm) en semillas de *O. cultratum* Lindl, (Gráfico N° 16).

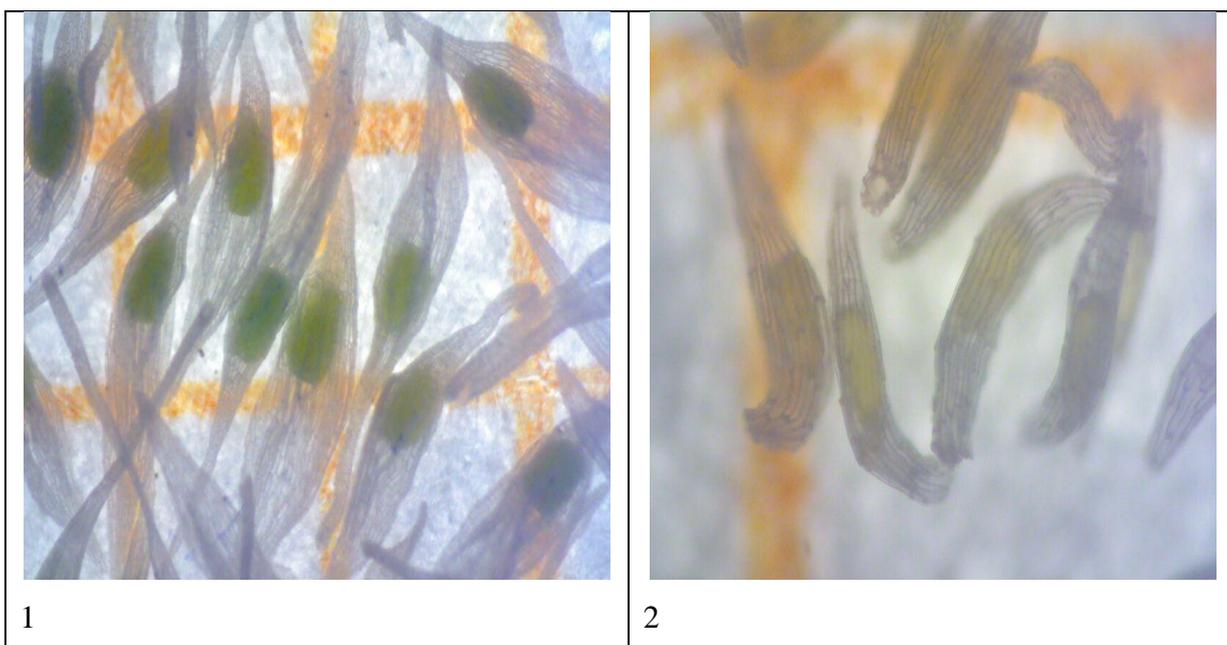


Gráfico N° 16. Semillas de *E. schistochilum* Schltr y *O. cultratum* Lindl vista en el microscopio.- Foto 1.Semillas de *E. schistochilum* Schltr (2 mm x 0,3 mm) con presencia de embriones (lente 4x), Foto 2. *O. cultratum* Lindl (0,5 mm x 0,16 mm) con presencia de embriones (lente 4x).

En el proceso de secado, empleando sílica gel como desecante para las semillas maduras, durante 4 días en el desecador a temperatura ambiente, se obtuvo un contenido de humedad del 6% para las semillas de *E. schistochilum* Schltr y del 4% en las semillas de *O. cultratum* Lindl; lo que indica que, el dato obtenido de contenido de humedad para el caso de las semillas de *O. cultratum* Lindl, está fuera del rango recomendado (5-6 %), (Gráfico N° 17).



Gráfico N° 17. Semillas de *E. schistochilum* Schltr y *O. cultratum* Lindl en el desecador empleando sílica gel como desecador.

En el caso del almacenamiento utilizando el sellado hermético y el vacío parcial en los tubos de ensayo, se observó que, las semillas de las especies se adaptaron positivamente, manteniendo el contenido de humedad que se obtuvo del secado; además, permanecieron exentos de agentes infecciosos y libres de cualquier riesgo de contaminación, adquiriendo así, semillas de buena calidad para su conservación.

En cuanto al número de tubos con semillas, se logró obtener un número de 9 tubos con semillas provenientes de 9 cápsulas maduras de *E. schistochilum* Schltr, y 5 tubos con semillas de *O. cultratum* Lindl, provenientes de 5 cápsulas maduras. El número de tubos por cada especie, difiere por el número de cápsulas que lograron madurar durante el experimento, (Gráfico N° 18) y (Gráfico N° 19).



Gráfico N° 18. Tubos almacenados al vacío de *E. schistochilum* Schltr.



Gráfico N° 19. Tubos almacenados al vacío de *O. cultratum* Lindl.

### 5.1.1 Discusión

En el presente estudio, la aplicación del tratamiento de secado de semillas, sugerido por (Seaton y Ramsay, 2009) utilizando sílica gel como desecante, durante 4 días en el desecador, y preservadas luego en tubos de ensayo al vacío con tapa hermética a temperatura ambiente, mostraron ser apropiadas para las semillas de *E. schistochilum* Schltr; sin embargo, no se obtuvo el mismo resultado para las semillas de *O. cultratum* Lindl., esta afirmación puede ser sustentada en que dichas semillas no germinaron después de efectuada su siembra. Una de las causas, pudo ser que, el contenido de humedad obtenido (4 %) estuvo por debajo de lo recomendado por (Seaton y Ramsay, 2009), quienes sugieren un porcentaje del (5-6%), por tanto, se piensa que, la sílica gel secó excesivamente las semillas y redujo su capacidad para germinar, por lo que, se recomienda no mantenerlas en la sílica gel por tiempo no mayor a los 4 días en el desecador.

En la investigación realizada por (Ossenbach y otros, 2007) almacenando semillas de diferentes especies de orquídeas como *Blettia purpurea* Lam, *Cattleya aurantiaca* Lindl., *Epidendrum baumannianum* Schltr., *Epidendrum pseudoepidendrum* Rchb., *Maxillaria bracteata* Schltr., *Scaphyglottis pulchella* Schltr y *Stanhopea wardii* Lodd., obtuvieron buenos resultados empleando los desecantes: LiCl a temperatura de (20 °C y 5 °C) y CaCl<sub>2</sub> a una temperatura de (5 °C). Por otro lado, (Ossenbach y otros, 2007) coinciden con el uso preferente de viales de vidrio herméticos, ya que, mencionan que los viales de vidrio presentan una mayor facilidad de manejo y aumentan la longevidad de la semilla, en comparación con los sobres de papel encerado en su almacenamiento.

## 5.2 Evaluación de los medios de cultivo

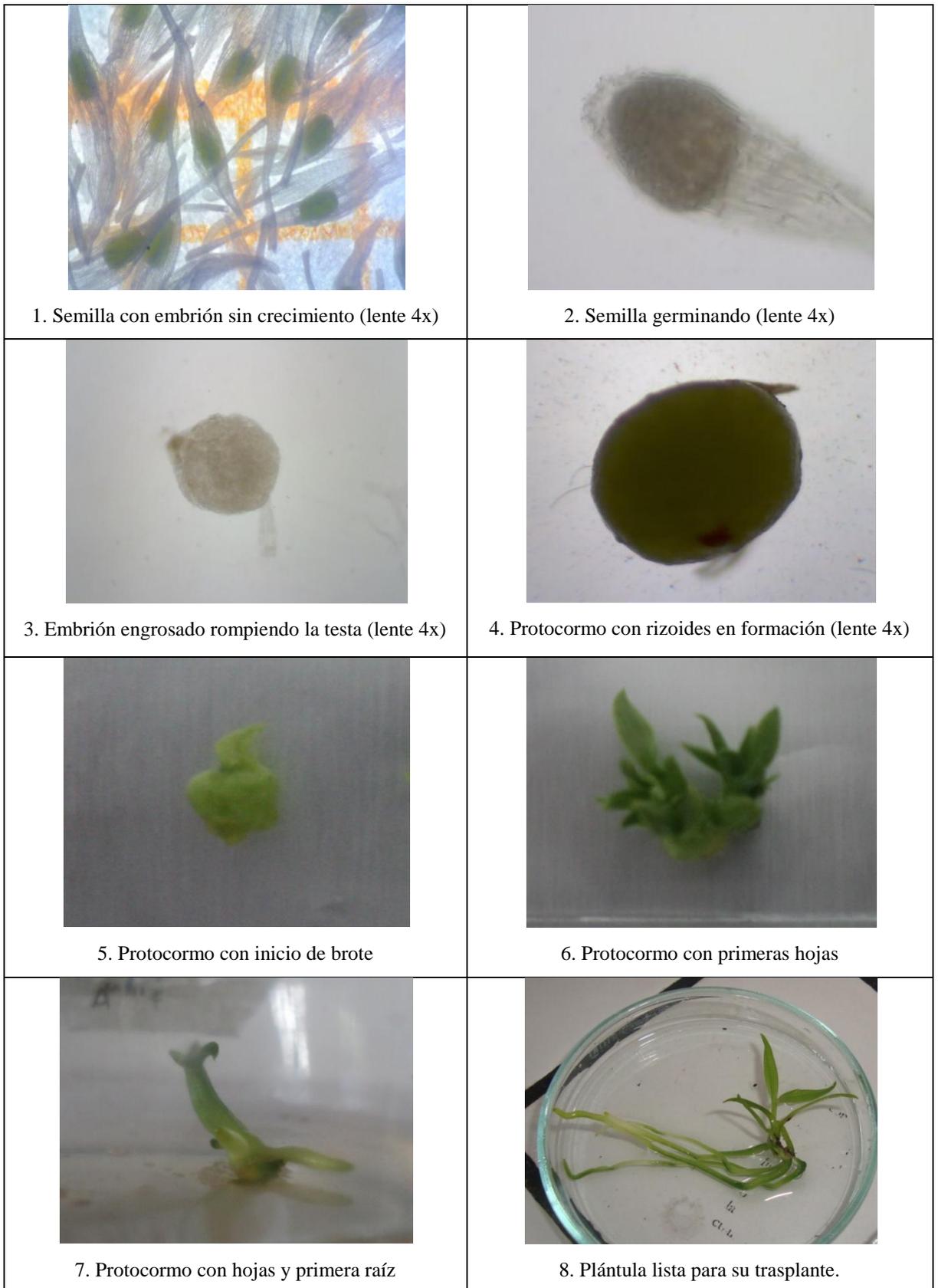


Gráfico N° 20. Estadíos de crecimiento de *E. schistochilum* Schltr

El Grafico N° 20, evidencia los resultados obtenidos de los estadíos de crecimiento de *E. schistochilum* Schltr, durante los ensayos experimentales. A partir de estos datos se realizó la evaluación de los medios de cultivo con la prueba de Kruskal-Wallis.

### 5.2.1 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de siembra de *E. schistochilum* Schltr

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M1	2	1	2	2	2	H	1	1	2	1
M2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
M3	2	2	H	2	1	2	1	1	1	1
M4	2	2	2	B	2	2	1	1	1	2
M5	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
M6	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
M7	H	1	1	2	1	1	2	1	1	1

Cuadro N° 15. Evaluación al primer mes de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios estándares y caseros.- M1= Medio Knudson modificado, M2= Medio de Coco, M3= Medio Knudson, M4= Medio MS, M5=Medio Phytamax, M6= Medio de Piña, M7= Medio de Plátano, 1= Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2= Semilla germinando, H= Presencia de Hongos, B= Presencia de bacterias.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	M1 - Medio Knudson modificado	9	38,33
	M2 - Medio Coco	10	23,30
	M3 - Medio Knudson	9	34,67
	M4 - Medio MS	9	42,00
	M5 - Medio Phytamax	10	46,40
	M6 - Medio Piña	10	23,30
	M7 - Medio Plátano	9	27,33
	Total	66	

Estadísticos de contraste <sup>a,b</sup>

	OBSERVACIÓN
--	-------------

Chi-cuadrado	18,556
gl	6
Sig. asintót.	0,005

- Prueba de Kruskal-Wallis
- Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 16. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios estándares y caseros.

En el Cuadro N° 16, se evidencia que la significancia asintótica es menor que el valor de  $\alpha = 5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que al final del primer mes está generando un desempeño diferente en el crecimiento de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)										Frecuencias		Probabilidades	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	1	2
M1	2	1	2	2	2	H	1	1	2	1	4	5	0,4	0,5
M2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	9	1	0,9	0,1
M3	2	2	H	2	1	2	1	1	1	1	5	4	0,5	0,4
M4	2	2	2	B	2	2	1	1	1	2	3	6	0,3	0,6
M5	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	8	0,2	0,8
M6	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	9	1	0,9	0,1
M7	H	1	1	2	1	1	2	1	1	1	7	2	0,7	0,2

MEDIO	DESEMPEÑO
M5	0,8
M4	0,6
M1	0,5
M3	0,4
M7	0,2
M6	0,1
M2	0,1
<b>Total general</b>	<b>2,7</b>

Cuadro N° 17. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

En el Cuadro N° 17, se muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, donde se observa que el medio M5 (Medio Phytamax) es el medio que tuvo mejor resultado, debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,8) de tener el estadio de crecimiento de tipo 2 (semilla germinando) durante el primer mes de la siembra, siendo así, el mejor tratamiento en el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr. Por otro lado, se observa que hubo 4 tubos contaminados, de los cuales, 3 tubos con presencia de hongos y 1 un tubo con presencia de bacterias, correspondiendo al 6 % del total de tubos sembrados.

### 5.2.2 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)									
Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M1	4	3	2	5	4	H	2	1	3	1
M2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
M3	2	3	H	5	2	4	2	1	1	2
M4	4	5	4	B	5	5	1	2	1	4
M5	4	4	5	1	5	4	5	B	4	1
M6	2	1	1	4	1	2	1	1	1	1
M7	H	1	1	4	1	1	4	1	1	1

Cuadro N° 18. Evaluación al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr, en los medios estándares y caseros.- M1 = Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio MS, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 = Medio de plátano, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2= Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote, H = Presencia de hongos, B= Presencia de bacterias.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	M1 - Medio Knudson modificado	9	38,94
	M2 - Medio Coco	10	21,15
	M3 - Medio Knudson	9	36,39
	M4 - Medio MS	9	44,78
	M5 - Medio Phytamax	9	46,50
	M6 - Medio Piña	10	22,70
	M7 - Medio Plátano	9	23,00
	Total	65	

**Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	20,859
gl	6
Sig. asintót.	0,002

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 19. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios de cultivo estándares y caseros

Como se observa en el Cuadro N° 19, la significancia asintótica es menor que el valor de  $\alpha = 5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que al final del primer trimestre está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)										Frecuencias					Probabilidades				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
M1	4	3	2	5	4	H	2	1	3	1	2	2	2	2	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
M2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	7	3	0	0	0	0,7	0,3	0	0	0
M3	2	3	H	5	2	4	2	1	1	2	2	4	1	1	1	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1
M4	4	5	4	B	5	5	1	2	1	4	2	1	0	3	3	0,2	0,1	0	0,3	0,3
M5	4	4	5	1	5	4	5	B	4	1	2	0	0	4	3	0,2	0	0	0,4	0,3
M6	2	1	1	4	1	2	1	1	1	1	7	2	0	1	0	0,7	0,2	0	0,1	0
M7	H	1	1	4	1	1	4	1	1	1	7	0	0	2	0	0,7	0	0	0,2	0

MEDIO	DESEMPEÑO
M5	0,7
M4	0,6
M1	0,3
M7	0,2
M3	0,2
M6	0,1
M2	0,0
<b>Total general</b>	<b>2,1</b>

Cuadro N° 20. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

Se puede observar en el Cuadro N° 20; que, al final del primer trimestre, el medio M5 (Phytamax) se mantiene como el medio que tuvo mejor resultado, debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,7) de tener los estadíos de crecimiento de tipo 4 (protocormo con rizoides en formación) y de tipo 5 (protocormo con inicio de brote); siendo, de esta manera, el mejor tratamiento en el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr. Se puede evidenciar, por otro lado, que la contaminación al final del primer trimestre es del 7% del total de tubos sembrados.

### 5.2.3 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Repetición										
M1	7	6	6	8	8	-	4	1	6	1
M2	3	3	1	1	3	1	1	2	1	1
M3	6	7	-	7	6	7	3	1	2	3
M4	7	8	6	-	8	8	3	3	1	6
M5	7	8	8	7	8	7	7	-	5	1
M6	3	1	2	6	1	3	3	1	2	1
M7	-	1	1	5	2	1	6	1	1	1

Cuadro N° 21. Evaluación al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios estándares y caseros.- M1 = Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio MS, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 = Medio de plátano, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2= Semilla germinando, 3

= Embrión engrosado rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote, 6 = Protocormo con primeras hojas, 7 = Protocormo con hojas y primera raíz, 8 = Plántula lista para su trasplante, (-) = tubos contaminados retirados.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	M1 - Medio Knudson modificado	9	40,78
	M2 - Medio Coco	10	18,45
	M3 - Medio Knudson	9	38,33
	M4 - Medio MS	9	44,39
	M5 - Medio Phytamax	9	49,56
	M6 - Medio Piña	10	23,05
	M7 - Medio Plátano	9	19,17
	Total	65	

**Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	27,128
gl	6
Sig. asintót.	0,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 22. Test de Kruskal-Wallis de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr.

El Cuadro N° 22 indica que, la significancia asintótica es menor que el valor de  $\alpha=5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que al final del primer semestre está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)										Frecuencias								Probabilidades							
	Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7
M1	7	6	6	8	8	-	4	1	6	1	2	0	0	1	0	3	1	2	0,2	0	0	0,1	0	0,3	0,1	0,2
M2	3	3	1	1	3	1	1	2	1	1	6	1	3	0	0	0	0	0	0,6	0,1	0,3	0	0	0	0	0
M3	6	7	-	7	6	7	3	1	2	3	1	1	2	0	0	2	3	0	0,1	0,1	0,2	0	0	0,2	0,3	0
M4	7	8	6	-	8	8	3	3	1	6	1	0	2	0	0	2	1	3	0,1	0	0,2	0	0	0,2	0,1	0,3
M5	7	8	8	7	8	7	7	-	5	1	1	0	0	0	1	0	4	3	0,1	0	0	0	0,1	0	0,4	0,3
M6	3	1	2	6	1	3	3	1	2	1	4	2	3	0	0	1	0	0	0,4	0,2	0,3	0	0	0,1	0	0
M7	-	1	1	5	2	1	6	1	1	1	6	1	0	0	1	1	0	0	0,6	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0

MEDIO	DESEMPEÑO
M5	0,7
M1	0,6
M4	0,6
M3	0,5
M7	0,1
M6	0,1
M2	0,0
<b>Total general</b>	<b>2,6</b>

Cuadro N° 23. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

Transcurridos seis meses después de la siembra, se puede observar Cuadro N° 23 que, el medio M5 (Phytamax) se mantuvo como el tratamiento que mejor resultado obtuvo, debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,7) de tener los estadíos de crecimiento de tipo 7 (protocormo con hojas y primera raíz) y de tipo 8 (plántula lista para su trasplante), por tanto, es el medio de cultivo más apto para el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr. Con respecto a la contaminación del cultivo, se muestra que, no hubo un incremento, es decir, mantuvo el porcentaje del 7 % del total de tubos sembrados.

***E. schistochilum* Schltr**

MEDIOS ESTÁNDARES Y CASEROS	MES 1	MES 3	MES 6
	<i>Rangos promedio</i>	<i>Rangos promedio</i>	<i>Rangos promedio</i>
M1 - Medio Knudson modificado	38,33	77,92	116,31
M2 - Medio de coco	23,30	45,20	65,58
M3 - Medio Knudson	34,67	72,17	111,28
M4 - Medio MS	42,00	84,56	125,89
M5 - Medio Phytamax	46,40	89,08	132,38
M6 - Medio de piña	23,30	46,65	73,53
M7 - Medio de plátano	27,33	49,61	69,70

Cuadro N° 24. Desempeño de los medios estándares y caseros a través de los rangos promedio del Test de Kruskal Wallis en *E. schistochilum* Schltr.

El Cuadro N° 24 muestra la recopilación de los rangos promedio realizados por la prueba de Kruskal-Wallis, la cual, demuestra el desempeño que han tenido los medios de cultivo estándares y caseros al cabo de 6 meses de efectuado el experimento. Es pertinente mencionar que, el desempeño de los medios, fue evaluado en función de sus frecuencias al tener determinados estadíos de crecimiento, con sus respectivas probabilidades; sin embargo, otra cualidad que presenta el método estadístico, es detallar el desempeño de los medios, a través de los rangos medios, que por definición, evalúa el tamaño de las muestras ya ordenadas y les asigna un valor determinado, dicho valor, estará dado de acuerdo a qué tratamiento presenta una mayor etapa de crecimiento, y tendrá por consiguiente, un valor mayor de puntaje. De esta manera, se puede observar el comportamiento de los medios y el desempeño que han tenido.

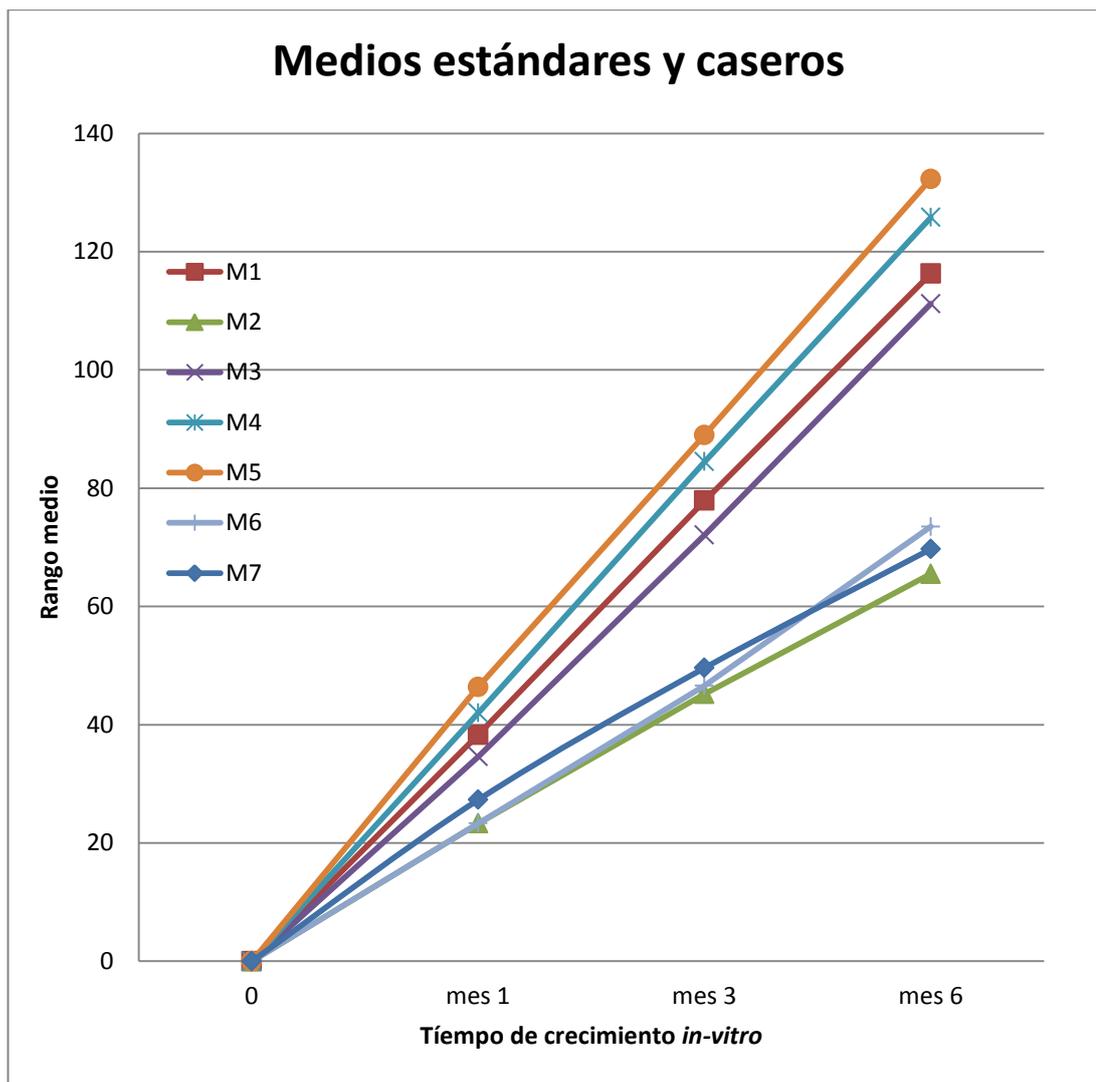


Gráfico N° 21. Histograma de desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros en *E. schistochilum* Schltr, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis.- M1 = Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio MS, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 = Medio de plátano.

El Gráfico N° 21, presenta los resultados obtenidos de la evaluación estadística (Test de Kruskal-Wallis) de los tratamientos estándares y caseros en *E. schistochilum* Schltr, desde su siembra hasta el sexto mes de realizado todo el experimento. Se puede observar que, el medio M5 (Phytamax) es el tratamiento que mejor puntúa, manteniendo un rango medio por encima de 130, lo que indica que, es el mejor tratamiento para el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr.

5.2.4 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer mes de siembra de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Repetición										
MM1	3	2	1	2	3	1	2	3	3	2
MM2	2	1	1	2	3	1	3	2	1	3
MM3	2	3	3	1	3	1	3	2	2	2
MM4	2	3	1	1	1	3	1	2	1	3
MM5	1	3	3	2	3	1	1	2	3	2
MM6	1	1	1	3	H	3	2	1	1	1

Cuadro N° 25. Evaluación al primer mes de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios modificados.- MM1 = Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, H= Presencia de hongos.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	MM1 - Medio MS con harina de plátano	10	34,50
	MM2 - Medio MS con agua de coco	10	28,75
	MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	10	34,50
	MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	10	26,80
	MM5 - Medio Knudson con agua de coco	10	32,55
	MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	9	22,11
	Total	59	

**Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	4,395
gl	5
Sig. asintót.	0,494

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 26. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios de cultivo modificados

En el Cuadro N° 26 se evidencia que, la significancia asintótica es menor que el valor de  $\alpha = 5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que al final del primer mes está generando un desempeño diferente en el crecimiento de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)										Frecuencias		Probabilidades	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	1	2
MM1	3	2	1	2	3	1	2	3	3	2	2	4	0,2	0,4
MM2	2	1	1	2	3	1	3	2	1	3	4	3	0,4	0,3
MM3	2	3	3	1	3	1	3	2	2	2	2	4	0,2	0,4
MM4	2	3	1	1	1	3	1	2	1	3	5	2	0,5	0,2
MM5	1	3	3	2	3	1	1	2	3	2	3	3	0,3	0,3
MM6	1	1	1	3	H	3	2	1	1	1	6	1	0,6	0,1

MEDIO	DESEMPEÑO
MM3	0,4
MM1	0,4
MM2	0,3
MM5	0,3
MM4	0,2
MM6	0,1
<b>Total general</b>	<b>1,7</b>

Cuadro N° 27. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer mes de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

El Cuadro N° 27, muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, en el que, se observa que el medio MM3 (Murashige y Skoog mas plátano más coco), junto con MM1 (Murashige más plátano) son los medios que mejores resultados generaron; debido a que, presentaron una mayor probabilidad (0,4) de tener los estadíos de crecimiento de tipo 2 (semilla germinando) durante el primer mes de la siembra, siendo, de esta manera, los mejores tratamientos en el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr. Por otro lado, se observa que, solamente se presentó un tubo contaminado con hongos, dando el 1% del total de tubos sembrados *in-vitro*.

### 5.2.5 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Repetición										
MM1	6	3	2	3	5	3	4	6	5	4
MM2	4	3	1	5	6	2	5	3	1	6
MM3	4	5	4	2	4	1	6	3	4	4
MM4	3	5	1	2	2	5	4	5	2	5
MM5	2	6	6	3	5	3	2	3	6	3
MM6	2	2	1	6	H	5	4	2	1	2

Cuadro N° 28. Evaluación al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios modificados.- MM1 = Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote, 6=Protocormo con primeras hojas, H = Presencia de hongos.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	MM1 - Medio MS con harina de plátano	10	35,35
	MM2 - Medio MS con agua de coco	10	30,20
	MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	10	31,25
	MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	10	27,95
	MM5 - Medio Knudson con agua de coco	10	33,10
	MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	9	21,28
	Total	59	

**Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	4,374
gl	5
Sig. asintót.	0,469

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 29. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios de cultivo modificados

En el Cuadro N° 29 se puede evidenciar que, la significancia asintótica, es menor que el valor de  $\alpha = 5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que, al final del primer trimestre está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)										Frecuencias					Probabilidades				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Repetición																				
MM1	6	3	2	3	5	3	4	6	5	4	0	1	3	2	2	0	0,1	0,3	0,2	0,2
MM2	4	3	1	5	6	2	5	3	1	6	2	1	2	1	2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
MM3	4	5	4	2	4	1	6	3	4	4	1	1	1	5	1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1
MM4	3	5	1	2	2	5	4	5	2	5	1	3	1	1	4	0,1	0,3	0,1	0,1	0,4
MM5	2	6	6	3	5	3	2	3	6	3	0	2	4	0	1	0	0,2	0,4	0	0,1
MM6	2	2	1	6	H	5	4	2	1	2	2	4	0	1	1	0,2	0,4	0	0,1	0,1

MEDIO	DESEMPEÑO
MM1	0,7
MM3	0,7
MM4	0,6
MM2	0,5
MM5	0,5
MM6	0,2
<b>Total general</b>	<b>3,2</b>

Cuadro N° 30. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

El Cuadro N° 30, muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, donde se observa que, el medio MM1 (Murashige más plátano), junto con el medio MM3 (Murashige y Skoog más plátano más coco) son los medios de cultivo que obtuvieron mejores resultados, debido a que, presentaron una mayor probabilidad (0,7) de tener los estadios de crecimiento de tipo 3 (embrión engrosado rompiendo la testa); de tipo 4 (protocormo con rizoides en formación) y de tipo 5 (protocormo con inicio de brote) al finalizar el primer trimestre de realizada la siembra; siendo de esta manera, los mejores tratamientos en el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr. Se observa además que, no hubo un incremento en la contaminación del cultivo, manteniendo el 1% de contaminación del total de tubos sembrados *in-vitro*.

5.2.6 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Repetición										
MM1	8	6	4	6	7	5	7	8	7	6
MM2	6	6	3	7	8	4	7	5	1	8
MM3	7	7	7	3	7	1	8	5	6	7
MM4	6	7	3	3	5	7	6	8	4	7
MM5	5	8	8	6	7	4	3	6	8	6
MM6	4	3	2	8	-	7	7	4	2	4

Cuadro N° 31. Evaluación al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios modificados.- MM1 = Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote, 6= Protocormo con primeras hojas, 7 = Protocormo con hojas y primera raíz, 8 = Plántula lista para su trasplante, (-) = tubos contaminados retirados.

	MEDIO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	MM1 - Medio MS con harina de plátano	10	35,15
	MM2 - Medio MS con agua de coco	10	29,10
	MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	10	31,90
	MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	10	28,40
	MM5 - Medio Knudson con agua de coco	10	33,05
	MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	9	21,56
	Total	59	

Estadísticos de contraste <sup>a,b</sup>

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	4,556
gl	5
Sig. asintót.	0,474

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 32. Test de Kruskal-Wallis al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr en los medios de cultivo modificados

El Cuadro N° 32 muestra que, la significancia asintótica es menor que el valor de  $\alpha=5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que, al final del primer semestre está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *E. schistochilum* Schltr.

Medios de cultivo	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr (1541)										Frecuencias								Probabilidades							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
MM1	8	6	4	6	7	5	7	8	7	6	0	0	0	1	1	3	3	2	0	0	0	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2
MM2	6	6	3	7	8	4	7	8	1	8	1	0	1	1	0	2	2	3	0,1	0	0,1	0,1	0	0,2	0,2	0,3
MM3	7	7	7	3	7	1	8	5	6	7	1	0	1	0	1	1	5	1	0,1	0	0,1	0	0,1	0,1	0,5	0,1
MM4	6	7	3	3	5	7	6	8	4	7	0	0	2	1	1	2	3	1	0	0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1
MM5	5	8	8	6	7	4	3	6	8	6	0	0	1	1	1	3	1	3	0	0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3
MM6	4	3	2	8	-	7	7	4	2	4	0	2	1	3	0	0	2	1	0	0,2	0,1	0,3	0	0	0,2	0,1

MEDIO	DESEMPEÑO
MM1	0,8
MM5	0,7
MM2	0,7
MM3	0,7
MM4	0,6
MM6	0,3
<b>Total general</b>	<b>3,8</b>

Cuadro N° 33. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la siembra de *E. schistochilum* Schltr.

El Cuadro N° 33, muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, en el que, se observa que el medio MM1 (Murashige más plátano), es el medio de cultivo que obtuvo mejor resultado, debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,8) de tener los estadíos de crecimiento de tipo 6 (protocorno con primeras hojas),

de tipo 7 (protocormo con hojas y primera raíz) y de tipo 8 (plántula lista para su trasplante), al finalizar el primer semestre de realizada la siembra; siendo por tanto, el mejor tratamiento en el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr. En cuanto a la contaminación, se observa que mantuvo el 1 % del total de tubos sembrados y posteriormente, dicho tubo fue retirado de la cámara de crecimiento.

***E. schistochilum* Schltr**

<i>MEDIOS MODIFICADOS</i>	<i>MES 1</i>	<i>MES 3</i>	<i>MES 6</i>
	<i>Rangos promedio</i>	<i>Rangos promedio</i>	<i>Rangos promedio</i>
MM1 - Medio MS con harina de plátano	34,50	68,90	101,45
MM2 - Medio MS con agua de coco	28,75	57,68	86,23
MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	34,50	65,45	93,57
MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	26,80	55,18	85,62
MM5 - Medio Knudson con agua de coco	32,55	64,43	95,88
MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	22,11	43,81	69,28

Cuadro N° 34. Desempeño de los medios modificados a través de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis en *E. schistochilum* Schltr.

El Cuadro N° 34 muestra la recopilación de los rangos promedio realizados por la prueba de Kruskal-Wallis, en la cual, demuestra el desempeño que han tenido los medios de cultivo modificados en *E. schistochilum* Schltr, al cabo de 6 meses de efectuado el experimento.

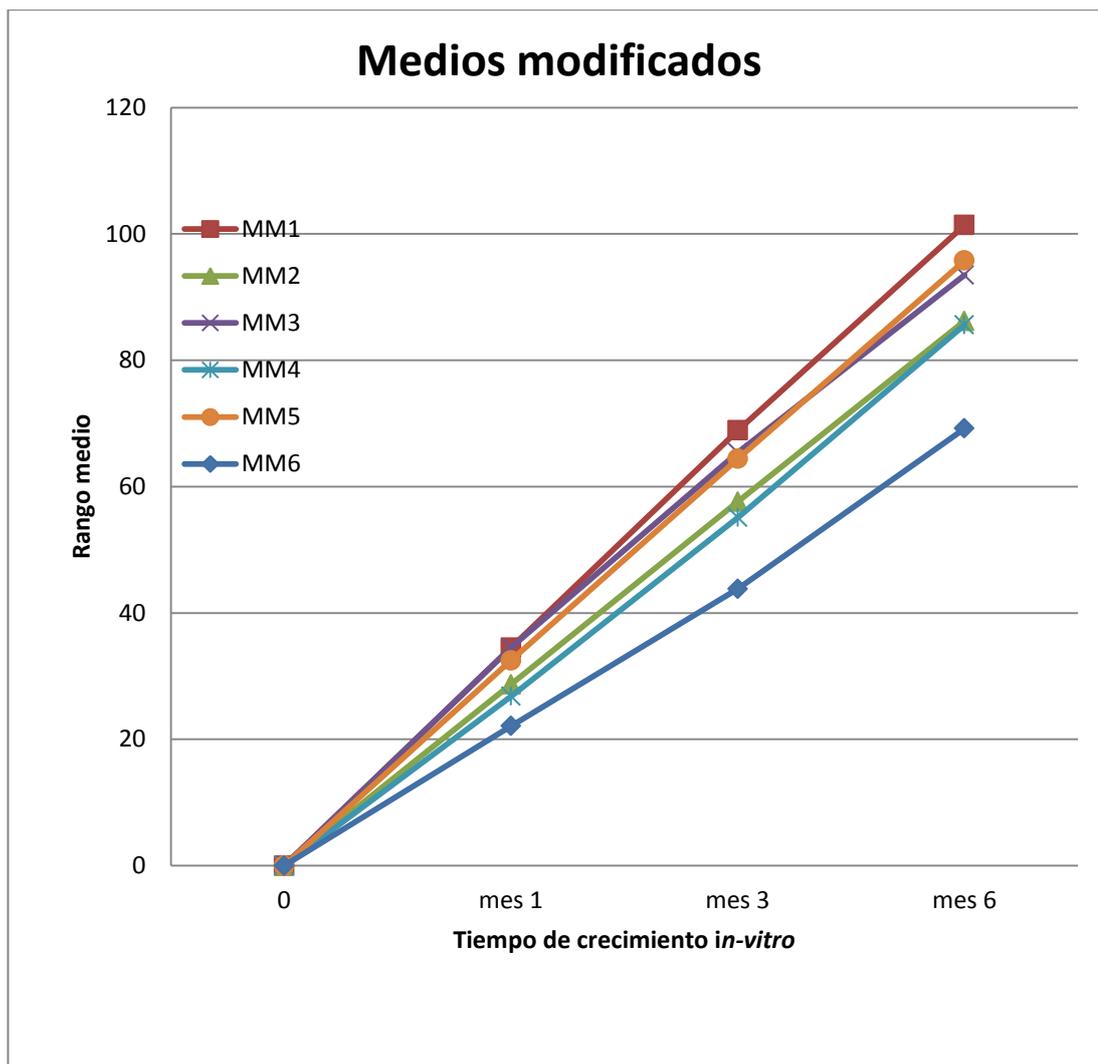
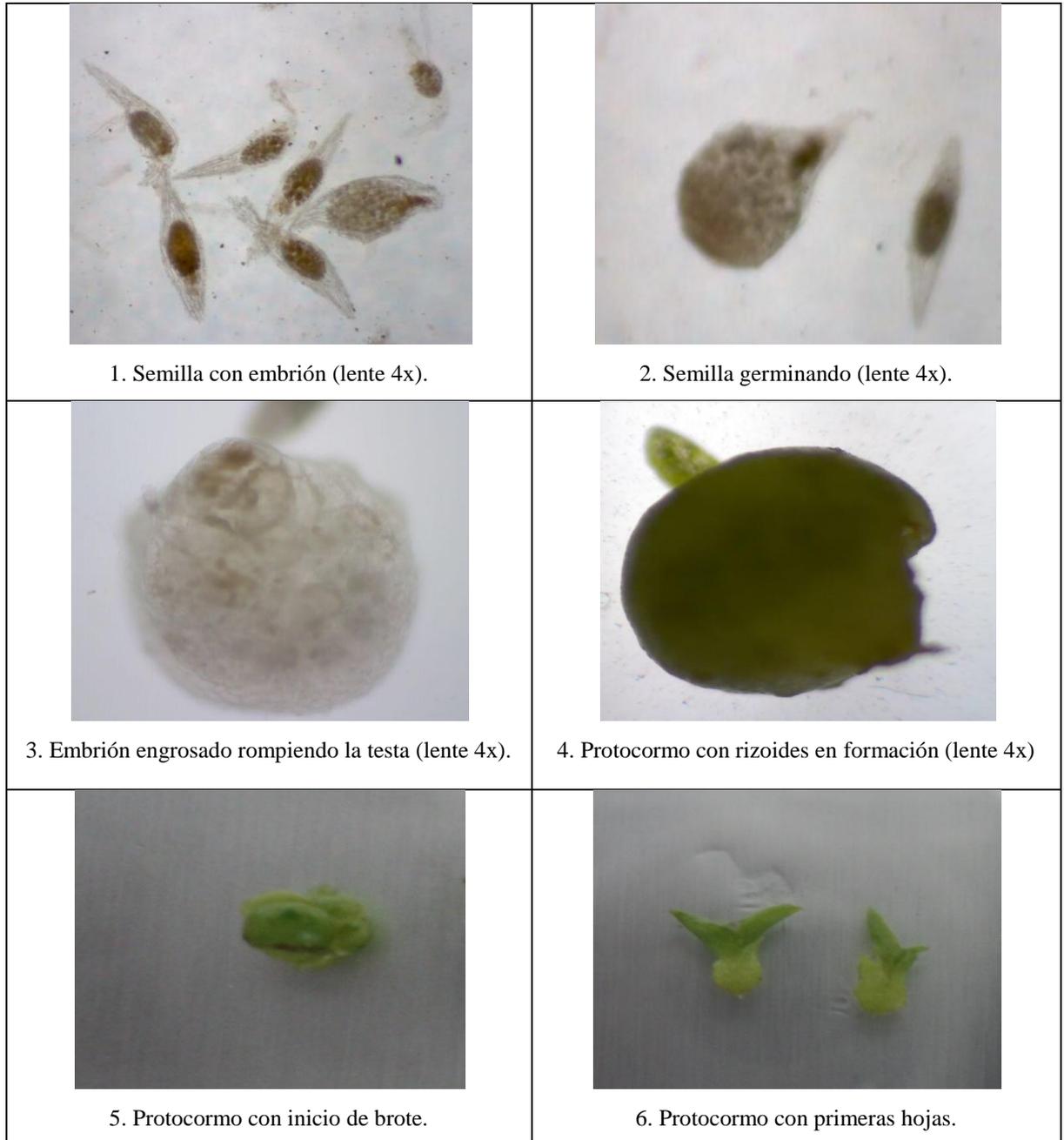


Gráfico N° 22. Histograma de desempeño de los medios de cultivo modificados en *E. schistochilum* Schltr, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis.- MM1 = Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco.

El Gráfico N° 22, presenta los resultados obtenidos de la evaluación estadística (Test de Kruskal-Wallis) de los tratamientos modificados en *E. schistochilum* Schltr, desde su siembra hasta el sexto mes de realizado todo el experimento. Se puede observar que, el medio MM1 (Murashige más harina de plátano) es el medio que mejor puntúa, manteniendo un rango promedio por encima de 100, lo que indica que, es el mejor tratamiento para el crecimiento *in-vitro* de *E. schistochilum* Schltr.

La siembra de semillas de *O. cultratum* Lindl., a partir de cápsula madura, no obtuvo resultados de germinación; sin embargo, los ensayos de siembra a través de las cápsulas verdes mostraron como resultados todos los estadios de crecimiento como se muestra en el Gráfico N° 23:



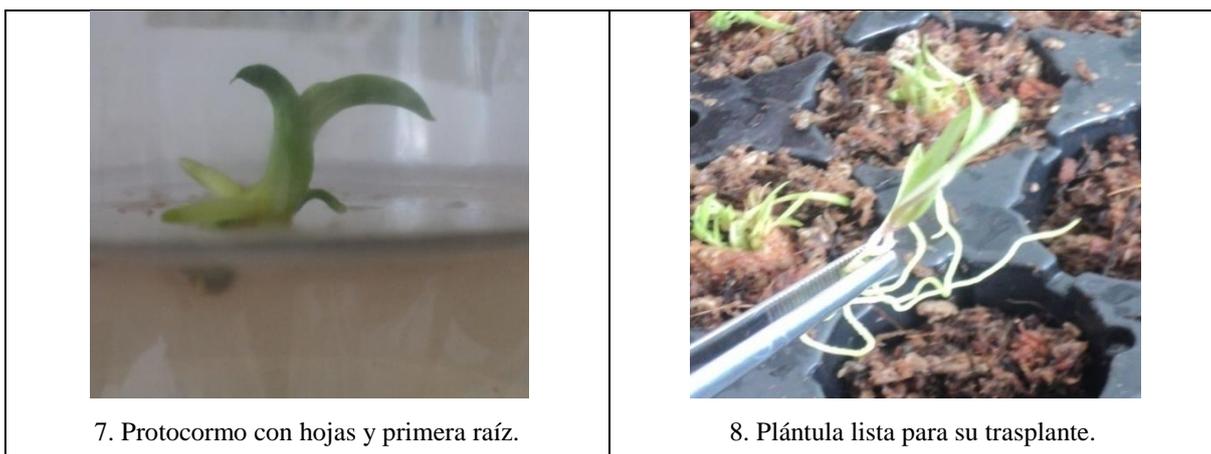


Gráfico N° 23. Estadíos de crecimiento en *O. cultratum* Lindl.

5.2.7 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de siembra de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl. (1589)									
Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M1	2	2	2	3	2	3	2	2	1	1
M2	1	1	1	H	1	1	1	1	1	1
M3	1	1	1	1	1	B	1	1	1	1
M4	1	H	1	1	1	1	H	1	1	1
M5	2	2	1	3	2	1	3	3	1	1
M6	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1
M7	3	3	2	3	1	1	H	1	1	1

Cuadro N° 35. Evaluación al primer mes de la siembra de *O. cultratum* Lindl., en los medios estándares y caseros.- M1= Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio MS, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 = Medio de plátano, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, H = Presencia de hongos, B= Presencia de bacterias.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	M1 - Medio Knudson modificado	10	46,55
	M2 - Medio de coco	9	23,00
	M3 - Medio Knudson	9	23,00
	M4 - Medio MS	8	23,00
	M5 - Medio Phytamax	10	41,90
	M6 - Medio de piña	10	31,95
	M7 - Medio de plátano	9	38,11
	Total	65	

**Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	18,476
gl	6
Sig. asintót.	0,004

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 36. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios de cultivo estándares y caseros.

Se observa en el Cuadro N° 36 que, la significancia asintótica, es menor que el valor de  $\alpha = 5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que al final del primer mes está presentando un desempeño distinto en el crecimiento de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl (1589)										Frecuencias		Probabilidades	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	1	2
Repetición														
M1	2	2	1	3	2	3	2	3	1	1	3	4	0,3	0,4
M2	1	1	1	H	1	1	1	1	1	1	9	0	0,9	0
M3	1	1	1	1	1	B	1	1	1	1	9	0	0,9	0
M4	1	H	1	1	1	1	H	1	1	1	8	0	0,8	0
M5	2	2	1	3	2	1	3	3	1	1	4	3	0,4	0,3
M6	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1	7	2	0,7	0,2
M7	3	3	2	3	1	1	H	1	1	1	5	1	0,5	0,1

MEDIO	DESEMPEÑO
M1	0,4
M5	0,3
M6	0,2
M7	0,1
M2	0,0
M3	0,0
M4	0,0
<b>Total general</b>	<b>1</b>

Cuadro N° 37. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer mes de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 37, muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, donde se observa que, el medio M1 (Knudson modificado), es el medio que tuvo mejor resultado, debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,4) de tener el estadio de crecimiento de tipo 2 (semilla germinando) durante el primer mes de la siembra, siendo el mejor tratamiento para el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl. Se observa que, la contaminación durante el primer mes de la siembra, es de 5 tubos contaminados, 4 de los cuales presentaron hongos y 1 tubo presentó bacterias, dando el 7 % de contaminación del total de tubos sembrados.

#### 5.2.8 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl. (1589)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M1	4	5	1	5	4	5	5	6	1	1
M2	1	1	1	H	1	1	1	1	1	1
M3	1	1	1	1	1	B	3	1	1	1
M4	1	H	2	1	1	1	H	2	1	1
M5	4	4	1	5	4	1	6	5	1	1
M6	6	4	1	5	1	1	2	1	1	1
M7	6	6	5	6	1	1	H	2	1	1

Cuadro N° 38. Evaluación al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios estándares y caseros.- M1 = Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio MS, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 =

Medio de plátano, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote, 6 = Protocormo con primeras hojas, H = Presencia de hongos, B = Presencia de bacterias.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	M1 - Medio Knudson modificado	10	44,75
	M2 - Medio de coco	9	20,50
	M3 - Medio Knudson	9	23,22
	M4 - Medio MS	8	26,00
	M5 - Medio Phytamax	10	39,95
	M6 - Medio de piña	10	33,10
	M7 - Medio de plátano	9	40,61
	Total	65	

**Estadísticos de contraste <sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	18,476
gl	6
Sig. asintót.	0,004

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 39. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios de cultivo estándares y caseros.

El Cuadro N° 39 evidencia que, la significancia asintótica, es menor que el valor de  $\alpha=5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que al final del primer trimestre está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl (1589)										Frecuencias					Probabilidades				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
M1	4	5	1	5	4	5	5	6	1	1	3	0	0	2	4	0,3	0	0	0,2	0,4
M2	1	1	1	H	1	1	1	1	1	1	9	0	0	0	0	0,9	0	0	0	0
M3	1	1	1	1	1	B	3	1	1	1	8	0	1	0	0	0,8	0	0,1	0	0
M4	1	H	2	1	1	1	H	2	1	1	6	2	0	0	0	0,6	0,2	0	0	0
M5	4	4	1	5	4	1	6	5	1	1	4	0	0	3	2	0,4	0	0	0,3	0,2
M6	6	4	1	5	1	1	2	1	1	1	6	1	0	1	1	0,6	0,1	0	0,1	0,1
M7	6	6	5	6	1	1	H	2	1	1	4	1	0	0	1	0,4	0,1	0	0	0,1

MEDIO	DESEMPEÑO
M1	0,6
M5	0,5
M6	0,2
M7	0,1
M2	0,0
M3	0,0
M4	0,0
<b>Total general</b>	<b>1,4</b>

Cuadro N° 40. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 40, muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, en el cual se observa que, el medio M1 (Knudson modificado), se mantiene como el medio que tuvo mejor resultado, debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,6) de tener los estadíos de crecimiento de tipo 4 (protocormo con rizoides en formación) y de tipo 5 (protocormo con inicio de brote) durante el primer trimestre de la siembra; siendo el mejor tratamiento para el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl. Se observa que, en cuanto a la contaminación, no hubo un incremento, manteniendo el 7% de contaminación del total de tubos sembrados.

5.2.9 Evaluación de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl. (1589)									
Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M1	6	8	1	7	6	7	7	8	1	1
M2	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1
M3	1	1	1	1	1	-	5	1	1	1
M4	1	-	2	1	1	1	-	1	1	1
M5	7	6	1	7	6	1	8	7	1	1
M6	8	6	1	7	1	1	3	1	1	1
M7	7	8	7	8	1	1	-	4	1	1

Cuadro N° 41. Evaluación al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios estándares y caseros.- M1 = Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio MS, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 = Medio de plátano, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote, 6 = Protocormo con primeras hojas, 7 = Protocormo con hojas y primera raíz, 8 = Plántula lista para su trasplante, (-) = tubos contaminados retirados.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	M1 - Medio Knudson modificado	10	44,90
	M2 - Medio de coco	9	21,00
	M3 - Medio Knudson	9	23,67
	M4 - Medio MS	8	23,63
	M5 - Medio Phytamax	10	40,75
	M6 - Medio de piña	10	33,45
	M7 - Medio de plátano	9	40,33
	Total	65	

**Estadísticos de contraste <sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	19,838
gl	6
Sig. asintót.	0,003

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 42. Test de Kruskal-Wallis al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios de cultivo estándares y caseros.

A través del Cuadro N° 42, se puede observar que, la significancia asintótica, es menor que el valor de  $\alpha = 5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que, al final del primer semestre, está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl (1589)										Frecuencias								Probabilidades							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
M1	6	8	1	7	6	7	7	8	1	1	3	0	0	0	0	2	3	2	0,3	0	0	0	0	0,2	0,3	0,2
M2	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0,9	0	0	0	0	0	0	0
M3	1	1	1	1	1	-	5	1	1	1	8	0	0	0	1	0	0	0	0,8	0	0	0	0,1	0	0	0
M4	1	-	2	1	1	1	-	1	1	1	7	1	0	0	0	0	0	0	0,7	0,1	0	0	0	0	0	0
M5	7	6	1	7	6	1	8	7	1	1	4	0	0	0	0	2	3	1	0,4	0	0	0	0	0,2	0,3	0,1
M6	8	6	1	7	1	1	3	1	1	1	6	0	1	0	0	1	1	1	0,6	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1
M7	7	8	7	8	1	1	-	4	1	1	4	0	0	1	0	0	2	2	0,4	0	0	0,1	0	0	0,2	0,2

MEDIO	DESEMPEÑO
M1	0,7
M5	0,6
M7	0,4
M6	0,3
M2	0,0
M3	0,0
M4	0,0
<b>Total general</b>	<b>2</b>

Cuadro N° 43. Desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 43, muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, donde se observa que, el medio M1 (Knudson modificado), es el medio que tuvo mejor resultado al finalizar el primer semestre, debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,7) de tener los estadios de crecimiento de tipo 6 (protocormo con primeras hojas), de tipo 7 (protocormo con hojas y primera raíz) y de tipo 8 (plántula lista para su trasplante) durante el primer semestre de la siembra; siendo de esta manera, el mejor tratamiento para el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl. En cuanto a la contaminación, ésta se mantuvo en el 7% del total de tubos sembrados, los mismos que fueron retirados del cultivo.

***O. cultratum* Lindl.**

MEDIOS ESTÁNDARES Y CASEROS	MES 1	MES 3	MES 6
	Rango promedio	Rango promedio	Rango promedio
M1 - Medio Knudson modificado	46,55	90,10	133,85
M2 - Medio de coco	23,00	43,00	63,50
M3 - Medio Knudson	23,00	46,39	70,31
M4 - Medio MS	23,00	49,06	72,19
M5 - Medio Phytamax	41,90	81,90	122,38
M6 - Medio de piña	31,95	64,90	98,22
M7 - Medio de plátano	38,11	76,83	115,96

Cuadro N° 44. Desempeño de los medios estándares y caseros a través de los rangos promedio del Test de Kruskal Wallis en *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 44 muestra la recopilación de los rangos promedio realizados por la prueba de Kruskal-Wallis, el cual, demuestra el desempeño que han tenido los medios de cultivo estándares y caseros, al cabo de 6 meses de efectuado el experimento.

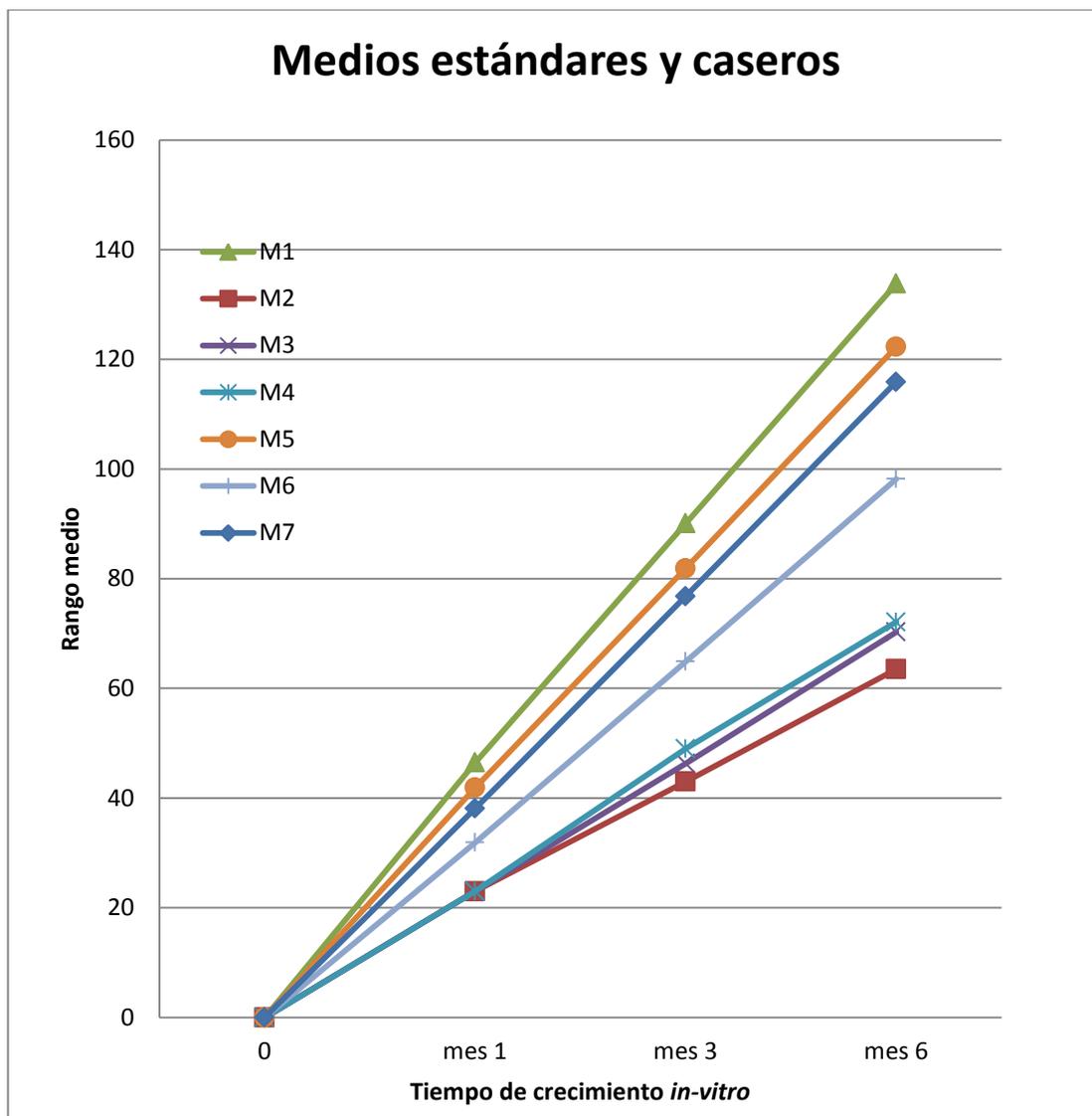


Grafico N° 24. Histograma de desempeño de los medios de cultivo estándares y caseros en *O. cultratum* Lindl, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis.- M1 = Medio Knudson modificado, M2 = Medio de coco, M3 = Medio Knudson, M4 = Medio MS, M5 = Medio Phytamax, M6 = Medio de piña, M7 = Medio de plátano.

El Gráfico N° 24, presenta los resultados obtenidos de la evaluación estadística (Test de Kruskal-Wallis) de los tratamientos estándares y caseros en *O. cultratum* Lindl, desde su siembra hasta el sexto mes de realizado todo el experimento. Se puede observar que, el medio M1 (Knudson modificado) es el tratamiento que mejor puntúa, manteniendo un rango medio por encima de 130; lo que indica que, es el mejor tratamiento para el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl.

5.2.10 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer mes de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl. (1589)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Repetición										
MM1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
MM2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
MM3	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1
MM4	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
MM5	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
MM6	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2

Cuadro N° 45. Evaluación al primer mes de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios modificados.- MM1 = Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	MM1 - Medio MS con harina de plátano	10	26,00
	MM2 - Medio MS con agua de coco	10	20,00
	MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	10	23,00
	MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	10	41,00
	MM5 - Medio Knudson con agua de coco	10	38,00
	MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	10	35,00
	Total	60	

**Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>**

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	16,488
gl	5
Sig. asintót.	0,006

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 46. Test de Kruskal-Wallis al primer mes de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios de cultivo modificados.

El Cuadro N° 46 indica que, la significancia asintótica es menor que el valor de  $\alpha=5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que al final del primer mes está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl (1589)										Frecuencias		Probabilidades	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	1	2
MM1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	7	3	0,7	0,3
MM2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	9	1	0,9	0,1
MM3	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	8	2	0,8	0,2
MM4	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	8	0,2	0,8
MM5	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	3	7	0,3	0,7
MM6	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	4	6	0,4	0,6

MEDIO	DESEMPEÑO
MM4	0,8
MM5	0,7
MM6	0,6
MM1	0,3
MM3	0,2
MM2	0,1
<b>Total general</b>	<b>2,7</b>

Cuadro N° 47. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer mes de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 47, muestra el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, en el que, se observa que el medio MM4 (Knudson con harina de plátano), es el medio que tuvo mejor resultado al finalizar el primer mes; debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,8) de tener el estadio de crecimiento de tipo 2 (semilla germinando), siendo el mejor tratamiento en el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl. En cuanto a la contaminación, ésta no presentó ningún tubo con presencia de hongos ni bacterias, obteniendo el 0% de contaminación del total de tubos sembrados del cultivo.

5.2.11 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl. (1589)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Repetición										
MM1	3	1	1	1	1	3	1	1	3	1
MM2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
MM3	1	1	1	3	1	1	1	2	3	1
MM4	4	5	4	1	4	3	4	1	3	3
MM5	4	1	4	5	1	3	5	1	4	3
MM6	4	4	1	2	4	1	1	5	1	4

Cuadro N° 48. Evaluación al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios modificados.- MM1 = Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión engrosado rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	MM1 - Medio MS con harina de plátano	10	23,55
	MM2 - Medio MS con agua de coco	10	18,85
	MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	10	22,90
	MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	10	41,55
	MM5 - Medio Knudson con agua de coco	10	39,95
	MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	10	36,20
	Total	60	

Estadísticos de contraste <sup>a,b</sup>

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	19,051
gl	5
Sig. asintót.	0,002

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 49. Test de Kruskal-Wallis al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios de cultivo modificados.

El Cuadro N° 49, puede indicar que, la significancia asintótica, es menor que el valor de  $\alpha = 5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que, al final del primer trimestre está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl (1589)										Frecuencias					Probabilidades				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
MM1	3	1	1	1	1	3	1	1	3	1	7	0	3	0	0	0,7	0	0,3	0	0
MM2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	9	0	1	0	0	0,9	0	0,1	0	0
MM3	1	1	1	3	1	1	1	2	3	1	7	1	2	0	0	0,7	0,1	0,2	0	0
MM4	4	5	4	1	4	3	4	1	3	3	2	0	3	4	1	0,2	0	0,3	0,4	0,1
MM5	4	1	4	5	1	3	5	1	4	3	3	0	2	3	2	0,3	0	0,2	0,3	0,2
MM6	4	4	1	2	4	1	1	5	1	4	4	1	0	4	1	0,4	0,1	0	0,4	0,1

MEDIO	DESEMPEÑO
MM4	0,5
MM6	0,5
MM5	0,5
MM2	0,0
MM1	0,0
MM3	0,0
<b>Total general</b>	<b>1,5</b>

Cuadro N° 50. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer trimestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 50 muestra, según el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis, que el medio MM4 (Knudson con harina de plátano) junto con MM6 (Knudson con harina de plátano) y MM5 (Knudson con agua de coco) son los medios que, tuvieron mejores resultados al finalizar el primer trimestre; debido a que presentaron una mayor probabilidad (0,5) de tener los estadíos de crecimiento de tipo 3 (embrión engrosado rompiendo la testa), de tipo 4 (protocormo con rizoides en formación) y de tipo 5 (protocormo con inicio de brote). En cuanto a la contaminación, ésta se mantuvo constante, es decir, ningún tubo con presencia de hongos ni bacterias, dando el 0% de contaminación en el cultivo.

#### 5.2.12 Evaluación de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl. (1589)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Repetición										
MM1	3	1	1	1	1	4	1	1	3	1
MM2	1	1	1	3	1	1	1	1	2	1
MM3	1	1	1	4	1	1	1	3	4	1
MM4	6	7	5	1	6	5	5	1	4	5
MM5	6	1	5	7	1	5	7	1	6	5
MM6	7	6	1	4	8	1	1	8	1	6

Cuadro N° 51. Evaluación al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios modificados.- MM1 = Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco, 1 = Semilla con embrión viable sin crecimiento, 2 = Semilla germinando, 3 = Embrión rompiendo la testa, 4 = Protocormo con rizoides en formación, 5 = Protocormo con inicio de brote, 6 = Protocormo con primeras hojas, 7 = Protocormo con hojas y primera raíz, 8 = Plántula lista para su trasplante.

	MEDIOS DE CULTIVO	N	Rango promedio
OBSERVACIÓN	MM1 - Medio MS con harina de plátano	10	22,00
	MM2 - Medio MS con agua de coco	10	19,45
	MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	10	22,45
	MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	10	41,05
	MM5 - Medio Knudson con agua de coco	10	39,90
	MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	10	38,15
	Total	60	

**Estadísticos de contraste** <sup>a,b</sup>

	OBSERVACIÓN
Chi-cuadrado	19,757
gl	5
Sig. asintót.	0,001

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Medios de cultivo

Cuadro N° 52. Test de Kruskal-Wallis al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl, en los medios de cultivo modificados.

El Cuadro N° 52, indica que, la significancia asintótica, es menor que el valor de  $\alpha=5\%$ , por tanto, se rechaza la hipótesis  $H_0$  de la prueba de Kruskal-Wallis; en conclusión, existe al menos un medio de cultivo que, al final del primer semestre está presentando un desempeño diferente en el crecimiento de *O. cultratum* Lindl.

Medios de cultivo	<i>Oncidium cultratum</i> Lindl (1589)										Frecuencias								Probabilidades							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
MM1	3	1	1	1	1	4	1	1	3	1	7	0	2	1	0	0	0	0	0,7	0	0,2	0,1	0	0	0	0
MM2	1	1	1	3	1	1	1	1	2	1	8	1	1	0	0	0	0	0	0,8	0,1	0,1	0	0	0	0	0
MM3	1	1	1	4	1	1	1	3	4	1	7	0	1	2	0	0	0	0	0,7	0	0,1	0,2	0	0	0	0
MM4	6	8	7	1	7	5	8	1	4	5	2	0	0	1	2	1	2	2	0,2	0	0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
MM5	6	1	5	7	1	5	7	1	6	5	3	0	0	0	3	2	2	0	0,3	0	0	0	0,3	0,2	0,2	0
MM6	7	6	1	4	7	1	1	8	1	5	4	0	0	1	1	1	2	1	0,4	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1

MEDIO	DESEMPEÑO
MM4	0,5
MM6	0,4
MM5	0,4
MM2	0,0
MM1	0,0
MM3	0,0
<b>Total general</b>	<b>1,3</b>

Cuadro N° 53. Desempeño de los medios de cultivo modificados al primer semestre de la siembra de *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 53 muestra, según el análisis a posteriori de la prueba de Kruskal-Wallis que, el medio MM4 (Knudson con harina de plátano) fue el tratamiento que tuvo mejor resultado al finalizar el primer semestre; debido a que, presentó una mayor probabilidad (0,5) de tener los estadios de crecimiento de tipo 6 (protocormo con primeras hojas), de tipo 7 (protocormo con hojas y primera raíz) y de tipo 8 (plántula lista para su trasplante), siendo, de esta manera, el mejor tratamiento en el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl. Además, se puede observar en cuanto a la contaminación, no hubo presencia de hongos ni bacterias, dando el 0% de contaminación en el cultivo.

***O. cultratum* Lindl.**

<i>MEDIOS MODIFICADOS</i>	<i>MES 1</i>	<i>MES 3</i>	<i>MES 6</i>
	<i>Rangos promedio</i>	<i>Rangos promedio</i>	<i>Rangos promedio</i>
MM1 - Medio MS con harina de plátano	26,00	50,10	72,42
MM2 - Medio MS con agua de coco	20,00	38,70	58,40
MM3 - Medio MS con harina de plátano y agua de coco	23,00	46,75	70,08
MM4 - Medio Knudson con harina de plátano	41,00	81,73	122,23
MM5 - Medio Knudson con agua de coco	38,00	76,40	114,82
MM6 - Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco	35,00	69,33	105,05

Cuadro N° 54. Desempeño de los medios modificados a través de los rangos promedio del Test de Kruskal Wallis en *O. cultratum* Lindl.

El Cuadro N° 54 muestra la recopilación de los rangos medios realizados por la prueba de Kruskal-Wallis, en la cual, demuestra el desempeño que han tenido los medios de cultivo modificados en *O. cultratum* Lindl, al cabo de 6 meses de efectuado el experimento.

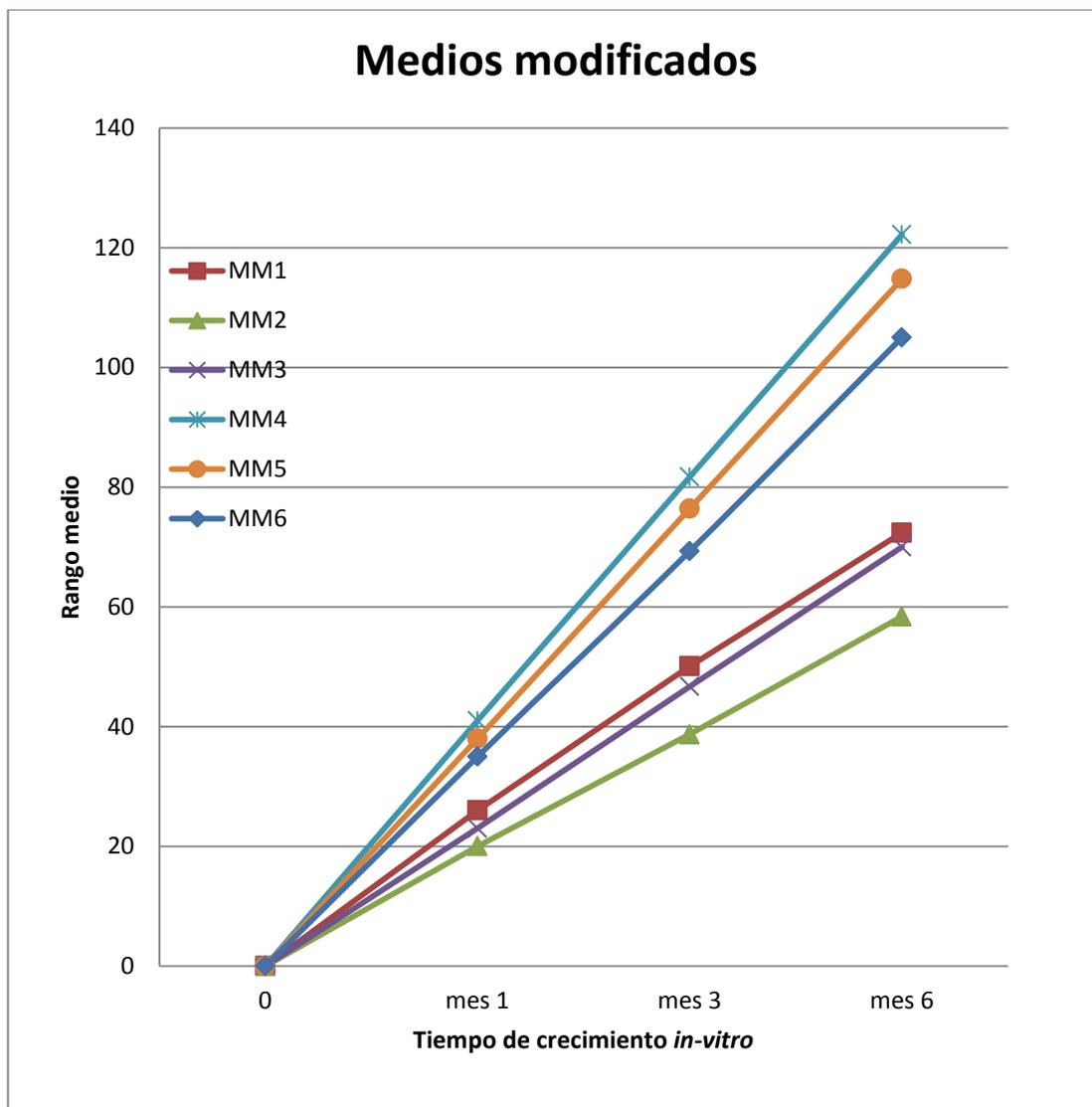


Grafico N° 25. Histograma de desempeño de los medios de cultivo modificados en *O. cultratum* Lindl, en función de los rangos promedio del Test de Kruskal-Wallis.- MM1= Medio MS con harina de plátano, MM2 = Medio MS con agua de coco, MM3 = Medio MS con harina de plátano y agua de coco, MM4 = Medio Knudson con harina de plátano, MM5 = Medio Knudson con agua de coco, MM6 = Medio Knudson con harina de plátano y agua de coco.

El Gráfico N° 25, presenta los resultados obtenidos en la evaluación estadística (Test de Kruskal-Wallis) de los tratamientos modificados en *O. cultratum* Lindl, desde su siembra hasta el sexto mes de realizado todo el experimento. Se puede observar que, el medio MM4 (Knudson con harina de plátano) es el medio que mejor puntúa, manteniendo un rango promedio por encima de 120, lo que indica que, es el mejor tratamiento para el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl.

### 5.2.13 Discusión

En la presente investigación, en los ensayos realizados a la especie *E. schistochilum* Schltr., se obtuvo mejores resultados con los medios Phytamax y Murashige y Skoog más el aditivo de plátano. En una investigación similar, reportada por (Potisek y Sarmiento, 1994), obtuvo buenos resultados con el uso del medio Murashige y Skoog con hormonas en *E. stamfordianum* Batem; en donde, la generación de protocormo más primordio de hojas, apareció a los 57 días después de la siembra; sin embargo, en el presente estudio, la creación de protocormo más primeras hojas en *E. schistochilum* Schltr, se dio a los 90 días después de la siembra. Este retraso pudo deberse a que, la cantidad de semilla sembrada en los tubos fue aglomerada, ocasionando una competencia por espacio y nutrientes.

Otros resultados similares, son los que enuncia (Pedroza, 2009) en el uso del medio Murashige y Skoog, adicionando carbón activado a una concentración del (0,5-1 %) con 0,5 mg de AIA (Acido Indolacético), en la que, se obtiene efectos positivos en el desarrollo de protocormos de *E. elongatum* Jacq., a partir de una cápsula madura y obtención posterior de plántulas, en un período de 210 días. En esta investigación, se obtuvo plántulas de *E. schistochilum* Schltr, en un período de 180 días; reflejando un lapso de tiempo menor al comparado por (Pedroza, 2009).

Los ensayos realizados para *O. cultratum* Lindl, muestran que, se obtuvo buenos resultados con Medio Knudson modificado y Knudson más el aditivo de plátano para esta especie. (Flores y otros., 2008), reportan mejores resultados utilizando Murashige y Skoog, suplementado con 100 ml/litro de agua de coco, 40 g/litro de extractos de manzana, plátano y jitomate; 2.0 g/litro de peptona y 200 mg/litro de (PVP) en *O. stramineum* Lindl, dando resultados aceptables de germinación a los 13 días de su siembra. Para el caso de *O. cultratum* Lindl., en los medios Knudson modificado y Knudson más plátano, se obtuvo datos de germinación a los 30 días de realizada su siembra, alcanzando resultados satisfactorios.

En investigaciones realizadas por (Flachsland y otros, 1996), ensayando diversos medios de cultivos para inducir el crecimiento *in-vitro* de 41 especies de orquídeas, han indicado, según estos ensayos que, el agregado de extracto de plátano y de carbón activado a los medios de cultivo sólidos, es beneficioso para la mayoría de las especies. Tras la experiencia efectuada en este estudio, se coincide que, el

implemento de extracto de plátano en el medio de cultivo Knudson, obtuvo buenos resultados en el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl.

Si bien, la técnica *in-vitro* tiende a asegurar condiciones de asepsia, ésta es una característica difícil de mantener controlada en lo que concierne a la contaminación en el cultivo. (Valenzuela, 1998), señala por ejemplo que, la frecuencia de ocurrencia de cada fuente de contaminación, varía entre laboratorios y cambia con las variaciones de estación, clima, personal, procedimientos y asepsia, entre otros. En este sentido, la contaminación del cultivo, resulta importante en la medida en que la presencia de contaminación en un medio, conduce a una disminución en la calidad del material vegetal, así como su posible muerte. De acuerdo a (Merchán, 2011), el porcentaje permisible máximo de contaminación en un cultivo *in-vitro* de meristemas y otros explantes de orquídeas, es del 5-10%. Bajo esta condición, los porcentajes de contaminación obtenidos en este estudio, fueron del 1% y 5% en el cultivo de *E. schistochilum* Schltr, y del 7% en el cultivo de *O. cultratum* Lindl; colocándose dentro del rango permisible.

### 5.3 Comportamiento de las plántulas en la fase de aclimatación

#### 5.3.1 Aclimatación de *E. schistochilum* Schltr

Total:54 plántulas trasplantadas	<i>Epidendrum schistochilum</i> Schltr. dentro del propagador				Fuera del propagador
Variables Tiempo	Semana 1 (8 días)	Semana 2 (15días)	Semana 3 (30días)	Semana 4 (45días)	Semana 5 (60días)
% Plántulas saludables	94	77	87	93	93
% Plántulas con estrés	2	13	6,5	7	7
% Plántulas Muertas	4	10	6,5	-	-

Cuadro N° 55. Comportamiento de *E. schistochilum* Schltr en el propagador y al medio externo

El Cuadro N° 55 muestra un total de 54 plántulas trasplantadas, de las cuales, al finalizar la primera semana de observación, se tiene un 94% de plántulas saludables (51 plántulas), un 2% con estrés (1 plántula) y un 4% murieron (2 plántulas). Luego, al finalizar la segunda semana de observación, se tiene que, de un total de 52 plántulas vivas, el 77% (40 plántulas) se encontraron saludables, un 13% (7 plántulas) mostraron estrés y un 10% (5 plántulas) murieron.

En la tercera semana, se observa que, de un total de 47 plántulas vivas, el 87% (41 plántulas) estuvieron saludables, y un 6,5% (3 plántulas) mostraron estrés, al igual que muerte en ambos casos. En la cuarta semana de observación, de un total de 44 plántulas vivas, el 93% se mantuvieron saludables (41 plántulas), así como el 6,5% (3 plántulas) presentaron estrés.

Al mantener constantes los resultados entre la tercera y cuarta semana de observación, y al no existir cambios en el comportamiento de las plántulas, éstas fueron sacadas al medio externo, donde, en la quinta semana de observación,

tampoco existieron cambios en el comportamiento; indicando por tanto, que las plántulas se aclimataron y siguieron su normal desarrollo.

Considerando un porcentaje, tomando en cuenta el total de las plantas que fueron trasplantadas con las que perduraron vivas al final de las observaciones, se tiene un valor del 81,5% (44 plántulas) que lograron aclimatarse.

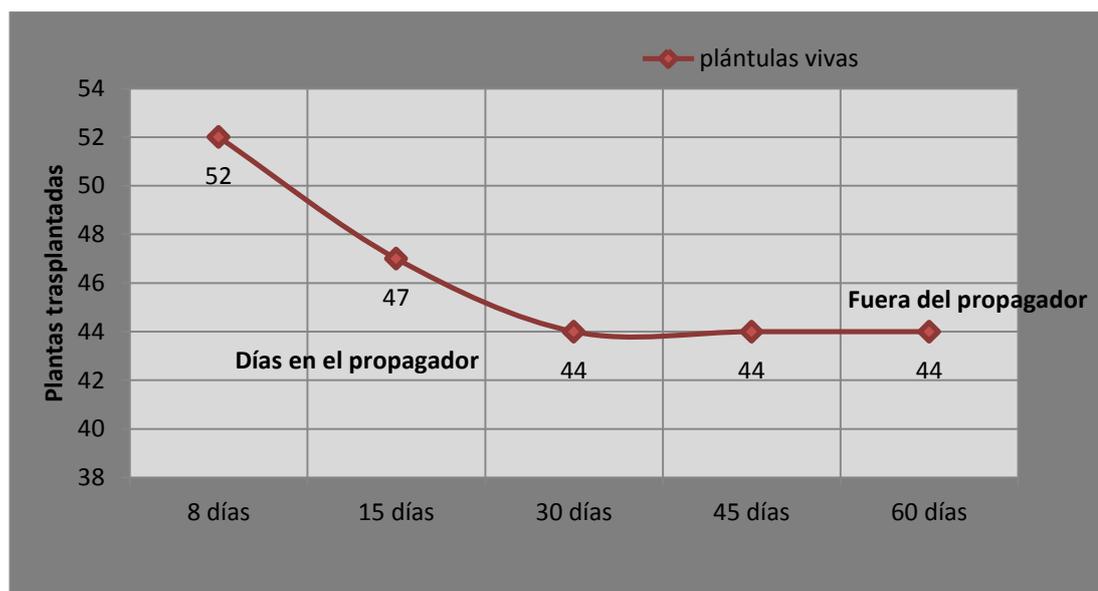


Gráfico N° 26. Tiempo de adaptación de las plántulas de *E. schistochilum* Schltr. en el propagador y al medio externo.

A través del Gráfico N° 26, se puede observar el número total de plantas que fueron trasplantadas al principio, y el desarrollo que tuvieron en el transcurso del tiempo. Se puede apreciar que, las plántulas mantienen un estado constante después del día 30 hasta el día 45 en el propagador. Después del día 45, las plántulas se mantienen en el mismo estado en el medio externo, sin mostrar cambios hasta el final de su evaluación en el día 60; lo que determina el tiempo en que las plántulas de esta especie se adaptaron en el propagador y en el medio externo como evidencia el Gráfico N° 27.

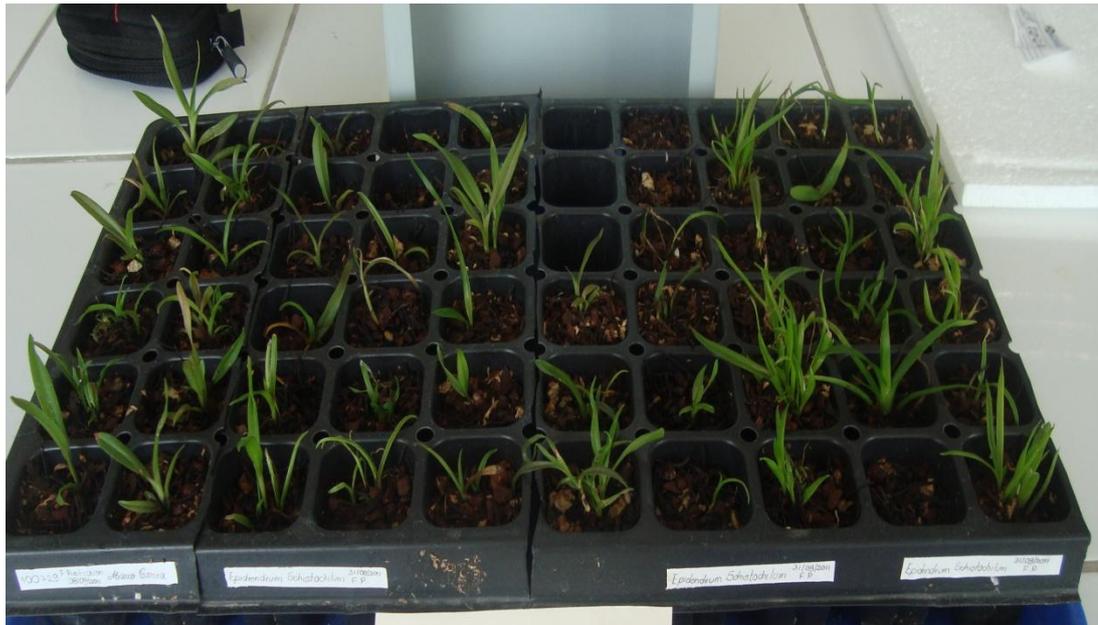


Gráfico N° 27. Plántulas de *E. schistochilum* Schltr al medio externo

### 5.3.2 Aclimatación de *O. cultratum* Lindl

Variables Tiempo	<i>O. cultratum</i> Lindl dentro del propagador			Fuera del propagador	
	Semana 1 (8 días)	Semana 2 (15 días)	Semana 3 (30 días)	Semana 4 (45 días)	Semana 5 (60 días)
Saludable	80	64	91	91	91
Estrés	13	14	9	9	9
Muerte	7	22	-	-	-

Cuadro N° 56. Comportamiento de *O. cultratum* Lindl en el propagador y al medio externo.

En el Cuadro N° 56, se observa un total de 15 plántulas trasplantadas, de las cuales, transcurrida la primera semana de observación, un 80% de plántulas estuvieron saludables (12 plántulas), un 13% con estrés (2 plántulas) y un 7% murieron (1 plántula). Luego, al finalizar la segunda semana de observación, se tiene que, de un total de 14 plántulas vivas, el 64% (9 plántulas) se encontraron saludables, un 2% (14 plántulas) mostraron estrés y un 22% (3 plántulas) perecieron.

En la tercera semana, se observa un total de 11 plántulas vivas, de las cuales el 91% (10 plántulas) estuvieron saludables y, apenas un 9% (1 plántula) mostró estrés. En la cuarta semana de observación, las plántulas al no presentar cambios y manteniendo los mismos resultados de la tercera semana de observación, éstas fueron sacadas al medio externo, donde, en la cuarta y quinta semana de observación tampoco hubo cambios en el comportamiento; indicando de esta manera que las plántulas se aclimataron favorablemente.

Para considerar un porcentaje, se tomó en cuenta el total de las plantas que fueron trasplantadas con las que permanecieron vivas al final de las observaciones, obteniéndose un valor del 73,3% (11 plántulas) que lograron aclimatarse.

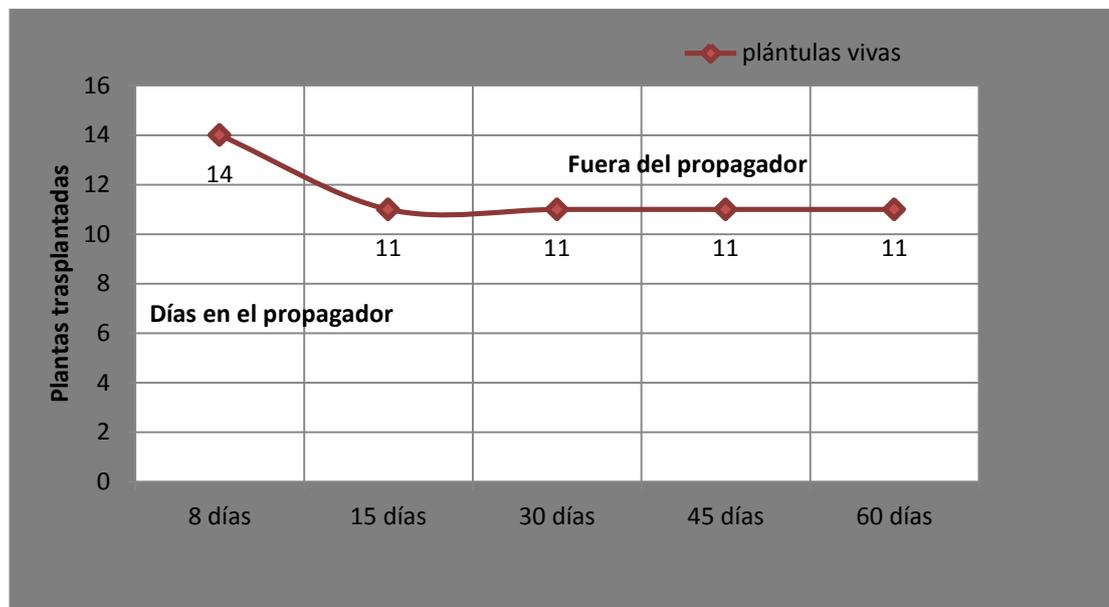


Gráfico N° 28. Tiempo de adaptación de las plántulas de *O. cultratum* Lindl en el propagador y al medio externo

El Gráfico N° 28, muestra que, las plántulas de *O. cultratum* Lindl, tienden a adaptarse a partir del día 15 hasta el día treinta en el propagador. Después del día 30, las plántulas se mantienen en el mismo estado en el medio externo, sin mostrar cambios, hasta el final de su evaluación en el día 60; lo que determina el tiempo de adaptación de las plántulas de esta especie en el propagador y en el medio externo, como se evidencia en el Gráfico N° 29.



Gráfico N° 29. Plántulas de *O. cultratum* Lindl al medio externo

### 5.3.3 Comparación en la adaptación entre *E. schistochilum* Schltr y *O. cultratum* Lindl durante la aclimatación

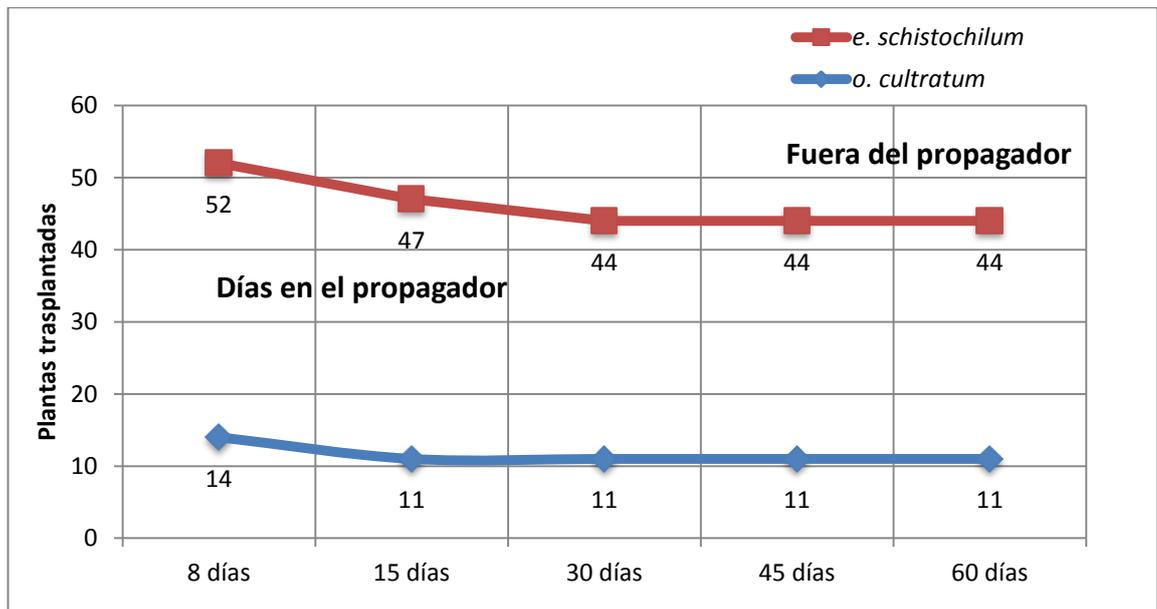


Gráfico N° 30. Comparación de la adaptación de las especies dentro y fuera del propagador

En el Gráfico N° 30, se puede observar el estado de las dos especies, tanto dentro como fuera del propagador, y se observa que, la especie *O. cultratum* Lindl, empieza a adaptarse después del día 15 en el propagador, a diferencia de *E. schistochilum* Schltr, que llega a adaptarse a partir del día 30 en el propagador; lo que determina

que, la especie *O. cultratum* Lindl, se puede adaptar en un lapso de tiempo menor en el propagador en comparación a la especie *E. schistochilum* Schltr.

#### 5.3.4 Discusión

En el presente estudio, se obtiene que, las plántulas aclimatadas mostraron un porcentaje del 81,5% en *E. schistochilum* Schltr, utilizando como sustrato musgo *Sphagnum* más corteza de pino fina hasta 45 días en el propagador y del 73,3% en *O. cultratum* Lindl, con el sustrato musgo *Sphagnum* más fibra de coco y piedra volcánica, hasta el día 30 en el propagador. En un estudio similar, ensayos hechos por (Nava y otros, 2011), obtuvo un 47% de supervivencia en la aclimatación de plántulas germinadas *in-vitro* de *Laelia eyermaniana* Rchb, utilizando como sustrato fibra de palma soyate en un lapso de 60 días de exposición en un ambiente controlado de invernadero. (Heredia y otros, 2005), por ejemplo, reportan plántulas vivas (80.22%) de *Laelia halbingeriana*, empleando como sustrato turba-tepetzil, aclimatadas a los 240 días en invernadero. En esta investigación, los sustratos sugeridos en la literatura por (Portilla, 2007), demostraron ser aptos y adecuados para las dos especies, lo que indica que, los mejores sustratos en este caso son: musgo *Sphagnum* más corteza de pino fina para *E. schistochilum* Schltr, y musgo *Sphagnum* más fibra de coco y piedra volcánica para *O. cultratum* Lindl. En lo concerniente al tiempo de mantenimiento en el propagador, para los géneros *Epidendrum* y *Oncidium*, se determinó que, necesitan menor tiempo de aclimatación que las descritas para el género *Laelia* reportados por (Nava, 2011) y (Heredia y otros, 2005).

## **5.4 Protocolo para el cultivo *in-vitro* de *Epidendrum schistochilum* Schltr**

### *5.4.1 Manejo del material genético*

#### *5.4.1.1 Obtención de las semillas a partir de cápsula madura*

Materiales:

Tubos de ensayo, bisturí estéril, papel aluminio, pinzas de laboratorio, embudos, mechero, etiquetas.

Procedimiento:

- Identificar las cápsulas maduras, a través de su cambio de color de verde a una tonalidad amarilla o café.
- Abrir las cápsulas maduras, con la ayuda de un bisturí estéril para la extracción de las semillas; y depositarlas en papel aluminio, donde cualquier residuo, material extraño o fragmentos externos o internos de la cápsula (pelos), deben ser removidos cuidadosamente con el uso de una pinza estéril.
- Transferir las semillas, con la ayuda del embudo a los tubos de ensayo rotulados sin tapar al desecador de vidrio para su secado.

#### *5.4.1.2 Identificación de la calidad de las semillas*

Materiales y equipos:

Porta objeto, cubre objeto, semillas de *E. schistochilum* Schltr, microscopio.

Procedimiento:

- Colocar una delgada capa de semillas en el portaobjeto, tapar con el cubreobjetos y llevar al microscopio.
- Observar la presencia o ausencia de embrión con el menor lente (4x), para determinar la calidad de semillas que se tiene.

#### 5.4.1.3 *Secado y almacenamiento al vacío*

Materiales y Equipos:

Tubos de ensayo con semillas, jeringuilla, tapa hermética, sílica gel, desecador de vidrio, estufa y medidor de temperatura y humedad relativa.

Procedimiento:

- Introducir previamente la sílica gel en el desecador de vidrio.
- Llevar el desecador a la estufa a 70 °C por treinta minutos.
- Retirar de la estufa el desecador, colocar los tubos de ensayo con las semillas en el desecador por 4 días a temperatura ambiente (20 °C) hasta obtener un contenido de humedad en las semillas del (5-6%).
- Sacar los tubos con semillas del desecador, cerrarlos con tapa hermética y extraer el aire contenido en los tubos, empleando una aguja y una jeringuilla para su conservación a largo plazo.

#### 5.4.1.4 *Desinfección*

Materiales y reactivos:

Papel filtro, grapadora pequeña, cronómetro, pinzas estériles, vasos de precipitación de 120 ml, agua estéril, hipoclorito de sodio al 3%, alcohol al 70% y al 90%.

Procedimiento:

- Emplear las semillas almacenadas en los tubos de ensayo, colocar una capa delgada de semillas en el centro del papel filtro de 2 cm cuadrados de tamaño.
- Doblar al papel en forma de sobre, grapar para asegurar que las semillas queden al lado opuesto de la grapa.
- Rotular el sobre con un lápiz el código asignado o nombre de la especie.
- Sumergir el sobre en hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, luego por alcohol al 70% por dos minutos y finalmente, someter el sobre a tres enjuagues de agua estéril de 1 minuto cada uno.

- Llevar el sobre a una caja Petri estéril para su siembra en la cámara de flujo laminar.

#### 5.4.2 Medios de cultivo

##### 5.4.2.1 *Preparación de los medios óptimos*

###### Materiales:

Paletas de plástico, recipientes plásticos para pesaje de los reactivos, vasos de precipitación de 800 ml y 100 ml, embudos, papel aluminio, plástico para embalaje (rollo-pack), pipetas de 10 ml y 0.2 ml, pipeteadores, probetas, tubos de ensayo, frascos para medio de cultivo de 600 ml, guantes, imanes, rejillas y etiquetas.

###### Reactivos:

Para una cantidad de 1000 ml de medio Phytamax se requiere:

27.3 g de sales de Phytamax, 20 g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.4.

Para una cantidad de 1000 ml de medio Murashige y Skoog más harina de plátano se requiere:

4.4 g de sales de Murashige y Skoog, 2 g de Phytigel, 20 g de sucrosa, 25 g de harina de plátano, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

###### Equipos:

Balanza analítica, agitador magnético, pH-metro, microondas, autoclave.

###### Procedimiento:

- Pesar los componentes.
- Incorporar los componentes y el agua destilada con la sacarosa disuelta en el vaso de precipitación para 1000 ml.

- Adicionar el aditivo complejo (harina de plátano).
- Medir y ajustar el pH (si es necesario).
- Llevar la solución a ebullición.
- Apagar el calentador.
- Adicionar el agar (Phytigel) y mezclar hasta su disolución completa.
- Verter el medio en los tubos de ensayo.
- Llevar los medios a la autoclave por 15 minutos a una presión de 15 PSI para su esterilización.
- Luego de la esterilización, colocar los tubos en posición pico de flauta para su siembra.

#### 5.4.2.2 *Siembra in-vitro*

##### Materiales:

Tubos de ensayo con medio de cultivo, bisturíes estériles, cajas Petri de vidrio pírex, pinzas, servilletas estériles, papel aluminio, plástico para embalaje (rollo-pack), atomizadores para agua y alcohol, bandejas plásticas para el traslado de medios y materiales, cofia, mascarilla, sobre con las semillas estériles.

##### Equipos:

Estufa, cámara de flujo laminar, cámara de crecimiento, cronómetro.

##### Procedimiento:

- Llevar todos los materiales de metal y las servilletas envueltas en papel aluminio a esterilizar en la estufa a 70°C un día antes de la siembra; los materiales de vidrio se deben esterilizar preferentemente en el autoclave junto con los medios de cultivo.
- Esterilizar la cámara de flujo laminar (previamente encendido por 20 minutos más alcohol al 90% en la base de área de trabajo y costados).
- Lavar las manos y antebrazos con jabón líquido y agua, aplicar alcohol al 90% en manos, antebrazos y codos para garantizar la desinfección en el usuario.

- Sembrar las semillas en la cámara de flujo laminar utilizando el método del sobre, que consiste en cortar el sobre que contiene las semillas con pinzas y tijeras estériles.
- Dejar reposar el paquete que contiene las semillas sobre servilletas estériles o en la caja Petri estéril.
- Flamear los medios y bisturí estéril e incorporar las semillas en el bisturí.
- Introducir el bisturí cargado de semillas en los tubos con medios de cultivo.
- Flamear la boquilla de cada tubo después de la siembra, tapar los tubos con doble capa de papel aluminio y sellar con plástico para embalaje (rollo-pack).
- Trasladarlos a la cámara de crecimiento (para su crecimiento) a una temperatura de  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , a 2000 lux por 14 horas diarias.

#### 5.4.3 Aclimatación

Materiales y reactivos:

Sustrato a base de musgo *Sphagnum* más corteza de pino, tubos con plántulas, pinzas y bisturíes estériles, regla para medición, mini brocha estéril, vaso de precipitación, mascarilla, cofia, bandeja de plástico para siembra (almácigo), recipientes de vidrio, atomizadores, alcohol al 96%, fungicida Carbenpac, agua estéril y solución fertilizante.

Equipos:

Autoclave, cámara de aclimatación (propagador).

Procedimiento:

- Colocar el sustrato en el recipiente de vidrio y llevar a esterilización en la autoclave junto con los materiales de vidrio y metálicos por 30 minutos a 15 PSI de presión.
- Realizar la medición del tamaño de las plántulas (3 a 5 cm de alto).
- Tomar las plántulas de los frascos, adicionar 2 ml de agua estéril para suavizar el medio y con la ayuda de las pinzas, extraer las plántulas con cuidado y depositarlas en un recipiente de vidrio con agua estéril.

- Retirar el sustrato estéril de la autoclave, humedecerlo con agua estéril e incorporarlo en el almácigo desinfectado con alcohol.
- Atomizar las plántulas una vez sembradas con solución fungicida Carbenpac a una concentración de 0.5 ml /l de agua.
- Llevar al propagador, controlando sus condiciones de humedad relativa (50-75%), luz artificial continúa (2000 lux/14 horas), temperatura (20-25 °C) y ventilación constante de 2300 rpm/ 14 horas para generar aireación.
- Rociar agua en el sustrato 3 veces por semana.
- Mantener en el propagador hasta el día 45, luego sacar las plántulas al medio externo y continuar suministrando agua al sustrato 3 veces por semana.
- Suplementar con una solución fertilizante orgánica a base de extracto de algas marinas en el sustrato, para el crecimiento, mantenimiento y resistencia a plagas y enfermedades a una dosis de 1 ml/l de agua, cada 15 días, combinada con un bioregulador concentrado a base de citoquinina 0,001% a una dosis de 0,5 ml/l de agua cada 15 días para promover su floración.
- Mantener las plántulas a las mismas condiciones de humedad relativa, y temperatura que estuvieron en el propagador y a una luz indirecta en el medio externo.

## **5.5 Protocolo para el cultivo *in-vitro* de *Oncidium cultratum* Lindl.**

### *5.5.1 Manejo del material genético*

#### *5.5.1.1 Obtención de las semillas a partir de cápsula madura*

Materiales:

Tubos de ensayo, bisturí estéril, papel aluminio, pinzas de laboratorio, embudos, mechero, etiquetas.

Procedimiento:

- Identificar las cápsulas maduras, a través de su cambio de color de verde a una tonalidad amarilla o café.
- Abrir las cápsulas maduras, con la ayuda de un bisturí estéril para la extracción de las semillas; y depositarlas en papel aluminio, donde cualquier residuo, material extraño o fragmentos externos o internos de la cápsula (pelos), deben ser removidos cuidadosamente con el uso de una pinza estéril.
- Transferir las semillas, con la ayuda del embudo a los tubos de ensayo rotulados sin tapar al desecador de vidrio para su secado.

#### *5.5.1.2 Identificación de la calidad de las semillas*

Materiales y equipos:

Porta objeto, cubre objeto, semillas de *E. schistochilum* Schltr, microscopio.

Procedimiento:

- Colocar una delgada capa de semillas en el portaobjeto, tapar con el cubreobjetos y llevar al microscopio.
- Observar la presencia o ausencia de embrión con el menor lente (4x), para determinar la calidad de semillas que se tiene.

### 5.5.1.3 *Secado y almacenamiento al vacío*

#### Materiales y Equipos:

Tubos de ensayo con semillas, jeringuilla, tapa hermética, sílica gel, desecador de vidrio, estufa y medidor de temperatura y humedad relativa.

#### Procedimiento:

- Introducir previamente la sílica gel en el desecador de vidrio.
- Llevar el desecador a la estufa a 70 °C por treinta minutos.
- Retirar de la estufa el desecador, colocar los tubos de ensayo con las semillas en el desecador por 4 días a temperatura ambiente (20 °C) hasta obtener un contenido de humedad en las semillas del (5-6%).
- Sacar los tubos con semillas del desecador, cerrarlos con tapa hermética y extraer el aire contenido en los tubos, empleando una aguja y una jeringuilla para su conservación a largo plazo.

### 5.5.1.4 *Desinfección de semillas a partir de cápsula madura*

#### Materiales y Reactivos:

Papel filtro, grapadora pequeña, cronometro, pinzas estériles, vasos de precipitación de 120 ml, agua estéril, hipoclorito de sodio al 3%, Alcohol 70% y 90%.

#### Procedimiento:

- Emplear las semillas almacenadas de los tubos de ensayo, colocar una capa delgada de semillas en el centro del papel filtro de 2 cm cuadrados de tamaño.
- Doblar al papel en forma de sobre y engrapar asegurando que las semillas queden al lado opuesto de la grapa.
- Rotular el sobre con un lápiz el código asignado o nombre de la especie.
- Sumergir el sobre en hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, luego por alcohol al 70 % por dos minutos y finalmente por tres enjuagues de agua estéril de 1 minuto cada uno.

- Llevar el sobre en una caja petri estéril para su siembra en la cámara de flujo laminar.

#### 5.5.1.5 *Desinfección de semillas a partir de cápsula (verde) no madura*

Materiales y reactivos:

Papel filtro, grapadora pequeña, cronómetro, pinzas estériles, vasos de precipitación de 120 ml, agua estéril, hipoclorito de sodio al 3%, alcohol al 70% y al 90%.

Procedimiento:

- Emplear las semillas almacenadas en los tubos de ensayo, colocar una capa delgada de semillas en el centro del papel filtro de 2 cm cuadrados de tamaño.
- Doblar al papel en forma de sobre, grapar para asegurar que las semillas queden al lado opuesto de la grapa.
- Rotular el sobre con un lápiz el código asignado o nombre de la especie.
- Sumergir el sobre en hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, luego por alcohol al 70% por dos minutos y finalmente, someter el sobre a tres enjuagues de agua estéril de 1 minuto cada uno.
- Llevar el sobre a una caja Petri estéril para su siembra en la cámara de flujo laminar.

#### 5.5.2 Medios de cultivo

##### 5.5.2.1 *Preparación de los medios óptimos*

Materiales:

Paletas de plástico, recipientes plásticos para pesaje de los reactivos, vasos de precipitación de 800 ml y 100 ml, embudos, papel aluminio, plástico para embalaje (rollo-pack), pipetas de 10 ml y 0.2 ml, pipeteadores, probetas, tubos de ensayo, frascos para medio de cultivo de 600 ml, guantes, imanes, rejillas, etiquetas.

Reactivos:

Para una cantidad de 1000 ml de medio Knudson modificado se requiere:

500 mg de Nitrato de amonio, 500 mg de Sulfato de amonio, 347.2 mg de Nitrato de calcio, 25 mg de Sulfato ferroso 7H<sub>2</sub>O, 122.12 mg de Sulfato de magnesio, 5.68 mg de Sulfato de manganeso H<sub>2</sub>O, 250 mg de Fosfato de potasio monobásico, 20 g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 4.8.

Para una cantidad de 1000 ml de medio Knudson más harina de plátano se requiere:

25 g de harina de plátano, 500 mg de Sulfato de amonio, 0.056 mg de ácido bórico, 694.4 mg de Nitrato de calcio, 0.0624 mg de Sulfato cúprico 5H<sub>2</sub>O, 25 mg de Sulfato ferroso 7H<sub>2</sub>O, 122.12 mg de Sulfato de magnesio, 5.68 mg de Sulfato de manganeso H<sub>2</sub>O, 0.016 mg de Trióxido de molibdeno, 250 mg de Fosfato de potasio monobásico, 0.033 mg de Sulfato de zinc 7H<sub>2</sub>O, 20 g de sucrosa, 2 g de Phytigel, 5 ml de ácido Nicotínico, 5 ml de Piridoxina, 1 ml de Tiamina, 20 ml de Glicina, 10 ml de Mioinositol, agua destilada (c.s.p. 1000 ml); pH: 5.2 - 5.8.

Equipos:

Balanza analítica, agitador magnético, pH-metro, microondas, autoclave.

Procedimiento:

- Pesar los componentes.
- Incorporar los componentes y el agua destilada con la sacarosa disuelta en el vaso de precipitación para 1000 ml.
- Adicionar de aditivo complejo (harina de plátano).
- Medir y ajustar el pH (si es necesario).
- Llevar la solución a ebullición.
- Apagar el calentador.
- Adicionar el agar (Phytigel) y mezclar hasta su disolución completa.
- Verter el medio en los tubos de ensayo.

- Llevar a la autoclave por 15 minutos a una presión de 15 PSI de presión para esterilización.
- Luego de la esterilización colocar los tubos en posición pico de flauta para su siembra.

#### 5.5.2.2 *Siembra in-vitro*

##### Materiales:

Tubos de ensayo con medio de cultivo, bisturíes estériles, cajas Petri de vidrio pírex, pinzas, servilletas estériles, papel aluminio, plástico para embalaje (rollo-pack), atomizadores para agua y alcohol, bandejas plásticas para el traslado de medios y materiales, cofia, mascarilla, sobre con las semillas estériles.

##### Equipos:

Estufa, cámara de flujo laminar, cámara de crecimiento, cronómetro.

##### Procedimiento:

- Llevar todos los materiales de metal y las servilletas envueltas en papel aluminio a esterilizar en la estufa a 70°C un día antes de la siembra; los materiales de vidrio se deben esterilizar preferentemente en la autoclave junto con los medios de cultivo.
- Esterilizar la cámara de flujo laminar (previamente encendido por 20 minutos más alcohol al 90% en la base de área de trabajo y costados).
- Lavar las manos y antebrazos con jabón líquido y agua, aplicar alcohol al 90% en manos, antebrazos y codos para garantizar la desinfección en el usuario.
- Sembrar las semillas en la cámara de flujo laminar utilizando el método del sobre, que consiste en cortar el sobre que contiene las semillas con pinzas y tijeras estériles.
- Dejar reposar el paquete que contiene las semillas sobre servilletas estériles o en la caja Petri estéril.
- Flamear los medios y bisturí estéril e incorporar las semillas en el bisturí.
- Introducir el bisturí cargado de semillas en los tubos con medios de cultivo.

- Flamear la boquilla de cada tubo después de la siembra, tapar los tubos con doble capa de papel aluminio y sellar con plástico para embalaje (rollo-pack).
- Trasladarlos a la cámara de crecimiento (para su crecimiento) a una temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a 2000 lux por 14 horas diarias.

Procedimiento para semillas a partir de cápsula verde (no madura).

- Llevar todos los materiales de metal, más las servilletas envueltas en papel aluminio a esterilizar en la estufa a  $70^{\circ}\text{C}$  un día antes de la siembra, los materiales de vidrio esterilizar preferentemente en la autoclave junto con los medios de cultivo.
- Esterilizar la cámara de flujo laminar (previamente encendido por 20 minutos más alcohol al 90% en la base de área de trabajo y costados).
- Lavar las manos y antebrazos con jabón líquido y agua, aplicar alcohol al 90% en manos, antebrazos y codos para garantizar la desinfección en el usuario.
- Sembrar las semillas en la cámara de flujo laminar utilizando el método de la cápsula verde que consiste en colocar la cápsula desinfectada en una caja Petri y cortar longitudinalmente la cápsula con la ayuda de un bisturí estéril.
- Incorporar las semillas en un nuevo bisturí estéril.
- Introducir el bisturí cargado de semillas en los tubos con medios de cultivo.
- Flamear la boquilla de cada tubo después de la siembra, tapar los tubos con doble capa de papel aluminio y sellar con plástico para embalaje (rollo-pack).
- Trasladarlos a la cámara de crecimiento (para su crecimiento) a una temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a 2000 lux por 14 horas diarias.

### 5.5.3 Aclimatación

Materiales y Reactivos:

Sustrato a base de musgo *Sphagnum* más fibra de coco más piedra volcánica, tubos con plántulas, pinzas y bisturís estériles, regla para medición, mini brocha estéril, vaso de precipitación, mascarilla, cofia, bandeja de plástico para siembra (almácigo), recipientes de vidrio, atomizadores, alcohol al 96 %, fungicida Carbenpac, agua estéril, solución fertilizante.

Equipos:

Autoclave, cámara de aclimatación (propagador)

Procedimiento:

- Colocar el sustrato en el recipiente de vidrio y llevar a esterilización en la autoclave junto con los materiales de vidrio y metálicos por 30 minutos a 15 PSI de presión.
- Realizar la medición del tamaño de las plántulas (3 a 5 cm de alto).
- Tomar las plántulas de los frascos, adicionar 2 ml de agua estéril para suavizar el medio y con la ayuda de las pinzas, extraer las plántulas con cuidado y depositarlas en un recipiente de vidrio con agua estéril.
- Retirar el sustrato estéril de la autoclave, humedecerlo con agua estéril e incorporarlo en el almácigo desinfectado con alcohol.
- Atomizar las plántulas una vez sembradas con solución fungicida Carbenpac a una concentración de 0.5 ml /l de agua.
- Llevar al propagador controlando sus condiciones de humedad relativa (70%), luz artificial continua (2000 lux/14 horas), temperatura (15-20 °C) y ventilación constante de 2300 rpm/ 14 horas para proporcionar aireación.
- Irrigar agua en el sustrato 3 veces por semana.
- Mantener en el propagador hasta el día 30 de su trasplante, luego sacar las plántulas al medio externo y continuar suministrando agua al sustrato 3 veces por semana.
- Suplementar para su mantenimiento en el sustrato una solución fertilizante orgánico a base de extracto de algas marinas para el crecimiento, resistencia a plagas y enfermedades a una dosis de 1 ml/l de agua cada 15 días y combinada con un bioregulador concentrado a base de cytokinina 0,001% a una dosis de 0,5 ml/l de agua cada 15 días para promover su floración.
- Mantener las plántulas a las mismas condiciones de humedad relativa, y temperatura que estuvieron en el propagador y a una luz indirecta en el medio externo.

## 6 CONCLUSIONES

- Se colectaron 8 plantas pertenecientes a la especie *Epidendrum schistochilum* Schltr, con un número de 9 cápsulas maduras; y 3 plantas pertenecientes a la especie *Oncidium cultratum* Lindl, con un número de 5 cápsulas maduras. Su reconocimiento, a través del microscopio con lente de menor aumento, pudo determinar la calidad de las semillas, evidenciando la presencia de embriones en ambas especies. Por otro lado, se logró diferenciar el tamaño de las semillas, siendo de 2 mm de longitud y 0,3 mm de diámetro en *E. schistochilum* Schltr; y de 0,5 mm de longitud y 0,16 mm de diámetro en *O. cultratum* Lindl.
- La técnica de secado, empleando sílica gel, es conveniente para las semillas maduras de *E. schistochilum* Schltr, en un lapso de 4 días en el desecador a temperatura ambiente, obteniéndose un contenido de humedad ideal del 5-6%; sin embargo, para las semillas maduras de *O. cultratum* Lindl, se determina que, el uso de este desecante se realice en un lapso menor a los 4 días en el desecador, para obtener un contenido de humedad ideal del 5-6%, evitando de esta manera, secar excesivamente las semillas.
- Al utilizar la técnica de tratamiento hermético y al vacío parcial, en el almacenamiento de semillas, éstas lograron adaptarse positivamente, ya que, a través de esta técnica, se pudo mantener el contenido de humedad, permaneciendo así, libres de agentes infecciosos, logrando conservarse exentas de contaminación y consiguiendo semillas de buena calidad.
- Se establece a los medios: Murashige y Skoog suplementado con harina de plátano y al Phytamax como los más aptos, donde tuvo una mejor respuesta *Epidendrum schistochilum* Schltr, en el crecimiento *in-vitro*.
- Se determina a los medios: Knudson modificado y Knudson suplementado con harina de plátano como los más eficientes en el crecimiento *in-vitro* de *O. cultratum* Lindl.

- Se establece que, las plántulas de *E. schistochilum* Schltr, pueden adaptarse positivamente en el sustrato compuesto de musgo *Sphagnum* más corteza de pino fina, a una temperatura de 20-25 °C, humedad relativa del 50-75%, luz artificial continúa de 2000 lux/14 horas, con ventilación moderada y constante hasta el día 45 en el propagador; y aclimatarse, posteriormente al medio externo con normalidad.
- Se determina que, las plántulas de *O. cultratum* Lindl, logran adaptarse positivamente en el sustrato compuesto de musgo *Sphagnum* más fibra de coco y piedra volcánica, con luz artificial continua de 2000 lux/14 horas, a una temperatura de 15-20 °C y humedad relativa del 70%; con ventilación moderada y constante hasta el día 30 en el propagador; y aclimatarse, posteriormente al medio externo con normalidad.
- Aplicando la técnica de cultivo *in-vitro*, se pueden obtener plántulas de *E. schistochilum* Schltr, en un lapso de 8 meses y de *O. cultratum* Lindl., en un tiempo de 7 meses; de esta manera, se puede lograr una conservación de las especies así como su comercialización.
- Se lograron desarrollar los protocolos para el cultivo *in-vitro* de las especies *Epidendrum schistochilum* Schltr y *Oncidium cultratum* Lindl, que incluye la colección de plantas con cápsulas hasta la aclimatación.

## 7 RECOMENDACIONES

- Al emplear sílica gel en el tratamiento de secado de las semillas, se recomienda no almacenar las mismas por tiempos prolongados, puesto que, la sílica gel, puede secar de manera excesiva las semillas y reducir su capacidad de germinación; por tanto, se recomienda emplear otros tipos de desecantes; un buen sustituto puede ser, por ejemplo, el arroz seco.
- Se recomienda utilizar los medios Knudson más coco y Knudson más harina plátano más agua de coco en *O. cultratum* Lindl; y Knudson más agua de coco, Murashige más agua de coco y harina de plátano en *E. schistochilum* Schltr, ya que, se lograron resultados acordes en el crecimiento *in-vitro* de las especies estudiadas.
- Se recomienda realizar ensayos de siembra *in-vitro*, a partir de cápsula verde o inmadura de *O. cultratum* Lindl., ya que, representa una alternativa aceptable para germinación de sus semillas.
- Se sugiere efectuar, después de la siembra, subcultivos o repiques de las siembras hechas, puesto que, si la cantidad de semilla sembrada se encuentra en exceso, la competencia por espacio y nutrientes causará un retraso en el desarrollo de las plántulas.
- Después de sacar las plántulas del propagador, se recomienda mantener las condiciones de humedad relativa y temperatura, así como también, proporcionar luz indirecta para su buen mantenimiento.
- Para el desarrollo de las plántulas en el medio externo, se aconseja atomizarlas con un fertilizante cada 15 días, para inducir eficazmente su enraizamiento y promover su floración; y rociarlas 2 veces por semana en el sustrato.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

AGC., 2010. **Orchidaceae family**. Angiosperm phylogeny website.

Consulta: 02/04/2011. Disponible en línea:  
<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>

Ackerman, J y M. Castillo., 1992. **The Orchids of Puerto Rico and the Virgin**

**Islands**. Universidad de Puerto Rico. Editorial UPR. 1º Edición. Puerto Rico.

Andrade, L., 2008. **Bella especie de exportación**. Diario Hoy. Consulta: 20/02/2012.

Disponible en línea: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/bella-especie-de-exportacion-323792.html>

Arditti, J y R. Ernst., 1993. **Micropropagation of Orchids**. John Wiley & Sons,

New York.

Arditti, J., 1984 **Orchid Biology: Reviews and Perspectives III**. Cornell.

University Press. Ithaca.

Arditti, J., 1984. **An history of orchid hybridization, seed germination, and**

**tissue culture**. Botanical Journal of the Linnean Society of London. London.

Arena, M. y G. Martínez., 1997. **El Cultivo *in vitro* en la Propagación de las**

**Plantas. Conservación –BGV y Cultivo *in-vitro***. Consulta: 25/06/2010.

Disponible en línea: [www.uco.es/organiza/servicios/jardín/conserva.htm](http://www.uco.es/organiza/servicios/jardín/conserva.htm).

Atwood, T. y D. Mora de Retana., (1999). **Flora Costaricensis Fieldiana**.

Orchidaceae: Tribe Maxillarieae: Subtribes Maxillariinae and Oncidiinae.

Barrio, M., 2005. **Protocolo y arte: Una mirada creativa**. Revista de Comunicación

y nuevas Tecnologías. Madrid. Consulta: 28/02/2012. Disponible en línea:

[http://www.icono14.net/revista/num6/articulos/articulo%20marta/Marta\\_Barrio.pdf](http://www.icono14.net/revista/num6/articulos/articulo%20marta/Marta_Barrio.pdf).

- Carrión, M., 2009. **Identificación de Orquídeas Epifitas del Ecuador mediante DNA Barcoding**. UTPL. Loja. Consulta: 13/09/2011. Disponible en línea: <http://cepra.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/529/1/Identificacion%20de%20orquideas%20epifitas%20del%20Ecuador%20mediante%20DNA%20barcoding.pdf>
- Castillo, A., 2007. **Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: Una Biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo**. Consulta: 06/06/2011. Disponible en línea: [http://inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf).
- Chávez, N y J. Rincón., 2006. **Glosario de Biotecnología**. Universidad Autónoma de Aguas calientes. 1º Edición. México.
- Cavero, M., B. Collantes y I. Patrón., 2008. **Centro de datos para la Conservación**. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Lima.
- CECON (Centro de Estudios Conservacionistas), Universidad de San Carlos de Guatemala, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León, Herbario Nacional de Costa Rica, Herbario del Museo de Historia Nacional del Salvador, Universidad de Panamá y Escuela Agrícola Panamericana., 2008. **Protocolo de Manejo de Colecciones de plantas Vasculares Proyecto Desarrollando Capacidades Compartiendo Tecnología para la Gestión de la Biodiversidad en Centroamérica**. Consulta: 08/03/2012. Disponible en línea: [www.inbio.ac.cr/web\\_herbarios/web/pdf/protocolo-vasculares.pdf](http://www.inbio.ac.cr/web_herbarios/web/pdf/protocolo-vasculares.pdf)
- Cerna, M y Valdano, T., 2009. **Cultivo *in vitro* de *Scoporia dulcis* L. (*Scrophulariaceae*)**. La Granja. Vol. 9(1).
- Colque, T., D. Rodríguez., A. Mujica., A. Canahua., V. Apaza y E. Jacobsen., 2005. **Producción de Biol Abono Líquido Natural y Ecológico**. Estación Experimental ILLPA. Puno. Consulta: 29/10/2011. Disponible en línea: <http://quinoa.life.ku.dk/~media/Quinoa/docs/pdf/Outreach/ManualBiolfinal.ashx>

- Curtis, H., S. Barnes, A. Schnek., y A. Massarini., 2008. **Biología**. Editorial Médica Panamericana. Séptima edición. Madrid.
- Díaz, I., 2011. **Biología de la conservación de *Orchidaceae***. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. Consulta: 25/10/2011. Disponible en línea: [http://bios.biologia.umich.mx/files/Biologia de la Conservación de Orchidaceae%20Irene\\_Avila.pdf](http://bios.biologia.umich.mx/files/Biologia%20de%20la%20Conservaci%20n%20de%20Orchidaceae%20Irene_Avila.pdf).
- Dodson, C., 2003. **Native Ecuadorian ORCHIDS**. Publisher Dodson Trust. Soluciones gráficas. D &G Cia. Ltda. Volumen II y IV. Editorial Colina. Imprenta Mariscal. Quito.
- Endara, L y S. León-Yáñez., 2007. **Patrones de Endemismo de la Flora Endémica de Orquídeas Ecuatorianas**. Second Scientific Conference an Andean Orchids.
- Esquível, A y J. Escalant., 1994. **Conceptos básicos del cultivo de tejidos Vegetales**. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba.
- Estopa, M., 2005. **El cultivo *in-vitro* en la reproducción vegetativa de plantas en vivero**. Consulta: 08/06/2011. Disponible en línea: [http://horticom.com/revistasonline/extra05/M\\_Estopa.pdf](http://horticom.com/revistasonline/extra05/M_Estopa.pdf).
- FAO, 2006. **Guía para la manipulación de semillas forestales**. Consulta: 27/10/2011. Disponible en línea: <http://www.fao.org/DOCREP/006/AD232S/ad232s09.htm>
- Flachsland, E., G. Terada; H. Rey y L. Mroginski, 1996. **Medios de cultivo para la Germinación *in-vitro* de 41 especies de orquídeas**. FACENA. Volumen 12
- Fischer, A., 2007. **Cultivo de Orquídeas**. Ediciones Grupo Imaginador. 1ra Edición. Buenos Aires.

- Flores, G., J. Legaria; I. Vásquez y M. Colinas. **Propagación *in-vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una Orquídea Amenazada y Endémica de México.** Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. Consulta: 02/12/2011. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v14n3/v14n3a17.pdf>
- Freuler, M., 2008. **Orquídeas Manual de cultivo.** Primera Edición. Editorial Albatros SACI, Volumen I. Buenos Aires.
- Gómez, G., E. Cristiani y T. Villegas., 2010. **Establecimiento de protocolos para la Propagación *in vitro* de plantas de *Acourtia cordata* (Cerv.) Turner (*Compositae*), colectadas en la Sierra de Guadalupe.** Polibotánica. ISSN 1405-2768. México. Consulta: 21/02/2012. Disponible en línea: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/621/62114250007.pdf>.
- Growzone Mallorca, 2011. **Propagadores.** Consulta: 21/01/2012. Disponible en línea: <http://growzone-mallorca.com/invernaderos/propagadores/propagador-43-invernadero-43-38x24x18cm/>.
- Heredia, A., J. Enríquez, F. Zúñiga, G. Campos y V. Velásco., 2005. **Propagación *in-vitro* y aclimatación *ex vitro* de *Laelia halbingeriana*.** Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Xoxocotlán. Oaxaca. Consulta: 20/01/2012. Disponible en línea:[http://200.23.187.31/drn/dcama/congreso\\_Ambiente/memorias/RECURSOS\\_NATURALES/RN082.doc](http://200.23.187.31/drn/dcama/congreso_Ambiente/memorias/RECURSOS_NATURALES/RN082.doc)
- Jørgensen, P.M. y S. León- Yáñez., 1999. **Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador.** Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 75. St. Louis, Missouri.
- Knudson, L., 1922. **Nonsymbiotic Germination of Orchids Seeds.** Botanical Gazette. Vol.73. No 1. University of Chicago Press. Consulta: 14/11/2011. Disponible en línea:<http://www.jstor.org/stable/2470045>

- Labculture., 2011. **Cabinas de flujo laminar Vertical y Horizontal**.  
 Consulta: 30/10/2011. Disponible en línea:  
[http://escoglobal.com/products/download/LHC\\_S\\_brochure.pdf](http://escoglobal.com/products/download/LHC_S_brochure.pdf)
- López, J., 2008. **Proyecto Banco Germoplasma de Orquídeas**. Jardín Botánico de Quito. Departamentos de Proyectos. Consulta: 23/02/2012. Disponible en línea: [http://www.jardinbotanicoquito.com/d\\_proyectos.html](http://www.jardinbotanicoquito.com/d_proyectos.html)
- Lydiane, K., 1996. **Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation**. Timber Press. London.
- Martinez, E., 2006. **Propagación clonal de Orquídeas**. Prácticas de Crecimiento y desarrollo de los vegetales. Universidad de Barcelona. Barcelona.
- Mckendrick, S., 2000. **Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas**. Foundation for Tropical Conservation Ceiba. Consulta: 02/07/2011. Disponible en línea: [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf)
- Mckinley, M., 2005. **Complete Guide to Orchids**. American Orchid Society. Editorial Ortho. 1º Edición.
- Merchán, F., 2011. **Cultivo de meristemos en Orquídeas**. Memorias III Curso Internacional de cultivo *in-vitro* y germoplasma de orquídeas. Jardín Botánico de Quito. Quito.
- Moreno, A., 2000. **Establecimiento de un Orquideario en la finca experimental “la Represa”**. Universidad técnica estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Ambientales. Consulta: 12/11/2011. Disponible en línea: [http://www.uteq.edu.ec/facultades/ambientales/proy\\_didacticos\\_productivos/2.pdf](http://www.uteq.edu.ec/facultades/ambientales/proy_didacticos_productivos/2.pdf).
- Mroginski, L y W. Roca., 1991. **Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales *in-vitro***. Publicación CIAT No 151. Cali.

- Mroginski, L., 2004. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura**. Consulta: 19/07/2011.  
 Disponible en línea:  
[http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2\\_cap2.pdf](http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap2.pdf).
- Munguía, S. y J. Ripa., 2009. **Historia de las Plantas en el Mundo Antiguo**.  
 Universidad de Deusto. Madrid.
- Murguía, J., 2007. **Producción de Orquídea, Antúrio, Gardenia y Ave del Paraíso**  
 Universidad Veracruzana. Fundación Produce. Veracruz. Consulta:  
 03/01/2012. Disponible en línea:  
<http://www.funprover.org/formatos/cursos/Manual%20de%20Produccion%20de%20Orquideas-Anturio-Gardenia-Ave%20del%20P.pdf>.
- Nava, J., A. Jiménez, A. De Jesús, M. Arenas, E. Ventura y S. Evangelista., 2011.  
**Estudio de la Morfología y Aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in-vitro***. Laboratorio de Biotecnología I.  
 Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional.  
 AP 24, Yautepec, Morelos. Consulta: 21/01/2012. Disponible en línea:  
<http://www.herbario.ench.ipn.mx/pb/esp/num32/tema6espn.htm>.
- Novoa, P., J. Espejo, M. Cisternas., E. Domínguez y M. Rubio., 2006. **Guía de campo de las orquídeas chilenas**. Consulta: 10/05/2011. Disponible en línea:  
<http://www.damianus.bmd.br/livros/%5borchidaceaebookchilenas.pdf>
- Orchidspecies., 2011. ***Epidendrum schistochilum* Schltr and *Oncidium cultratum* Lindl.** Consulta: 10/05/2011. Disponible en línea:  
<http://www.orchidspecies.com//>
- Orquideoteca., 2011. **All Orchids *in-vitro* culture**. Consulta: 10/05/2011.  
 Disponible en línea:  
<http://orquideoteca.blogspot.com/2008/07/orquideas-descripcin-y-morfologa.html>.
- Ossenbach, C., J. Arce y J. Warne, 2007. **Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un Banco de Germoplasma**. Universidad Earth, Jardín Botánico Lankester & Universidad de Costa Rica. Cartago. Consulta: 13/08/2011. Disponible en línea:

[http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivosdeusuario/Edicion/40\\_v3.104\\_OssenbachI.pdf](http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivosdeusuario/Edicion/40_v3.104_OssenbachI.pdf)

Ottolenghi, M., 1945. **Revista de la Asociación de la Escuela de Agronomía.**

Universidad Central. Quito.

Pardo, J., 2008. **Desarrollo de un medio de cultivo universal para la propagación de orquídeas en laboratorio.** Universidad de las Américas. Facultad de

Ingeniería. Consulta: 09/01/2012. Disponible en línea:

<http://dspace.udla.edu.ec/handle/123456789/488>

Pedroza, J., 2009. **Efecto del carbón activado, Acido indolacético y Bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in-vitro*.** Revista Colombiana de Biotecnología. Vol.

11. N° 1. Consulta: 07/01/2012. Disponible en línea: <http://www.revista.unal.edu.co>

Pereira, C., 2009. **Propagadores de Plantas.** Consulta: 12/11/2011. Disponible

en línea: <http://plantayflor.blogspot.com/2009/08/propagadores-de-plantas.html>

Pérez, J., 2009. **Producción de plantas.** Biblioteca virtual de derecho, economía y Ciencias sociales. Consulta: 04/11/2011. Disponible en línea:

<http://www.eumed.net/libros/2009a/483/METODOS%20DE%20ALMACENAJE.htm>.

Perla, H., 2007. **Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo *in vitro*.** Universidad de san Carlos de Guatemala. Facultad de

Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Consulta: 19/02/2012. Disponible en línea: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2617.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2617.pdf)

Pierik, R., 1987. **El Cultivo *in vitro* De Las Plantas Superiores.** Department

of Horticulture, Agricultural University. Wageningen. The Netherlands.

- Pierik, R., 1990. **Cultivo *in vitro* de las Plantas superiores**. Editorial Mundi Prensa. Madrid.
- Potisek, M., L. Puc., y M. Sarmiento., 1994. **Germinación de semillas y su Establecimiento *in-vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem**. Consulta: 15/08/2011. Disponible en línea: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0018S/A0018S35.pdf>
- Portilla, J., 2007. **Orquídeas Manual de Cultivo**. Ecuagenera. Volumen I. Cuenca.
- Rollke, F., 2006. **Orquídeas rápido y fácil, Manual para Orquídeas**. Editorial Hispano Europea.
- Rodríguez, L, A. Díaz, E. Fajardo, E. Sánchez, J. Hernández, M. Castañeira, G. de la Cruz y J. González., 2005. **Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas**. ISBN 959-250-156-4.Cuba. Consulta: 10/11/2011. Disponible en línea: [www.dama.gov.co](http://www.dama.gov.co)
- Ruíz, C., A. Laguna, A. Iglesias, A Damon, H. Marín, R. Azpíroz y M. Moreno, 2008. **Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* Schltr (*Orchidaceae*)**. ΦYTON 77. Revista internacional de Botánica experimental. Chapas. Consulta: 09/11/2011. Disponible en Línea: <http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol77/RUIZ%20BC.pdf>
- Salazar, A., 2005. **Sapos, Mariposas y Orquídeas en la Línea Equinoccial**. Editorial Trama. Volumen I. Quito.
- Sánchez, E. 2009. **Micropropagación una obligación moral**. Orquídeas de los Andes. ESS. Cuenca.
- Santos, A., 2009. **Diseño de una cámara de Flujo Laminar horizontal para la Producción de plantas *in-vitro***. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Escuela de Ingeniería Química. Riobamba. Consulta: 30/10/2011. Disponible en línea:<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/250/1/96T00117.pdf>

- Sigma-Aldrich., 2010. **Plants tissue Culture protocols**. Consulta: 12/10/2010.  
Disponibile en línea: <http://www.sigmaaldrich.com/>.
- Seaton, P. y M. Ramsay., 2009. **Cultivo de orquídeas por semilla**. Royal Botanic Gardens, KEW. London.
- Tapia, M., 2009. **Fundamentos de Producción de Cultivos: Invernaderos**. Departamento de Producción Agrícola. Área de Fitotecnia. Universidad de Chile. Consulta: 30/10/2011. Disponible en línea: [http://www.sap.uchile.cl/descargas/prod\\_cultivos/FPC\\_Invernaderos.pdf](http://www.sap.uchile.cl/descargas/prod_cultivos/FPC_Invernaderos.pdf)
- Tibbs, M., 2008. **A Practical Guide to care and cultivation Orchid**. Editions New Holland Publisners Ltd. London.
- Valencia, R., 2000. **Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador**. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Escuela de Ciencias Biológicas. Herbario QCA. Quito.
- Valenzuela, L., 1998. **Uso de Antibióticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagación *in-vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)**. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Consulta: 01/03/2012. Disponible en línea: [www.cm.colpos.mx/2010/images/tesis\\_p/.../tesis\\_evaluacion.pdf](http://www.cm.colpos.mx/2010/images/tesis_p/.../tesis_evaluacion.pdf)
- Villalobos, L., J. Flores., C. Sosa., J. Mejía., y L. Bucio., 2009. **Cultivo de plantas Ornamentales Tropicales**. Instituto para el desarrollo de sistemas de producción del trópico húmedo de Tabasco. Tabasco. Consulta: 13/01/2012. Disponible en línea: <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v30n3/ctr050309.pdf>

