

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA



UNIDAD ACADÉMICA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,  
MINAS, VETERINARIA Y ECOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

VALORACIÓN DE DOS MEDIOS DE CULTIVO CON  
ADICIÓN DE AGUA DE COCO Y TRES FOTOPERIODOS  
EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLA Y DESARROLLO  
DE PROTOCORMOS DE LA ORQUÍDEA *Cyrtochilum  
edwardii*

TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR: ROBERTO CARLOS INGA QUIZHPI

DIRECTOR: ING. JUAN CARLOS GONZÁLEZ ROJAS PhD

2015

# DECLARACIÓN

Yo, Roberto Carlos Inga Quizhpi, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

---

Roberto Carlos Inga Quizhpi

# CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Roberto Carlos Inga Quizhpi, bajo mi supervisión.

---

ING. Juan Carlos González Rojas PhD

**DIRECTOR**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación a mi familia, quienes durante estos largos años me brindaron su apoyo y confianza pero sobre todo por su amor incondicional que a pesar de la distancia siempre han estado presentes.

A Dios por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

## **AGRADECIMIENTO**

Principalmente quiero agradecer a Dios porque ha sido mi fortaleza y su casa mi refugio cuando veía que todo estaba perdido, ya que solo confiando en él estoy aquí.

A las personas más importantes a lo largo de mi carrera, mi Madre que a más de darme la vida es una mujer luchadora y perseverante que supo transmitir esas virtudes en mí.

A mi Hermana por ser como una madre y estar al pendiente todo el tiempo de mi bienestar integral y de manera especial a mis Sobrinos porque han sido mi mayor inspiración ya que como mi madre quisiera poder ser un gran ejemplo para ellos.

A mi Padre, que a pesar de encontrarse lejos en este momento me ha brindado ánimos para que nunca olvide de lo grande que puedo llegar a ser y sé que es la persona que más se alegra de mi meta alcanzada.

Gracias a mis amigos y compañeros porque desde el principio me tendieron la mano y supieron ayudarme a acoplarme al grupo a pesar de la diferencia de edades.

A la Universidad Católica de Cuenca por haberme acogido todos estos años, a mis maestros, que a muchos de ellos puedo llamarlos mis amigos, un agradecimiento infinito, porque sus conocimientos, enseñanzas y sobre todo exigencias me han llevado a ser una gran persona, estudiante y de seguro un gran profesional.

A mi director de tesis, Juan Carlos González Rojas que ha sido pilar en la construcción de este documento que es un requisito fundamental para la obtención de mi título, sus conocimientos, orientación y apoyo me permitieron terminar este trabajo.

A la Doctora Vanesa Portilla, Ingeniero Mario Portilla, por toda su colaboración, paciencia, comprensión y su sabiduría, además por facilitar sus instalaciones para realizar mi trabajo práctico.

## ÍNDICE

DECLARACIÓN .....	I
CERTIFICACIÓN .....	II
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE CUADROS.....	X
ANEXOS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
CAPÍTULO 1.....	- 1 -
MARCO INTRODUCTORIO .....	- 1 -
CAPÍTULO 2.....	- 3 -
MARCO TEÓRICO .....	- 3 -
2.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS.....	- 3 -
2.2 DISTRIBUCIÓN DE <i>Cyrtorchilum edwardii</i> .....	- 4 -
2.3 ORQUÍDEA <i>Cyrtorchilum edwardii</i> .....	- 4 -
2.3.1 TAXONOMÍA .....	- 4 -
2.3.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS .....	- 4 -
2.3.2.1 Raíz.....	- 4 -
2.3.2.2 Tallo.....	- 5 -
2.3.2.3 Hojas .....	- 5 -
2.3.2.4 Flores .....	- 6 -

2.3.2.5	Inflorescencia.....	- 7 -
2.3.2.6	Fruto .....	- 7 -
2.3.2.7	Semillas.....	- 8 -
2.4	MEDIOS DE CULTIVO.....	- 9 -
2.4.1	COMPONENTES BÁSICOS DE UN MEDIO DE CULTIVO .....	- 10 -
2.4.1.1	Nutrientes minerales .....	- 10 -
2.4.1.1.1	Macroelementos .....	- 10 -
2.4.1.1.1.1	Nitrógeno (N) .....	- 11 -
2.4.1.1.1.2	Fósforo (P) .....	- 11 -
2.4.1.1.1.3	Potasio (K) .....	- 11 -
2.4.1.1.1.4	Calcio (Ca) .....	- 11 -
2.4.1.1.1.5	Magnesio (Mg) .....	- 11 -
2.4.1.1.1.6	Azufre (S) .....	- 12 -
2.4.1.1.2	Microelementos.....	- 12 -
2.4.1.2	Carbono .....	- 12 -
2.4.1.3	Vitaminas .....	- 12 -
2.4.1.3.1	Tiamina.....	- 12 -
2.4.1.4	Sustancias reguladoras de crecimiento .....	- 13 -
2.4.1.4.1	Auxinas.....	- 13 -
2.4.1.4.2	Citoquininas o citocinas.....	- 13 -
2.4.1.5	Agente gelificante .....	- 13 -
2.4.1.5.1	Agar Agar .....	- 14 -
2.4.1.6	Otros componentes .....	- 14 -
2.4.1.6.1	Agua de Coco ( <i>cocos nucifera</i> ).....	- 14 -
2.4.2	Medio Murashige Skoog.....	- 16 -
2.4.3	Medios caseros.....	- 17 -
2.4.3.1	Medio de cultivo con Plátano .....	- 17 -
2.4.3.2	Medio de cultivo de Manzana .....	- 19 -
2.5	FOTOPERIODO .....	- 21 -
2.6	CULTIVO IN VITRO.....	- 21 -
2.7	CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE).....	- 22 -
CAPÍTULO 3.....		- 24 -
METODOLOGÍA .....		- 24 -
3.1	MATERIALES.....	- 24 -
3.1.1	FÍSICOS.....	- 24 -
3.1.2	QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS.....	- 25 -

3.2	DESARROLLO .....	- 25 -
3.2.1	Ubicación:.....	- 25 -
3.2.2	Características del laboratorio .....	- 26 -
3.2.3	Tipo de investigación .....	- 26 -
3.2.4	Factores en estudio .....	- 27 -
3.2.5	Tratamientos:.....	- 27 -
3.2.6	Análisis estadístico .....	- 28 -
3.3	PROCEDIMIENTO: .....	- 28 -
3.3.1	Preparación del medio de cultivo. ....	- 28 -
3.3.2	Adecuación de la cámara de flujo laminar .....	- 29 -
3.3.3	Obtención y desinfección de la semilla .....	- 30 -
3.3.4	Siembra.....	- 31 -
3.3.5	Etiquetado .....	- 31 -
3.3.6	Incubación .....	- 32 -
	CAPÍTULO 4.....	- 34 -
	RESULTADOS .....	- 34 -
4.1	GERMINACIÓN DE SEMILLA.....	- 34 -
4.2	FORMACIÓN DE PROTOCORMOS .....	- 48 -
	CAPÍTULO 5.....	- 54 -
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	- 54 -
5.1	CONCLUSIONES.....	- 54 -
5.2	RECOMENDACIONES.....	- 56 -
	BIBLIOGRAFÍA .....	- 57 -
	ANEXOS.....	- 64 -
	ANEXO A: Registro fotográfico.....	- 64 -

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Raíz de <i>Cyrtochilum edwardii</i> .....	- 5 -
Fig. 2. Tallo de <i>Cyrtochilum edwardii</i> .....	- 6 -
Fig. 3. Hojas de <i>Cyrtochilum edwardii</i> .....	- 6 -
Fig. 4. Flores de <i>Cyrtochilum edwardii</i> .....	- 7 -
Fig. 5. Inflorescencia de <i>Cyrtochilum edwardii</i> .....	- 8 -
Fig. 6. Fruto de <i>Cyrtochilum edwardii</i> .....	- 8 -
Fig. 7. Semilla de <i>Cyrtochilum edwardii</i> .....	- 9 -
Fig. 8. Agua de coco.....	- 16 -
Fig. 9. Pesado de materiales (Plátano).....	- 18 -
Fig. 10. Frascos con el medio a base de plátano.....	- 19 -
Fig. 11. Materia prima para medio (Manzana).....	- 20 -
Fig. 12. Envasado de medio de cultivo.....	- 21 -
Fig. 13. Plano del laboratorio.....	- 26 -
Fig. 14. Distribución aleatoria de las botellas.....	- 27 -
Fig. 15. Preparación del medio.....	- 29 -
Fig. 16. Cámara de flujo laminar.....	- 30 -
Fig. 17. Esterilización mediante flameado de capsula previo a la siembra.....	- 31 -
Fig. 18. Preparación de frascos y siembra.....	- 32 -
Fig. 19. Etiquetado.....	- 32 -
Fig. 20. Incubación.....	- 33 -
Fig. 21. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la cuarta semana.....	- 36 -
Fig. 22. Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en porcentaje de germinación a la cuarta semana.....	- 36 -
Fig. 23. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la quinta semana.....	- 38 -
Fig. 24. Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en porcentajes de germinación a la quinta semana.....	- 38 -
Fig. 25. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación la sexta semana.....	- 40 -
Fig. 26. Prueba de Duncan al 5% para medios de cultivo a la sexta semana de germinación.....	- 40 -
Fig. 27. Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodo en porcentajes de germinación a la sexta semana.....	- 41 -
Fig. 28. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la séptima semana.....	- 42 -
Fig. 29. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la octava semana.....	- 44 -
Fig. 30. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la décima semana.....	- 47 -

Fig. 31. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentajes de formación de protocormos a la semana 17.....	- 49 -
Fig. 32. Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en porcentajes de formación de protocormos. ....	- 50 -
Fig. 33. Prueba de Duncan al 5% en porcentaje de formación de protocormos en tratamientos a la semana 18.....	- 51 -
Fig. 34. Prueba de Duncan al 5% en fotoperiodos para la formación de protocormos a la semana 18 .....	- 51 -
Fig. 35. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en la formación de protocormos a la semana 19. ....	- 53 -
Fig. 36. Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en la formación de protocormos a la semana 19. ....	- 53 -

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Cyrtochilum</i> . .....	- 4 -
Cuadro 2. Componentes del agua de coco. ....	- 15 -
Cuadro 3. Composición de Murashige Skoog por litro. ....	- 17 -
Cuadro 4. Fórmula de plátano. ....	- 18 -
Cuadro 5. Composición del plátano por cada 100 g. ....	- 18 -
Cuadro 6. Fórmula de manzana. ....	- 19 -
Cuadro 7. Contenido nutricional en 100 g. ....	- 20 -
Cuadro 8. Conjunto de materiales de laboratorio. ....	- 24 -
Cuadro 9. Químicos y biológicos. ....	- 25 -
Cuadro 10. Ubicación geográfica del ensayo. ....	- 25 -
Cuadro 11. Simbología de los medios y fotoperiodos. ....	- 27 -
Cuadro 12. Nomenclatura de los tratamientos. ....	- 28 -
Cuadro 13. Tratamientos y factores en estudio. ....	- 33 -
Cuadro 14. Porcentaje de germinación a la tercera semana (transformación a $\sqrt{x+0.5}$ ). ....	- 34 -
Cuadro 15. Análisis de varianza de porcentaje de germinación a la tercera semana. ....	- 35 -
Cuadro 16. Porcentaje de germinación a la cuarta semana. ....	- 35 -
Cuadro 17. Análisis de varianza de porcentaje de germinación a la cuarta semana. ....	- 35 -
Cuadro 18. Porcentaje de germinación a la quinta semana. ....	- 37 -
Cuadro 19. Análisis de varianza del porcentaje de germinación a la quinta semana. ....	- 37 -
Cuadro 20. Porcentaje de germinación a la sexta semana. ....	- 39 -
Cuadro 21. Análisis de varianza del porcentaje de germinación a la sexta semana. ....	- 39 -
Cuadro 22. Porcentajes de germinación a la séptima semana. ....	- 41 -

Cuadro 23. Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la séptima semana. ....	- 42 -
Cuadro 24. Porcentajes de germinación a la octava semana. ....	- 43 -
Cuadro 25. Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la octava semana. ....	- 43 -
Cuadro 26. Porcentajes de germinación a la novena semana. ....	- 45 -
Cuadro 27. Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la novena semana. ....	- 45 -
Cuadro 28. Porcentajes de germinación a la décima semana. ....	- 46 -
Cuadro 29. Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la décima semana. ....	- 46 -
Cuadro 30. Porcentajes de germinación a la onceava semana. ....	- 47 -
Cuadro 31. Análisis de varianza en porcentaje de germinación a la onceava semana. ....	- 48 -
Cuadro 32. Porcentaje de formación de protocormos a la semana 17.....	- 48 -
Cuadro 33. Análisis de varianza en porcentajes de formación de protocormos a la semana 17.. ....	- 49 -
Cuadro 34. Datos de la semana 18 formaciones de protocormos.....	- 50 -
Cuadro 35. Análisis de varianza de formación de protocormos.....	- 50 -
Cuadro 36. Porcentaje de formación de protocormos a la semana 19.....	- 52 -
Cuadro 37. Análisis de varianza en porcentajes de formación de protocormos a la semana 19.....	- 52 -

# ANEXOS

Anexo A Registro fotográfico.....	63
-----------------------------------	----

## RESUMEN

Este proyecto de investigación tuvo lugar en el laboratorio de Ecuaflo-A, con el fin de contribuir al rescate y conservación de una especie amenazada de orquídea endémica de la zona de Molleturo (*Cyrtochilum edwardii*). La misma que años atrás existía en cantidades extensas, pero debido a la expansión agrícola, y a su extracción desmedida por comerciantes de plantas han disminuido notablemente en su hábitat natural. La semilla utilizada para este proyecto fue en cápsula cerrada, la misma se empleó para la siembra in vitro. Para esto se han empleado dos medios caseros a base de plátano y manzana, sometidos a tres fotoperiodos de tiempo y cuatro repeticiones, en un diseño experimental de bloques completos al azar, los resultados obtenidos fueron estadísticamente analizados mediante la prueba de rango múltiple de Duncan al 5%. Las variables tomadas en este trabajo fue: porcentaje de germinación desde la tercera semana hasta la onceava semana y formación de protocormos desde la semana 17 finalizando a la semana 19. A lo largo de la investigación el medio casero a base de plátano con un fotoperiodo de 16 horas luz resultó positivo en la germinación de semilla y formación de protocormos.

**Palabras clave:** *Cyrtochilum edwardii*, medio de cultivo plátano, fotoperiodos, cultivo in vitro.

## ABSTRACT

This investigation project took place in Ecuaflo-A laboratory, with the goal to contribute towards the rescue and conservation of an endangered species of orchid endemic to a zone of Molleturo (*Cyrtorchilum edwardii*). That species of orchid was abundant years ago but due to the expansion of farming and its extraction due to commercial mean this plant has become depleted. The seed utilized for this project was inside a closed capsule, the same type of capsule was also used for the vitro cultivation. For this to occur there were two house techniques based upon plantain and an apple, applied to three photo periods of time and four repetitions. This was made on an experimental design of blocks completed simultaneously; the results obtained were statistically analyzed median to the multiple ranks of Duncan to the 5% The variables in the project were the percentage of germination from the third week until the eleventh week and the formation of protocorms from the seventieth finalized on the ninetieth week. Throughout the investigation the technique of plantain with a photoperiod of 16 hours gave positive results of the germination of the seed and the formation of protocorms.

**Keywords:** *Cyrtorchilum edwardii*, cultivation techniques, photoperiods, in vitro culture.

# CAPÍTULO 1

## MARCO INTRODUCTORIO

Desde hace miles de años ya las orquídeas fueron utilizadas por los Mayas, Aztecas y Griegos en la ornamentación, la medicina, incluso para hacer pegamento y hasta como un afrodisíaco y potenciadoras de la fertilidad. La palabra orquídea viene del griego *orchis* que significa testículo, por la forma de los pseudobulbos de algunas especies terrestres y porque crecen en pares (1). Con el tiempo, la palabra *orchis* derivó en *Orchidaceae*, término que hoy designa a la familia más numerosa del reino vegetal con más de 25 000 a 30 000 especies distribuidas alrededor de los países cálidos y templados de todo el mundo (2), (3).

Hasta el siglo XIX solo se podía conseguir una orquídea extrayéndola de su hábitat natural, debido a que se desconocía que la germinación de las semillas en condiciones naturales tiene lugar por la presencia de hongos en un proceso simbiótico (4).

Fue en el año de 1922 cuando Knudson publicó su experiencia, logrando hacerlas germinar y crecer en un medio con azúcares y minerales, sin la presencia de hongos simbióticos, mediante un cultivo aséptico (5). Se considera que esta técnica permite producir plantas a gran escala en corto y mediano plazo, favoreciendo la conservación del recurso filogenético (6).

En el mundo se estima que existen alrededor de 30 000 especies de orquídeas, en Ecuador se encuentran alrededor de 214 géneros que agrupan hasta el momento unas 4 200 especies, con un 25% de endemismo. Se considera que este número ascenderá debido a descubrimientos y registros (7); (8).

En el área comprendida por Colombia y Ecuador, debido a la alta tasa de deforestación de las selvas andinas se considera que alrededor de 3 000 especies se encuentran en riesgo de extinción (9). Dentro de este grupo en riesgo podría encontrarse *Cyrtorchilum edwardii*, ya que, hace 30 años aproximadamente se había registrado una alta población de esta especie en una área de unos 12km<sup>2</sup> en la parroquia Molleturo del cantón Cuenca y a día de hoy son muy pocos los especímenes presentes, quizás debido a la expansión de la frontera agrícola, a la utilización en la alimentación de animales menores, a su extracción como planta ornamental (8).

Además se conoce que el género *Cyrtorchilum* se ve afectado por un lento desarrollo, pues estudios demuestran que desde semilla hasta la obtención de una planta adulta, en condiciones naturales, pueden pasar entre 6 y 15 años (4).

Ante la problemática descrita, esta investigación plantea como objetivo general: “Valorar medios de cultivo caseros a base de plátano y manzana respectivamente, a los cuales se les adiciona agua de coco y sometidos a tres fotoperiodos en la germinación de semilla y desarrollo de protocormos de *Cyrtorchilum edwardii*” y como objetivos específicos: 1) Probar dos medios de cultivos (plátano y manzana). 2) Analizar el efecto del agua de coco en el proceso de germinación de semilla. 3) Evaluar tres fotoperiodos para la germinación de semilla de la orquídea *Cyrtorchilum edwardii*. 4) Contribuir a la conservación de la biodiversidad, mediante la propagación in vitro de esta orquídea.

Se espera que al menos un medio y fotoperiodo favorezcan la germinación de semilla y desarrollo de protocormos de *Cyrtorchilum edwardii*.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas son la familia que engloba uno de los grupos de plantas con mayor número de especies, que se encuentran distribuidas por todo el planeta, aunque ausentes en la Antártida y en los desiertos más áridos de Eurasia (10).

La orquídea es considerada una de las flores más atractivas del mundo por sus atributos ornamentales, y en algunos casos curativos. La gran diversidad en formas, tamaños y colores le ha valido para ser categorizada como la familia más extensa dentro de la botánica sistemática son plantas herbáceas perennes que crecen en las ramas de los árboles (epífitas), en las rocas (litofítas), en el suelo (terrestres), y algunas en el subsuelo (subterráneas) (11).

Ecuador es un país biodiverso en orquídeas, en el que se encuentran a estas plantas en todos los pisos altitudinales entre 0 a 4500 msnm pero la mayor cantidad de orquídeas endémicas se encuentran entre los 1500-3000 msnm; se puede decir que las orquídeas son plantas muy evolucionadas y se adaptan con facilidad a ecosistemas nuevos, estudios realizados indican que de cada diez especies de plantas silvestres cuatro de ellas son orquídeas; en definitiva Ecuador se encuentra entre los 17 países megadiversos, por su ubicación geográfica, factores climáticos y topografía ocupando estos menos del 10% de la superficie del planeta los mismo que albergan siete de cada diez especies reconocidas (12)

El 5 de diciembre de 2013 Ecuador fue declarado oficialmente el país de las orquídeas respaldado por el decreto ejecutivo N<sup>o</sup> 172, con esto se busca incentivar a la población para la conservación, rescate, cultivo, reproducción, comercialización e investigación sobre las mismas (13).

En nuestro país se encuentra una de la especie de orquídea más pequeña del mundo, con 2,1 milímetros de dimensión perteneciente al género *Platystele* descubierta por Lou Jost (14). Pero también se cultiva en el Jardín Botánico de Guayaquil, la orquídea Tigre (*Grammatophyllum speciosum*), siendo originaria del Sureste de Asia y considerada como una de las especies más grandes del mundo (15); (16).

Los estudios sobre orquídeas en la provincia del Azuay tuvieron como precursor al sacerdote salesiano Ángel Andretta, con el apoyo de la familia Portilla

lograron importantes avances en la clasificación de orquídeas nativas del país (17). Quienes formaron una empresa que apoya a la conservación de especies nativas, mediante cultivos in vitro, siendo una de ellas *Cyrtochilum edwardii* (8), especie que botánicamente tiene como sinónimos: *Odontoglossum edwardii* (Rchb.f). (1878), y *Dasyglossum edwardii* (Rchb.f). Königler & Schildh. (1996) (18); (19).

## 2.2 DISTRIBUCIÓN DE *Cyrtochilum edwardii*

Especie nativa de Ecuador, se la encuentra particularmente en la parroquia Molleturo perteneciente a la provincia del Azuay (8), entre los 2300 a 2700 msnm (20), descubierta en el año de 1878 por el botánico Edward Klaboch (21).

## 2.3 ORQUÍDEA *Cyrtochilum edwardii*

### 2.3.1 TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica referida a *Cyrtochilum edwardii* se presenta en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Taxonomía de *Cyrtochilum*.

Reino	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsita
Orden:	Asparagales
Familia:	Orchidaceae
Género:	<i>Cyrtochilum</i>
Especie:	<i>Edwardii</i>

**Fuente.** (22); (23).

### 2.3.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

#### 2.3.2.1 Raíz

*Cyrtochilum edwardii* presenta raíces epífitas, gruesas que miden hasta 60 cm de largo, con un diámetro de 1 cm, su coloración varía de acuerdo a la humedad existente, pasando de blanquecinas a verdes cuando este factor ambiental es alto, las orquídeas toman un tono café cuando se encuentran directamente expuestas a la luz solar. Se estima que la mayor tasa de crecimiento de esta

especie tiene lugar entre los 3 y 5 meses de su aparición, periodo luego del cual se detiene su desarrollo (7); (8). (ver figura 1).

### 2.3.2.2 Tallo

En esta orquídea se presenta como pseudobulbos, con una coloración púrpura debida a una alta concentración de pigmentos, que además de soporte actúan como un órgano de reserva, almacenando agua para aprovecharla en el tiempo de verano para su subsistencia. Su tamaño en plantas adultas alcanza 20 cm de largo;(ver figura 2) (7).



**Fig. 1.** Raíz de *Cyrtorchilum edwardii*.  
Elaboración propia

### 2.3.2.3 Hojas

Esta especie presenta hojas dísticas, alternas, subcoriáceas, agudas, y liguladas; de entre 80 a 100 cm de largo y de 5 a 6 cm de ancho; además *Cyrtorchilum edwardii* mantiene la concentración de pigmentos, por lo que sus hojas también son púrpuras en su parte basal y bordes. (7); (20); (22) (ver figura 3).



**Fig. 2.** Tallo de *Cyrtorchilum edwardii*.  
Elaboración propia



**Fig. 3.** Hojas de *Cyrtorchilum edwardii*.  
Elaboración propia

#### 2.3.2.4 Flores

Están compuestas por tres sépalos, dos pétalos y un labelo, este último es considerado como el pétalo basal, todos presentando ondulación en sus bordes. Su coloración púrpura es muy intensa, no presentando néctar ni sustancias

aromáticas. Se estima un tamaño promedio de cuatro centímetros (7); (8) (ver figura 4).

### 2.3.2.5 Inflorescencia

Presenta un tallo floral principal (raquis) con brácteas alternas a nivel de las cuales se ramifica en una panícula, en términos generales una planta puede agrupar entre 50 y 300 flores dependiendo de su robustez (7); (20) (ver figura 5).

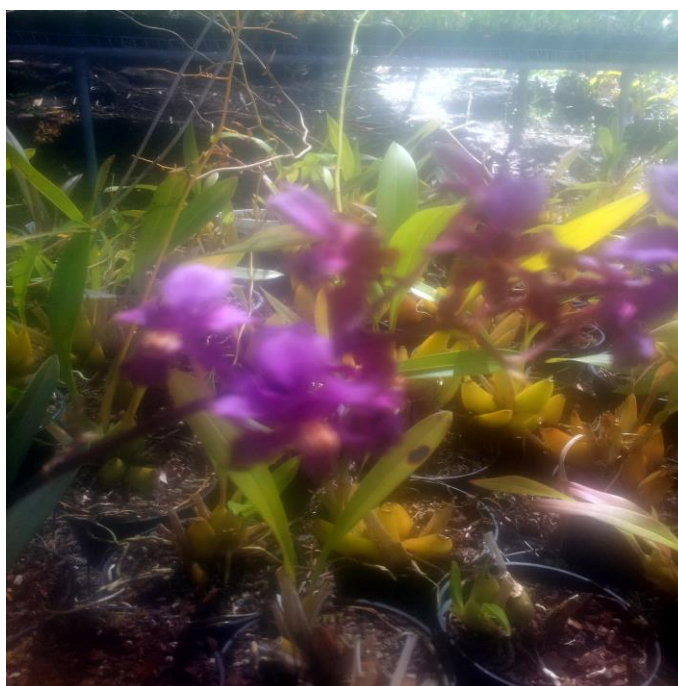


Fig. 4. Flores de *Cyrtochilum edwardii*.

Elaboración propia

### 2.3.2.6 Fruto

Es una cápsula trilocular cuyas divisiones se aprecian externamente, su tamaño puede alcanzar un diámetro de 4 cm y 6 cm de longitud. En el caso de *Cyrtochilum edwardii*, después de la fecundación alcanza su madurez entre 5 y 6 meses. En el interior de la misma las semillas se encuentran adheridas a pequeños filamentos (7) (ver figura.6).



**Fig. 5.** Inflorescencia de *Cyrtochilum edwardii*.

Fuente: (24)



**Fig. 6.** Fruto de *Cyrtochilum edwardii*.

Elaboración propia

### 2.3.2.7 Semillas

*Cyrtochilum edwardii* presenta una cápsula que contiene entre 1300-4000 semillas (25); (26), dependiendo el tamaño de la misma, tienen una apariencia de

hilo, son monocotiledóneas, membranosas, y poseen una capa que protege al embrión y esto permite que el viento les ayude alcanzar mayores distancias (7); (8) (ver figura 7).



**Fig. 7.** Semilla de *Cyrtochilum edwardii*.

Elaboración propia

## 2.4 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo debe reunir ciertas condiciones para el desarrollo de semillas y explantes, así, contener sales minerales, azúcar, vitaminas, gelificante un pH ligeramente ácido, una determinada humedad, que junto con la temperatura del entorno favorecen el crecimiento (27); (28).

Años atrás la germinación de semillas de orquídeas, tenía lugar únicamente en la naturaleza mediante la asociación con un hongo micorrízico el cual les proveía de nutrientes para su crecimiento y desarrollo, denominando a este proceso como germinación simbiótica (29).

Hasta que en 1922 Lewis Knudson elaboró un método artificial sin la necesidad de un hongo para la germinación de semillas, conocida como asimbiótica, usando un medio de cultivo artificial bajo condiciones de asepsia y controladas. Esta propuesta de cultivo en la actualidad sigue siendo utilizada (30).

A pesar del descubrimiento de Knudson, se comprobó que no siempre es posible hacer un medio en el que todas las especies de orquídeas puedan germinar y desarrollar, ya que cada una tiene diferentes necesidades (31).

Se han desarrollado varios medios nutritivos, para muchos géneros y especies tanto comerciales (Phytamax, Murashige skoog, Knudson, Lindenmann) como caseros generalmente a base de pulpa de frutas (piña, plátano, manzana etc.) y complementos como agua de coco (32); (28).

En la investigación se han utilizado dos medios de cultivo caseros, uno a base de plátano y otro de manzana, con adición de agua de coco.

La finalidad es abaratar costos de producción en el cultivo in vitro, ya que el plátano y manzana son fáciles de obtener a precios relativamente bajos, con resultados satisfactorios en germinación de semillas de orquídeas, constituyéndose en una alternativa viable (33).

#### **2.4.1 COMPONENTES BÁSICOS DE UN MEDIO DE CULTIVO**

Los principales componentes de un medio de cultivo son:

- 1). Nutrientes minerales
- 2). Carbono
- 3). Vitaminas
- 5). Sustancias reguladoras de crecimiento
- 4). Agente gelificante
- 6). Otros componentes (34).

##### **2.4.1.1 Nutrientes minerales**

Los medios de cultivo aportan (macro y micro nutrientes) (35), para el crecimiento de las plantas en una proporción adecuada según la especie elegida (34).

##### **2.4.1.1.1 Macroelementos**

Hacen referencia a nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), siendo estos los principales y que se requieren en mayores cantidades, en tanto que calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S) son requeridos en menor proporción (36).

#### **2.4.1.1.1.1 Nitrógeno (N)**

Es un componente esencial de todos los seres vivos y básico para la formación de proteínas. Además, es importante para la síntesis de los tejidos, y forma parte de bases nitrogenadas (purinas, pirimidinas, porfirinas), vitaminas, alcaloides y enzimas (28).

#### **2.4.1.1.1.2 Fósforo (P)**

El fósforo dentro del tejido vegetal es el encargado de que se produzca la reacción de la fotosíntesis, la biosíntesis de lípidos, y forma parte en la oxidación de la glucosa (glucólisis) para la obtención de energía en la célula (28), e interviene en el almacenamiento y transferencia de energía química que se utiliza en los procesos de crecimiento (37).

#### **2.4.1.1.1.3 Potasio (K)**

Es un elemento que aumenta la actividad fotosintética, regula la presión osmótica celular, disminuye la transpiración, mantiene la turgencia celular (28) y estimula el crecimiento de las raíces (37).

#### **2.4.1.1.1.4 Calcio (Ca)**

Forma parte de las paredes y membranas celulares (37), de la estructura de la protopectina, mantiene las células unidas y ayuda al desarrollo de las raíces, ejerciendo una triple función: multiplicación y crecimiento celular, y neutralización de los hidrogenoides (28).

#### **2.4.1.1.1.5 Magnesio (Mg)**

Ayuda en la formación molecular de las partículas de clorofila (37), interviene y contribuye en la composición de los pigmentos verdes de las plantas (28).

#### **2.4.1.1.1.6 Azufre (S)**

Es pieza fundamental en la síntesis de las proteínas (37) y contribuye con la regulación osmótica celular (28).

#### **2.4.1.1.2 Microelementos**

Están considerados como tales por el requerimiento de las plantas en pequeñas cantidades siendo estos: Aluminio (Al), Boro (B), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Molibdeno (Mo), Níquel (Ni), Yodo (I), Zinc (Zn), (36); (38).

#### **2.4.1.2 Carbono**

En el cultivo in vitro los explantes no son completamente autótrofos ya que no cubren sus necesidades con la fotosíntesis (38) siendo necesario adicionar una fuente de carbono (35).

Para cubrir la carencia se usa generalmente sacarosa y myo-inositol, en concentraciones de 2% a 5%, supliendo las necesides dejadas por la fotosíntesis (34).

#### **2.4.1.3 Vitaminas**

Las vitaminas son complejos orgánicos que intervienen en el metabolismo normal de los organismos vivos (39).

Los medios de cultivo normalmente contienen varias vitaminas como: B1 (Tiamina), B2 (Riboflavina), B3 (Ácido nicotínico), B6 (Piridoxina), B9 (Ácido fólico), vitamina E (Tocoferol), vitamina H (Biotina), entre otras (38), primordialmente se usa tiamina por su función reguladora (34),

##### **2.4.1.3.1 Tiamina**

Se considera que es una vitamina con función reguladora en las plantas y participa en las funciones de nutrición y asimilación, principalmente incrementando la cantidad de protoplasma; adicionada a medios de cultivo se ha

comprobado que acelera el crecimiento de las raíces (40); se usa en concentraciones que varían entre 0.1 a 1.0 mg/l (41); (42).

#### **2.4.1.4 Sustancias reguladoras de crecimiento**

Estudios realizados indican que a los medios de cultivo es necesario agregar sustancias reguladoras de crecimiento para un mejor desarrollo de los tejidos en cultivo siendo generalmente utilizadas las auxinas o citocinas (34); convirtiéndose en determinantes para el éxito o fracaso de los mismos (43).

##### **2.4.1.4.1 Auxinas**

Estas promueven mayoritariamente la formación de callos, raíces adventicias, estimulan la división y elongación celular e inhiben la formación de brotes axilares adventicios (44), las más utilizadas son: ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (34).

##### **2.4.1.4.2 Citoquininas o Citocinas**

Estimulan la división celular y rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar, (43), las más empleadas son: Bencilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN) y Zeatina (ZEA) (34).

##### **2.4.1.5 Agente gelificante**

En los medios semisólidos comúnmente se adicionan agar (0.6% a 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar (35), ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar. Todos estos factores pueden alterar las respuestas in vitro de los cultivos (34).

#### **2.4.1.5.1 Agar Agar**

Sustancias derivadas de varios géneros de algas siendo conocida en Japón como Kanten o (cielo congelado). Fue descubierta por Minora Tarazamon, al notar que una sopa de algas se solidificaba en una noche. No fue hasta 1881 que se da comienzo al uso del agar como un agente gelificante en el cultivo de microorganismos, los precursores de esta idea fueron la pareja de esposos Hesse, Walther y Fannie (45).

Es costumbre en las culturas de la polinesia, repetir dos veces una palabra para dar más énfasis, siendo la traducción literal de agar-agar, gelatina-gelatina (46).

El agar-agar es un polisacárido obtenido de algas rojas de origen marino que proviene de los géneros *Gelidium*, *Graillaria*, *Gelidiella* y *Pterocladia* (46), el mismo que al ser procesado, es decir extraído, secado al sol y transformado en polvo, se utiliza en los medios de cultivo por sus propiedades gelificantes que proporcionan soporte a las semillas y explantes (47).

Las plántulas de orquídeas se desarrollan mejor en un medio con una consistencia semiblanda para la cual se recomienda usar agar-agar en dosis de 6,5 a 7 g/l (48).

Como gelificante en vez de agar-agar se puede utilizar maicena con el fin de abaratar costos; sin embargo, este último ingrediente se degrada a los cuatro a cinco meses y el medio de cultivo tiende a rajarse por pérdida de agua, lo que causa disminución de la superficie de absorción; además con el tiempo este medio tiende a formar costras que se adhieren a las raíces de las plantas y dificultan los repiques (48).

#### **2.4.1.6 Otros componentes**

##### **2.4.1.6.1 Agua de Coco (*Cocos nucifera*)**

El agua de coco se adiciona a los medios de cultivo por su amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos y sales ricas en magnesio, fósforo. Además de azúcar y nitrógeno proteínico; por lo que favorece el crecimiento tanto de pseudobulbos y raíces (34). También contiene citoquinina, que estimula la división celular y el crecimiento no meristemático, ayuda a la germinación de semillas e

induce la formación de brotes, contribuyendo en general al retraso del envejecimiento de los órganos vegetales (49).

En la etapa preliminar a la germinación no tiene mayor efecto ya que las semillas germinan solo en un medio a base de agar-agar porque tienen suficiente humedad, y solo una vez que se da el proceso de germinación empieza la absorción de los nutrientes. La función del agua de coco es aportar sustancias para el desarrollo de las plantas tales como auxinas, citoquininas, giberelinas y vitaminas (48).

Su importancia radica en el hecho de contener un balance entre auxinas y citoquininas que ayudan al enraizamiento, a la brotación de yemas laterales y favorece el desarrollo general en la germinación de la semilla (ver cuadro 2) y (ver figura 8) (48).

La pulpa de plátano junto con el agua de coco comprenden los suplementos más utilizados para el cultivo in vitro (50).

**Cuadro 2.** Componentes del agua de coco

AMINOÁCIDOS		VITAMINAS	AZÚCARES
Aspártico	Glutámico	Ácido Nicotínico	Sacarosa
Serina	Aminobutírico	Ácido Pantoténico	Glucosa
B-Alanina	Treonina	Biotina	Fructosa
Histidina	Glutamina	Riboflavina	Sorbitol
Arginina	Lisina	Ácido Fólico	myo-inositol
Valina	Metionina	Tianina	Siloinositol
Tirosina	Prolina	Prídoxina	
Homoserina	Fenilalanina	Ácido Ascórbico	
Hidroxoprolina			
OTROS COMPUESTOS NITROGENADOS	SUST DE CRECIMIENTO	ÁCIDOS ORGÁNICOS	OTROS
Amonio	Auxinas	Shikímico	ARN-Polimerasa
Etanolamina	Giberelinas	Quínico	Uracilo
Dihidroxifenilalanina	1,3-Difenilurea	Pirrolidona-carboxílico	Adenina
	Zeatina	Succínico	Leucoantocianinas
	Glucósido de zeatina	Málico	Fosfatasa ácida
	Ribósido de zeatina	Cítrico	Diastasa
		Desconocidos	Deshidrogenasa
			Peroxidasa
			Catalasa

Fuente: (34).



**Fig. 8.** Agua de coco.  
Elaboración propia

#### **2.4.2 Medio Murashige Skoog**

Este medio comercial formulado por Toshio Murashige y Folke Skoog (1962) (50) es el mayoritariamente utilizado para cultivos *in vitro*, aunque su costo es elevado; contiene sales minerales que aportan macro y micronutrientes, sustancias orgánicas como vitaminas (B), myo-inositol, sacarosa, y para su preparación se le agrega un agente gelificante, generalmente agar-agar (52); (53).

Al utilizar Murashige Skoog al 100% se obtiene una conductividad eléctrica de 5,69, presentando un pH inicial de 3,71, el mismo que al terminar la preparación del medio hay que ajustarlo con la adición de hidróxido de sodio hasta alcanzar un rango de 5,5 - 5,6. Para bajar la conductividad eléctrica se recomienda adicionar carbón activado para alcanzar los valores adecuados que están entre 5,1 a 5,3 para el desarrollo plantas (48).

Pruebas realizadas determinan que para la germinación de semillas de orquídeas es adecuado utilizar Murashige Skoog en una concentración del 30 al 35%, la que aporta una conductividad eléctrica de 1,9 a 2 y un ajuste de pH 5,5 (48).

En el cuadro 3 se presenta la formulación de este medio por litro de producto preparado.

**Cuadro 3.** Composición de Murashige Skoog por litro

Macronutrientes		Micronutriente		Aditivos orgánicos	
Nitrato de Potasio	1900 mg/l	Ácido Bórico	0.025 mg/l	Ácido nicotínico	0.5 mg/l
Nitrato de Amonio	1650 mg/l	Sulfato de Zinc	8.600 mg/l	Piridoxina	0.5 mg/l
Sulfato de Magnesio	370 mg/l	Sulfato de Cobre	0.025 mg/l	Tiamina	0.1 mg/l
Fosfato monobásico de Potasio	170 mg/l	Sulfato de Cobalto	0.025 mg/l	Myo-inositol	100 mg/l
		Molibdato de Sodio	0.250 mg/l		
		Sulfato de Manganeso	22.300 mg/l		
		Cloruro de Potasio	0.830 mg/l		
		Cloruro de Calcio	440.000 mg/l		
		Sulfato Ferroso	27.800 mg/l		
		Ácido etilendiaminotertacético	37.300 mg/l		

Fuente. (44).

### 2.4.3 Medios caseros

Tienen como fin reemplazar productos químicos que muchas veces son costosos y difíciles de conseguirlos en el mercado (32). Los medios de cultivo caseros también se los puede preparar sustituyendo las sales minerales y los reguladores de crecimiento por alimentos que los tenemos en nuestras casas, siempre tomando en cuenta que den los nutrientes principales para la germinación del embrión y por ende el desarrollo de la planta; aunque es necesario añadir agar (54).

#### 2.4.3.1 Medio de cultivo con Plátano

Estudios realizados demuestran que el contenido de sacarosa del plátano maduro es del (90%) a comparación del verde (7%) (55). Es por eso que en la presente investigación se utilizó plátano barraganete maduro para obtener buenos resultados en periodo de germinación.

Además, el plátano es rico en vitaminas y minerales, los mismos que al unirse en proporciones definidas con los elementos descritos en el cuadro 4, forman un medio adecuado para la germinación de semillas de orquídea (ver figuras 9 y 10).

En el cuadro 5 se presentan las cantidades de minerales y vitaminas contenidas en 100 gramos de plátano.

**Cuadro 4.** Fórmula de plátano (1l)

<b>Medio a Base de Plátano</b>	
Plátano	100 g
Agar – Agar	10 g
Azúcar	15 g
Tiamina	1.2 g/l
Agua (botellón)	900 ml
Agua de coco	100 ml

**Fuente:** (5).

**Cuadro 5.** Composición del plátano por cada 100 g

<b>MINERALES</b>		<b>VITAMINAS</b>	
Calcio	8.0 mg	Vitamina A	38.00 mg
Fósforo	27.0 mg	Vitamina B1	0,05 mg
Hierro	0,7 mg	Vitamina B2	0,06 mg
Magnesio	36.0 mg	Vitamina B3	0,70 mg
Potasio	385 .0 mg	Vitamina B6	0,37 mg
Sodio	1.0 mg	Vitamina C	11.00 mg
		Vitamina E	0,50 mg

**Fuente:** (56); (57).



**Fig. 9.** Pesado de materiales (Plátano).

Elaboración propia



**Fig. 10.** Frascos con el medio a base de plátano.  
Elaboración propia

#### 2.4.3.2 Medio de cultivo de Manzana

La manzana es rica en vitaminas y minerales, localizadas en la piel o justo debajo de esta y al unirse en proporciones definidas con los elementos descritos en el cuadro 6, forman un medio adecuado para la germinación de semillas de orquídea (ver figura 11 y 12).

En el cuadro 7 se presentan las cantidades de minerales y vitaminas contenidas en 100 gramos de manzana (58).

**Cuadro 6.** Fórmula de manzana (1l)

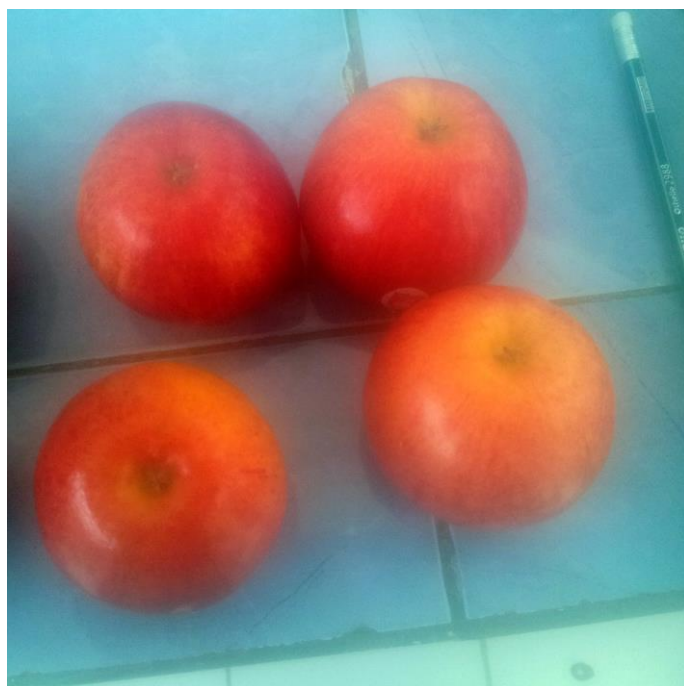
<b>Medio a Base de Manzana</b>	
Manzana	100 g
Agar – Agar	10 g
Azúcar	15 g
Tiamina	1.2 mg/l
Agua (botellón)	900 ml
Agua de coco	100 ml

Elaboración propia

**Cuadro 7.** Contenido nutricional en 100 g de manzana

Elemento	Medida	Valor nutricional
Agua	g	84.00
Proteínas	g	0.300
Lípidos	g	0.600
Carbohidratos	g	15.00
Calorías	kcal	58.00
Vitamina A	UI	90.00
Vitamina B1	mg	0.04
Vitamina B2	mg	0.02
Vitamina B6	mg	0.03
Ácido Nicotínico	mg	0.10
Ácido Pantoténico	mg	0.10
Vitamina C	mg	5.00
Ácido Málico	mg	270 – 120
Ácido Cítrico	mg	0 – 30
Ácido Oxálico	mg	1.50
Sodio	mg	1.00
Potasio	mg	116.00
Calcio	mg	7.00
Magnesio	mg	5.00
Manganeso	mg	0.07
Hierro	mg	0.30
Cobre	mg	0.08
Fósforo	mg	10.00
Azúfre	mg	5.00
Cloro	mg	4.00

Fuente: (54).



**Fig. 11.** Materia prima para medio (Manzana).

Elaboración propia



**Fig. 12.** Envasado de medio de cultivo.  
Elaboración propia

## **2.5 FOTOPERIODO**

Comprende el número de horas de luz (natural o artificial) a las cuales la planta está expuesta. El tiempo que necesita un cultivo en general de orquídeas es alrededor de 8 a 10 horas de exposición, ya sea a nivel de campo como de laboratorio siendo un parámetro importante en la germinación de semillas y la floración de las orquídeas (59).

Investigaciones en orquídeas demuestran que proporcionándoles un fotoperíodo de 16 horas tiene influencia en la inducción del desarrollo de los callos embriogénicos y la regeneración, formación de embriones somáticos (60).

Pruebas realizadas concluyen en que la luz no incide en las semillas hasta el momento de la germinación, pues ésta actúa en el desarrollo, así, para obtener plantas de calidad se recomienda mayor luminosidad (48).

## **2.6 CULTIVO IN VITRO**

Es el conjunto de técnicas que permiten cultivar en un medio aséptico diversos tipos de tejidos como pueden ser de plantas, semillas, embriones, órganos,

células, explantos y protoplastos. Mediante esta técnica se obtienen, conservan y reproducen especies de plantas deseadas en grandes cantidades (38).

Hoy en día esta técnica constituye un pilar fundamental en la obtención y regeneración de plantas, permitiendo la obtención de un gran número de individuos en espacios reducidos, en periodos de tiempo relativamente cortos (61); (32).

En el caso de las orquídeas este tipo de técnicas favorece, la reproducción asimbiótica pues las semillas, son muy pequeñas y poseen poca reserva, y en condiciones naturales necesitan de la simbiosis con un hongo (44).

Con esta técnica, al tener control de parámetros como: temperatura, humedad y luz (61) se obtienen plantas de mejor calidad y por realizarse en un medio aséptico (62) se logran individuos libres de agentes patogénicos (64).

Como contraparte este método de propagación en sus inicios resulta costoso por la necesidad de equipos concretos, así como el contar en algunos casos con medios de cultivo específicos para cada especie (64).

En el proceso de laboratorio y en un medio aséptico se logra aprovechar a lo máximo el poder germinativo que tiene la semilla pues en un medio asimbiótico no tienen competencia (48).

Además, 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 (65) y mediante el cultivo de meristemos plantas libres de virus (48).

Por otra parte, (48) sugiere el cultivo simbiótico, mediante el uso de hongos micorrízicos, en donde las plantas desarrolladas bajo esta simbiosis presentan mayor desarrollo en menor tiempo, resistencia a patógenos y mejor adaptación al periodo post in vitro

## **2.7 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE)**

Es la capacidad que posee un cuerpo o medio para conducir la corriente eléctrica, y esta se utiliza para conocer los niveles de salinidad; y, se puede medir tanto del agua (líquido), como del suelo (sólido), y dependiendo de la cantidad de sales disueltas que existan en el medio indican la cantidad de CE (66).

Estudios han demostrado que la CE, es una combinación físico-química de la textura, materia orgánica, humedad, pH, salinidad, intercambio catiónico entre otros del suelo (67).

El análisis de la CE en suelos se realiza para determinar, si las sales solubles se encuentran en cantidades suficientes como para afectar la germinación normal de

las semillas, el crecimiento de las plantas o la absorción de agua por parte de las mismas. A mayor CE se incrementa la presión osmótica en las raíces, dando como consecuencia dificultad en la absorción del agua y nutrientes, haciendo que la planta gaste mayor energía para su desarrollo (68).

En medios de cultivo para procesos de germinación se recomienda CE baja (1,9 a 2 Siemens/cm) en tanto que para el repique y el desarrollo de plantines se requiere conductividades altas (5,69 Siemens/cm) (48).

# CAPÍTULO 3

## METODOLOGÍA

Este capítulo presenta los materiales, métodos y procedimientos utilizados en el proyecto investigación, para la germinación y formación de protocormos de la orquídea *Cyrtorchilum edwardii*.

### 3.1 MATERIALES

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron diversos materiales, los mismos que han sido categorizados en: físicos, químicos y biológicos.

#### 3.1.1 FÍSICOS

Un detalle de los materiales físicos de acuerdo a los diversos procesos, se presenta en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Conjunto de materiales de laboratorio

MATERIALES FÍSICOS			
INSUMOS			
VESTUARIO	PREPARACIÓN DEL MEDIO	SIEMBRA	OFICINA
Mascarilla	Olla	Cámara de flujo laminar	Cuaderno de apuntes
Mandil	Autoclave	Estanterías	Lápiz
Cobertor de cabello	Cocina industrial	Timer	Computadora
Guantes	pH metro	Bisturí	Marcadores
Zapatos antideslizantes	Balanza	Porta bisturí	Cámara fotográfica
	Licuadaora.	Pinzas	
	Paleta	Lámpara de alcohol	
	Embudo	Botellas	
		Algodón	
		Papel aluminio	
		Ligas	
		Etiquetas	
		Toallas de limpieza	
		Papel estéril	
		Cámara de crecimiento	

Elaboración propia

### 3.1.2 QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

Los materiales químicos y biológicos se exponen el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Químicos y biológicos.

MATERIALES	
QUÍMICOS	BIOLÓGICOS
Agua destilada	Cápsulas de <i>Cyrtochilum edwardii</i>
Agar – agar	Agua de coco
Tiamina	Pulpa de Manzana
Azúcar	Pulpa de Plátano
Hidróxido de sodio (NaOH) pH	
Ácido Clorhídrico (HCl) pH	
Ajax Cloro	
Alcohol	

Elaboración propia

## 3.2 DESARROLLO

### 3.2.1 Ubicación:

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la empresa “Equaflor-A”, propiedad del señor Ing. Mario Portilla, ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Yanuncay, sector parque Iberia, calles Pedro Álvarez Cabral 1-69 y Av. Don Bosco, las coordenadas geográficas del lugar se reflejan en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Ubicación geográfica del ensayo.

Coordenadas	
Latitud	2°54'59.4" S
Longitud	79°01'12.5" W
Altitud	2.526 msnm

Elaboración propia

### 3.2.2 Características del laboratorio

El laboratorio presenta las condiciones adecuadas para realizar cultivo in-vitro de orquídeas, debido a que es un lugar libre de contaminación, y cuenta con todos los implementos necesarios para desarrollar la investigación planteada (ver figura 13).

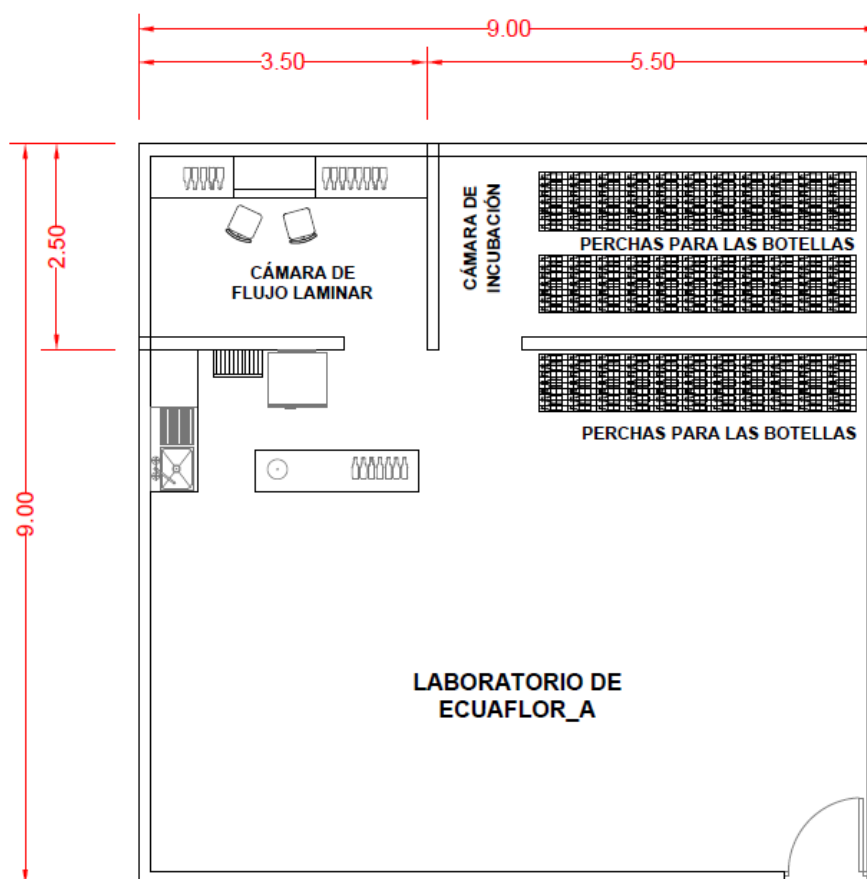


Fig. 13. Plano del laboratorio.  
Elaboración propia

### 3.2.3 Tipo de investigación

El tipo de investigación realizada es experimental con enfoque cuantitativo, en la cual se prueban dos medios de cultivo con adición de agua de coco y tres fotoperiodos en bloques al azar, para evaluar el porcentaje de germinación de la semilla de *Cyrtorchilum edwardii* y desarrollo de protocormos, con cuatro repeticiones.

### 3.2.4 Factores en estudio

La simbología de los factores en estudio se refleja en el cuadro 11.

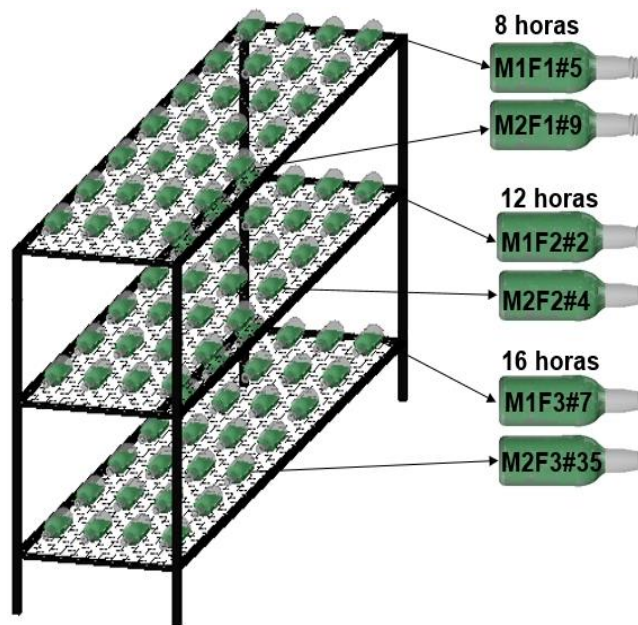
**Cuadro 11.** Simbología de los medios y fotoperiodos

Medios Caseros	Fotoperiodos
Medio de plátano (M1)	8 horas luz (F1)
Medio de manzana (M2)	12 horas luz (F2)
	16 horas luz (F3)

Elaboración propia

### 3.2.5 Tratamientos:

En el experimento planteado las combinaciones determinan seis tratamientos con cuatro repeticiones dando un total de veinticuatro unidades experimentales que fueron distribuidas en una estantería con tres niveles correspondientes a cada fotoperiodo, el esquema y distribución se muestran en la figura 14, su nomenclatura se refleja en el cuadro 12.



**Fig. 14.** Distribución aleatoria de las botellas

Elaboración propia

**Cuadro 12.** Nomenclatura de los tratamientos

T1	M1F1	F1
T2	M1F2	F2
T3	M1F3	F3
T4	M2F1	F1
T5	M2F2	F2
T6	M2F3	F3

Elaboración propia

### **3.2.6 Análisis estadístico**

A lo largo de la investigación los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, mediante el análisis de variancia (ADEVA) y en caso de establecerse diferencias estadísticas; se plantea la prueba de Duncan al 5%.

### **3.3 PROCEDIMIENTO:**

La investigación en su parte práctica comprende varios aspectos los mismos que se describen a continuación.

- Preparación del medio de cultivo.
- Adecuación de la cámara de flujo laminar.
- Obtención y desinfección de la semilla.
- Siembra.
- Etiquetado.
- Incubación.

#### **3.3.1 Preparación del medio de cultivo.**

En base a la fórmula de cada uno de los medios ver cuadros 4 y 6 se mezclan los ingredientes y se licúan, luego se tamizan y el líquido obtenido se lleva a cocción por un tiempo de cinco minutos, durante este lapso se realizan mediciones del pH con el fin de ajustarlos alrededor de 5,5. Este líquido se coloca en botellas mediante un vaso medidor (100 ml) y un embudo. Luego se sellan las

botellas con un tapón de algodón y se cubre con papel aluminio. Las mismas se llevan a la autoclave por un tiempo de 15 minutos. Luego se extrae de la misma y se coloca una liga en el pico de la botella que sujeta el papel aluminio y antes del enfriado total se coloca horizontalmente para la solidificación del medio. Y se las ubica a la sombra y son observadas por un periodo de ocho días por si hay contaminación (ver figura15).



**Fig. 15.** Preparación del medio.

Elaboración propia

### **3.3.2 Adecuación de la cámara de flujo laminar**

La cámara se desinfecta con una solución de hipoclorito de sodio al 15% y alcohol al 70% y la acción de luz ultra violeta (UV) por 15 minutos en donde se incluye los frascos con medios colocados en ella. Se introducen al área de trabajo los materiales previamente esterilizados (bisturí, pinza, vasos, papel filtro) (ver figura 16).



**Fig. 16.** Cámara de flujo laminar.  
Elaboración propia

### **3.3.3 Obtención y desinfección de la semilla**

Polinizadas las flores de *Cyrtoquillum edwardii* y formado el fruto este se recolecta a los 220 días, tiempo en el cual las semillas han adquirido la madurez fisiológica. La cápsula cosechada, es lavada con agua y jabón previamente a su ingreso a la cámara flujo laminar en donde es desinfectada introduciéndola en un frasco con cloro puro agitándola por dos minutos luego de lo cual se retira el cloro con hojas de papel estéril, seguidamente se la introduce en un frasco con alcohol al 70% por dos minutos y se procede a su flameado (ver figura 17).



**Fig. 17.** Esterilización mediante flameado de capsula previo a la siembra.  
Elaboración propia

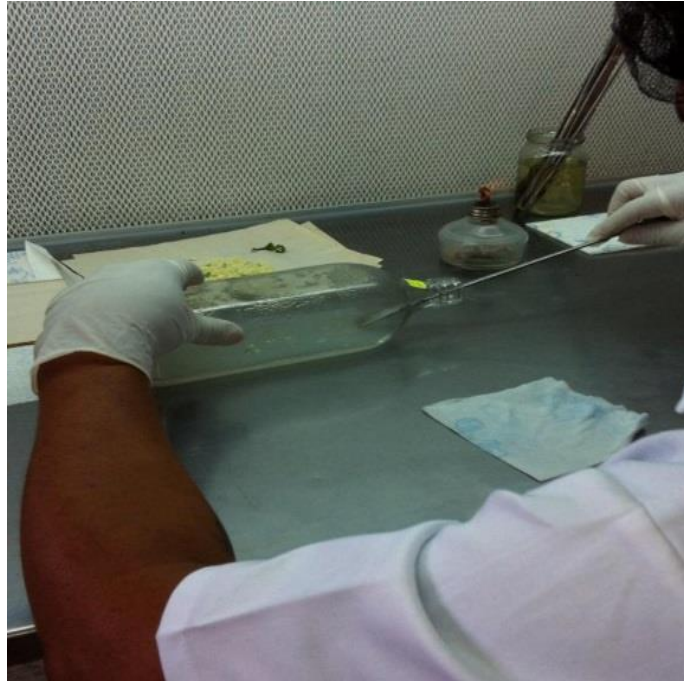
### **3.3.4 Siembra**

La cápsula desinfectada se la abre longitudinalmente con un bisturí sobre un papel estéril, dejando al descubierto la semilla, se toma la botella con el medio se retira la cubierta de aluminio se la flamea la boca se retira el algodón y vuelve a flamear su boca; se introduce la semilla con la ayuda de una pinza y se la esparce por toda la superficie del medio, se vuelve a flamear la boca y el tapón de algodón se la sella con el mismo envolviendo su abertura con plástico parafilm (ver figura 18).

Pruebas realizadas indican que con la adición de dos centímetros cúbicos de agua después de la siembra permite la dispersión de las semillas y ayuda a que las sales del medio se disuelvan, y así baje la conductividad eléctrica (45).

### **3.3.5 Etiquetado**

Cada botella fue identificada con diferente color de etiqueta para así poder diferenciar los medios de estudio; en cada una de estas se anotó la fecha en la que fue sembrada; de esta manera podremos determinar con mayor facilidad cuál de los medios de cultivo dan los primeros resultados y poder reconocer el más adecuado para el cultivo in vitro de *Cyrtochilum edwardii* (ver figura 19).



**Fig. 18.** Preparación de frascos y siembra  
Elaboración propia



**Fig. 19** Etiquetado.  
Elaboración propia

### 3.3.6 Incubación

Las botellas sembradas con semillas de *Cyrtosiphum edwardi* se llevan a la cámara de incubación en donde se las coloca en estanterías de acuerdo a los niveles de luz establecidos y los tratamientos determinados (ver figura 20).



**Fig. 20.** Incubación.  
Elaboración propia

Para ello se utilizó el diseño experimental con bloques completos al azar DBA y en un arreglo bifactorial (ver cuadro 13).

**Cuadro 13.** Tratamientos y factores en estudio

Medios de Cultivo	Fotoperiodos			Tratamientos	Número de Repeticiones
	8H	12H	16H		
M1	F1			M1F1	4
M1		F2		M1F2	4
M1			F3	M1F3	4
M2	F1			M2F1	4
M2		F2		M2F2	4
M2			F3	M2F3	4

Elaboración propia

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

A lo largo de este estudio los resultados obtenidos son de días a la germinación y formación de protocormos, los datos se tomaron de manera visual, para la estadística se empleó el análisis de varianza (ADEVA) y la prueba de rango múltiple de Duncan al 5%.

#### 4.1 GERMINACIÓN DE SEMILLA

Contabilizada la tercera semana se anota el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos (cuadro 14) al no haber iniciado todos estos procesos, los datos se transforman a  $\sqrt{x+0,5}$ .

**Cuadro 14.** Porcentaje de germinación a la tercera semana (transformación a  $\sqrt{x+0,5}$ )

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	3,24	3,24	0,70	3,24	10,42	2,61
M1F2	3,24	4,52	4,52	5,52	17,80	4,45
M1F3	5,52	5,52	4,52	5,52	21,08	5,27
M2F1	4,52	4,52	4,52	5,52	19,08	4,77
M2F2	5,52	3,24	5,52	0,70	14,98	3,75
M2F3	5,52	5,52	5,52	4,52	21,08	5,27
Total Repeticiones	27,56	26,56	25,30	25,02	104,44	26,11
Media	4,59	4,43	4,22	4,17	17,41	4,35

Elaboración propia

El análisis de varianza (ADEVA) determina que no existe diferencia estadística para tratamientos, medios y fotoperiodos en porcentajes de germinación a la tercera semana (ver cuadro 15).

**Cuadro 15.** Análisis de varianza de porcentaje de germinación a la tercera semana

FV	SC	G.l	CM	F.O	0,05	0,01	
Total	46,70	23					
Tratamientos	21,16	5	4,23	2,56	3,06	4,89	ns
Medios	1,42	1	1,42	0,86	4,54	8,68	ns
Fotoperiodos	10,79	2	5,40	3,26	3,68	6,36	ns
MXF	8,95	2	4,47	3,26	3,68	6,36	ns
Repeticiones	0,69	3	0,23	0,14	3,29	5,42	ns
Error	24,84	15	1,66				

ns: no significativa  
Elaboración propia

A la cuarta semana todos los tratamientos presentan germinación (ver cuadro 16), de los que no la presentaron la semana anterior en el un caso se iguala a los demás y en el otro queda algo rezagado (M1F1, R3 y M2F2, R4).

**Cuadro 16.** Porcentaje de germinación a la cuarta semana

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	15	15	15	15	60	15,00
M1F2	20	30	30	40	120	30,00
M1F3	40	40	30	40	150	37,50
M2F1	30	30	30	40	130	32,50
M2F2	40	20	40	15	115	28,75
M2F3	40	40	40	30	150	37,50
Total Rep.	185	175	185	180	725	181,25
Media	30,83	29,17	30,83	30,00	120,83	30,21

Elaboración propia

El ADEVA establece diferencia estadística significativa para tratamientos y fotoperiodos (ver cuadro 17).

**Cuadro 17.** Análisis de varianza de porcentaje de germinación a la cuarta semana

FV	SC	gl	CM	F.O	0,05	0,01	
TOTAL	2.323,96	23					
Tratamientos	1.380,21	5	276,04	4,44	3,06	4,89	*
Medios	176,04	1	176,04	2,83	4,54	8,68	Ns
Fotoperiodos	764,58	2	382,29	6,15	3,68	6,36	*
MXF	439,58	2	219,79	3,54	3,68	6,36	Ns
Repeticiones	11,46	3	3,82	0,06	3,29	5,42	Ns
Error	932,29	15	62,15				

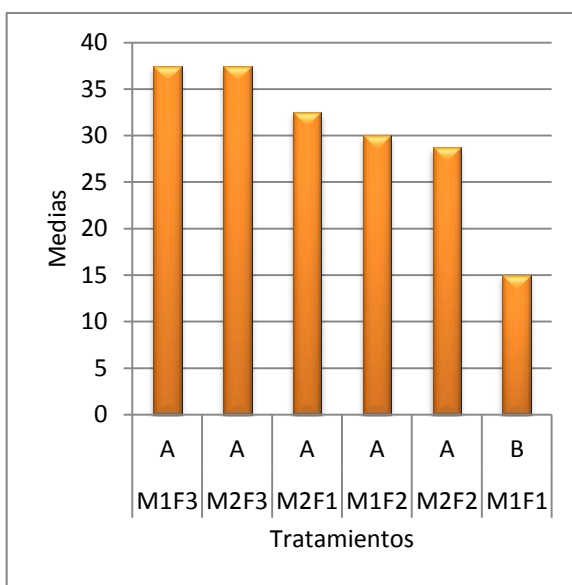
ns= no significativo

\*= significativo

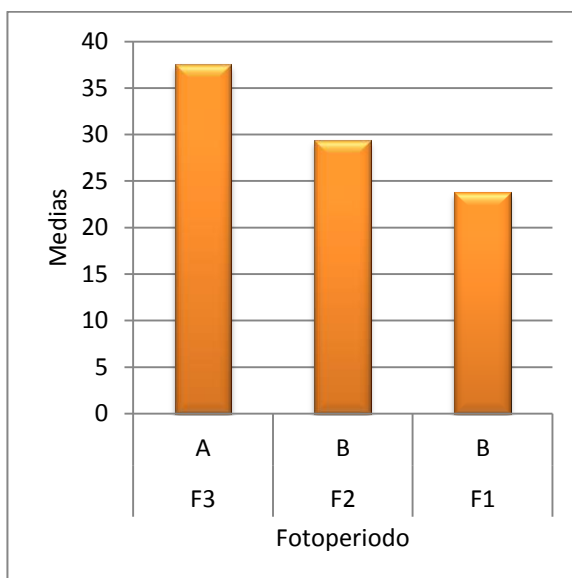
Elaboración propia

Efectuada la prueba de Duncan al 5% para el porcentaje de germinación a la cuarta semana, se establecen dos rangos para tratamientos, primando en el rango A, el M1F3 y el M2F3 a la vez que comparte con M2F1 (ver figura 21).

Realizada la misma prueba para fotoperiodos se determinan igualmente dos rangos sobresaliendo el fotoperiodo de 16 horas (rango A) (ver figura.22).



**Fig. 21.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la cuarta semana  
Elaboración propia



**Fig. 22.** Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en porcentaje de germinación a la cuarta semana  
Elaboración propia

Los datos tomados de porcentaje de germinación a la quinta semana a partir de la fecha de siembra (ver cuadro 18), en el cual se observa que los tratamientos (M1F1 R3 y M2F2 R4), rezagados en el primer registro hoy supera a sus respectivas repeticiones. Es decir tuvieron un desarrollo acelerado en una semana (ver cuadro 14).

**Cuadro 18.** Porcentaje de germinación a la quinta semana.

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	20	20	30	20	90	22,50
M1F2	25	40	40	50	155	38,75
M1F3	50	50	40	50	190	47,50
M2F1	40	40	40	50	170	42,50
M2F2	50	25	50	30	155	38,75
M2F3	50	50	50	40	190	47,50
Total Rep.	235	225	250	240	950	237,50
Media	39,17	37,50	41,67	40,00	158,33	39,58

Elaboración propia

El ADEVA señala que existe significancia estadística en tratamientos, fotoperiodos y la interacción de los factores en estudio (ver cuadro 19).

**Cuadro 19.** Análisis de varianza del porcentaje de germinación a la quinta semana

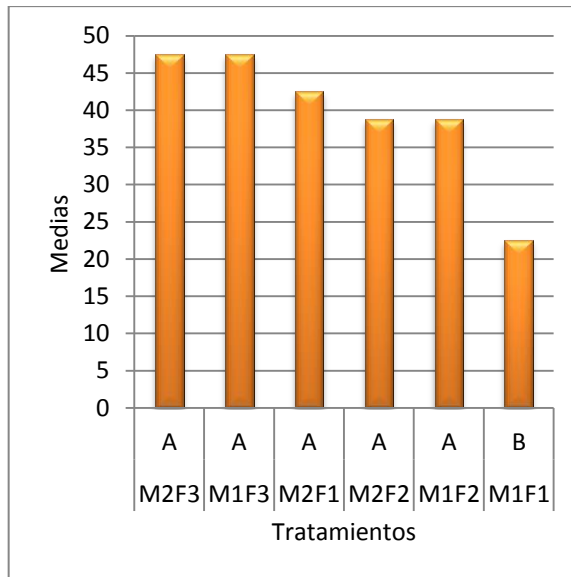
FV	SC	gl	CM	F.O	0,05	0,01	
TOTAL	2.845,83	23					
Tratamientos	1.708,33	5	341,67	4,73	3,06	4,89	*
Medios	266,67	1	266,67	3,69	4,54	8,68	Ns
Fotoperiodos	908,33	2	454,17	6,29	3,68	6,36	*
MXF	533,33	2	266,67	3,69	3,68	6,36	*
Rep	54,17	3	18,06	0,25	3,29	5,42	Ns
Error	1.083,33	15	72,22				

ns= no significativo

\*= significativo

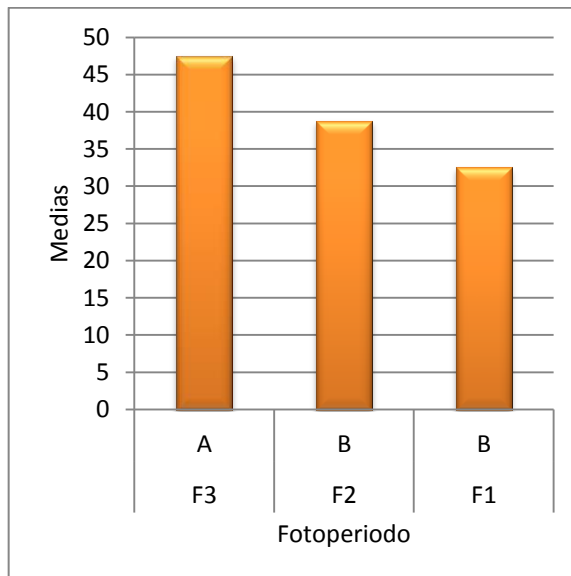
Elaboración propia

La prueba de Duncan al 5% para tratamientos determina dos rangos, destacándose en el rango A, un conjunto de cinco tratamientos, y son valorados estadísticamente como similares (ver figura 23).



**Fig. 23.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la quinta semana  
Elaboración propia

De igual manera para fotoperiodos en porcentaje de germinación la prueba de Duncan al 5% establece dos rangos destacándose el F3 (ver figura 24).



**Fig. 24.** Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en porcentajes de germinación a la quinta semana  
Elaboración propia

Los datos de porcentaje de germinación a la sexta semana, presenta la superioridad del tratamiento M2F1 en su cuarta medición (ver cuadro 20).

**Cuadro 20.** Porcentaje de germinación a la sexta semana

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	30	30	40	30	130	32,50
M1F2	30	60	60	60	210	52,50
M1F3	60	60	60	60	240	60,00
M2F1	60	60	60	70	250	62,50
M2F2	60	30	60	40	190	47,50
M2F3	60	60	60	60	240	60,00
Total Rep.	300	300	340	320	1260	315,00
Media	50,00	50,00	56,67	53,33	210,00	52,50

Elaboración propia

Calculado el ADEVA se determina la existencia de diferencia estadística altamente significativa para tratamientos e interacciones, en tanto que es significativa para medios y fotoperiodos (ver cuadro 21).

**Cuadro 21.** Análisis de varianza del porcentaje de germinación a la sexta semana

FV	SC	gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	4.050,00	23					
Tratamientos	2.550,00	5	510,00	5,81	3,06	4,89	**
Medios	416,67	1	416,67	4,75	4,54	8,68	*
Fotoperiodos	700,00	2	350,00	3,99	3,68	6,36	*
MXF	1.433,33	2	716,67	8,16	3,68	6,36	**
Repeticiones	183,33	3	61,11	0,70	3,29	5,42	ns
Error	1.316,67	15	87,78				

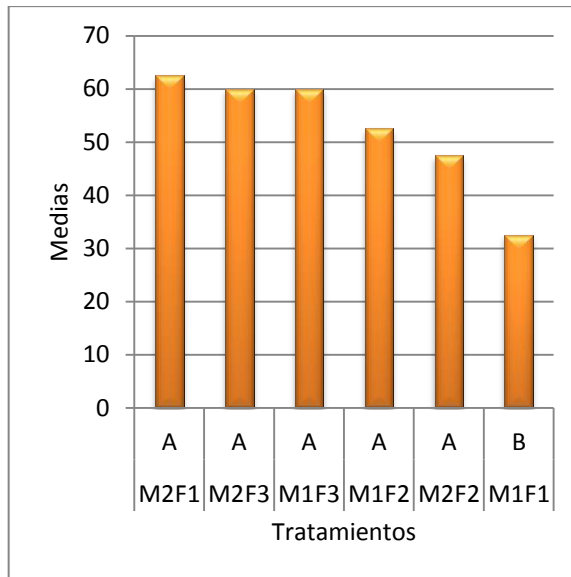
ns= no significativo

\*= significativo

\*\*altamente significante

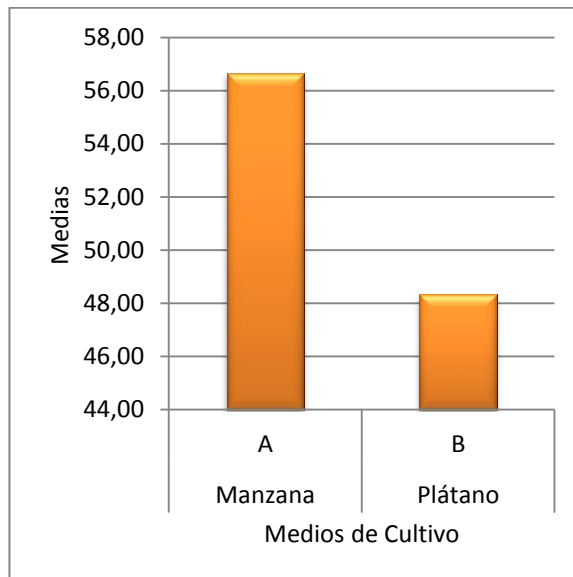
Elaboración propia

Elaborada la prueba de Duncan al 5% para tratamientos fija dos rangos, donde se destaca la superioridad del medio de manzana por tener sus tratamientos en el rango A (ver figura 25).



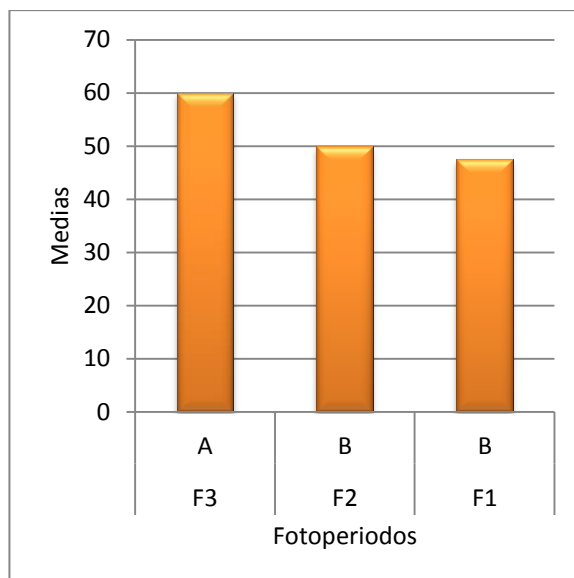
**Fig. 25.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación la sexta semana  
Elaboración propia

De acuerdo a la prueba de Duncan al 5% para medios de cultivo se ratifica la superioridad del medio a base de manzana en porcentaje de germinación a la sexta semana (ver figura 26).



**Fig. 26.** Prueba de Duncan al 5% para medios de cultivo a la sexta semana de germinación  
Elaboración propia

Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos señala que con 16 horas luz (F3), se presenta un mayor porcentaje de germinación, a la semana sexta (ver figura 27).



**Fig. 27.** Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodo en porcentajes de germinación a la sexta semana  
Elaboración propia

Los datos de porcentaje de germinación de la séptima semana se detallan en el (cuadro 22).

**Cuadro 22.** Porcentajes de germinación a la séptima semana.

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	50	40	50	50	190	47,50
M1F2	40	70	70	70	250	62,50
M1F3	70	70	70	70	280	70,00
M2F1	70	70	70	80	290	72,50
M2F2	70	40	70	50	230	57,50
M2F3	70	70	70	70	280	70,00
Total Rep.	370	360	400	390	1520	380,00
Media	61,67	60,00	66,67	65,00	253,33	63,33

Elaboración propia

Según el ADEVA existe significancia estadística para tratamientos y la interacción de factores (ver cuadro 23).

En base a la prueba de Duncan al 5% para tratamientos se establece dos rangos, en donde se destaca la presencia de los tratamientos del medio de manzana, junto con otros dos, en el rango A (ver figura 28).

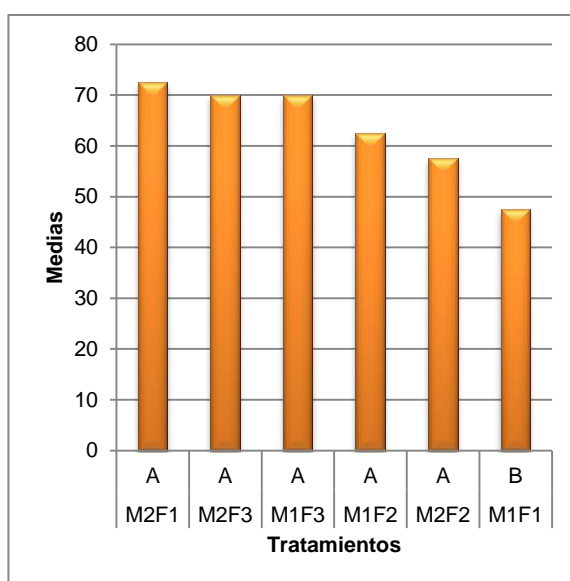
**Cuadro 23.** Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la séptima semana

FV	SC	gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	3.333,33	23					
Tratamientos	1.833,33	5	366,67	4,12	3,06	4,89	*
Medios	266,67	1	266,67	3,00	4,54	8,68	Ns
Fotoperiodos	533,33	2	266,67	3,00	3,68	6,36	Ns
MXF	1.033,33	2	516,67	5,81	3,68	6,36	*
Repeticiones	166,67	3	55,56	0,62	3,29	5,42	Ns
Error	1.333,33	15	88,89				

ns= no significativo

\*= significativo

Elaboración propia



**Fig. 28.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la séptima semana

Elaboración propia

Los datos obtenidos en porcentaje a la octava semana muestran que el tratamiento M2F1 obtuvo el mayor porcentaje de germinación, (ver cuadro 24).

**Cuadro 24.** Porcentajes de germinación a la octava semana

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	70	60	60	70	260	65,00
M1F2	60	80	80	80	300	75,00
M1F3	80	80	80	80	320	80,00
M2F1	80	80	80	90	330	82,50
M2F2	80	60	80	60	280	70,00
M2F3	80	80	80	80	320	80,00
Total Rep.	450	440	460	460	1.810	452,50
Media	75,00	73,33	76,67	76,67	301,67	75,42

Elaboración propia

Realizado el ADEVA este determina diferencia estadística significativa para tratamientos e interacciones (ver cuadro 25).

**Cuadro 25.** Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la octava semana

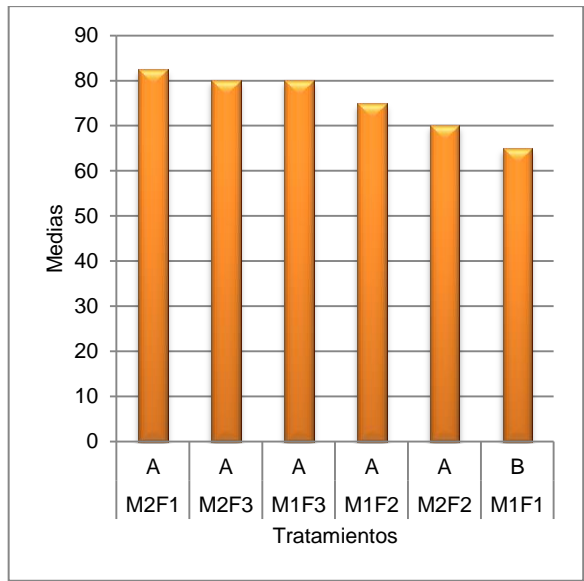
FV	SC	gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	1.795,83	23					
Tratamientos	920,83	5	184,17	3,33	3,06	4,89	*
Medios	104,17	1	104,17	1,88	4,54	8,68	Ns
Fotoperiodos	258,33	2	129,17	2,34	3,68	6,36	Ns
MXF	558,33	2	279,17	5,05	3,68	6,36	*
Repeticiones	45,83	3	15,28	0,28	3,29	5,42	Ns
Error	829,17	15	55,28				

ns= no significativo

\*= significativo

Elaboración propia

La prueba de Duncan al 5% para tratamientos establece dos rangos compartiendo en A los tratamientos M2F1, M2F3, M1F3, M1F2, M2F2 a la octava semana de germinación (ver figura 29).



**Fig. 29.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la octava semana  
Elaboración propia

En la novena semana, los datos de porcentaje de germinación indican que los tratamientos M1F3, M2F3 alcanzan en la mayoría de sus repeticiones el 100% de germinación (ver cuadro 26).

**Cuadro 26.** Porcentajes de germinación a la novena semana

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	80	80	70	80	310	77,50
M1F2	80	90	90	100	360	90,00
M1F3	100	100	90	100	390	97,50
M2F1	90	90	90	100	370	92,50
M2F2	100	80	100	70	350	87,50
M2F3	100	100	100	80	380	95,00
Tota Rep.	550	540	540	530	2.160	540,00
Media	91,67	90,00	90,00	88,33	360,00	90,00

Elaboración propia

Según el ADEVA, se demuestra que no existe significancia estadística en tratamientos, medios, fotoperiodos e interacciones entendiéndose que existe un comportamiento similar en cada uno de ellos (ver cuadro 27).

**Cuadro 27.** Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la novena semana

FV	SC	gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	2.400,00	23					
Tratamientos	1.000,00	5	200,00	2,20	3,06	4,89	Ns
Medios	66,67	1	66,67	0,73	4,54	8,68	Ns
Fotoperiodos	525,00	2	262,50	2,88	3,68	6,36	Ns
MXF	408,33	2	204,17	2,24	3,68	6,36	Ns
Repeticiones	33,33	3	11,11	0,12	3,29	5,42	Ns
Error	1.366,67	15	91,11				

ns= no significativo

Elaboración propia

La mayoría de los tratamientos alcanzan su porcentaje total de germinación (100%) a la décima semana (ver cuadro 28).

**Cuadro 28.** Porcentajes de germinación a la décima semana

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	90	90	80	90	350	87,50
M1F2	90	100	100	100	390	97,50
M1F3	100	100	100	100	400	100,00
M2F1	100	100	100	100	400	100,00
M2F2	100	90	100	80	370	92,50
M2F3	100	100	100	100	400	100,00
Total Rep.	580	580	580	570	2310	577,50
Media	96,67	96,67	96,67	95,00	385,00	96,25

Elaboración propia

El ADEVA determina la existencia de diferencia estadística significativa en tratamientos e interacciones (ver cuadro 29).

**Cuadro 29.** Análisis de varianza en porcentajes de germinación a la décima semana

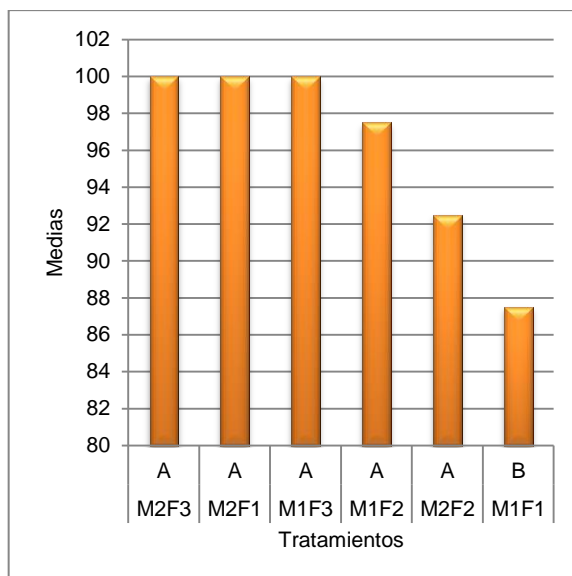
FV	SC	Gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	962,50	23					
Tratamientos	537,50	5	107,50	3,91	3,06	4,89	*
Medios	37,50	1	37,50	1,36	4,54	8,68	Ns
Fotoperiodos	175,00	2	87,50	3,18	3,68	6,36	Ns
MXF	325,00	2	162,50	5,91	3,68	6,36	*
Repeticiones	12,50	3	4,17	0,15	3,29	5,42	Ns
Error	412,50	15	27,50				

ns= no significativo

\*= significativo

Elaboración propia

La prueba de Duncan al 5% de porcentaje germinación a la décima semana establece dos rangos, en el A sobresalen M2F3, M2F1, M1F3, y además se encuentran M1F2, M2F2 (ver figura 30).



**Fig. 30.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentaje de germinación a la décima semana  
Elaboración propia

En la undécima semana los datos recogidos de porcentaje de germinación hacen referencia que se alcanzó un 100%, tanto en el medio de plátano, y también de manzana con excepción de M2F2 (R4) (ver cuadro 30).

**Cuadro 30.** Porcentajes de germinación a la onceava semana

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	100	100	90	100	390	97,50
M1F2	100	100	100	100	400	100,00
M1F3	100	100	100	100	400	100,00
M2F1	100	100	100	100	400	100,00
M2F2	100	100	100	90	390	97,50
M2F3	100	100	100	100	400	100,00
Total Rep.	600	600	590	590	2380	595,00
Media	100,00	100,00	98,33	98,33	396,67	99,17

Elaboración propia

Efectuado el ADEVA para la undécima semana en porcentaje de germinación, se indica la no existencia de significancia estadística deduciendo que los mismos se comportaron de manera similar (ver cuadro 30).

**Cuadro 31.** Análisis de varianza en porcentaje de germinación a la onceava semana

FV	SC	gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	183,33	23					
Tratamientos	33,33	5	6,67	0,75	3,06	4,89	ns
Medios	0,00	1	0,00	0,00	4,54	8,68	ns
Fotoperiodos	8,33	2	4,17	0,47	3,68	6,36	ns
MXF	25,00	2	12,50	1,41	3,68	6,36	ns
Repeticiones	16,67	3	5,56	0,63	3,29	5,42	ns
Error	133,33	15	8,89				

ns= no significativo

Elaboración propia

## 4.2 FORMACIÓN DE PROTOCORMOS

Finalizada la germinación, fase en la cual se da el engrosamiento del embrión, cinco semanas después se observó la formación de protocormos en el tratamiento M1, (plátano) mientras que en M2 (manzana) se detectó un cambio de coloración de los embriones pasando de un color verde claro hacia un amarillo, permaneciendo así sin presentar cambios en su estructura hasta el final del experimento.

En la semana 17 a partir de la siembra, se registra el inicio de la formación de protocormos, en algunos tratamientos (ver cuadro 32).

**Cuadro 32.** Porcentaje de formación de protocormos a la semana 17

(Datos transformados a  $\sqrt{x+0,5}$ )

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	0,70	0,70	0,70	3,24	5,34	1,34
M1F2	4,52	4,52	4,52	4,52	18,08	4,52
M1F3	3,24	7,10	3,24	7,10	20,68	5,17
Total	8,46	12,32	8,46	14,86	44,10	11,03
Media	2,82	4,11	2,82	4,95	14,70	3,68

Elaboración propia

Ejecutado el ADEVA, este presenta diferencia estadística altamente significativa para fotoperiodos y significativa en tratamientos (ver cuadro 33).

**Cuadro 33.** Análisis de varianza en porcentajes de formación de protocormos a la semana 17

FV	SC	gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	53,44	11					
Tratamientos	33,70	2	16,85	10,22	5,14	10,92	*
Fotoperiodos	98,95	2	49,48	30,01	5,14	10,92	**
Repeticiones	9,85	3	3,28	1,99	4,76	9,78	ns
Error	9,89	6	1,65				

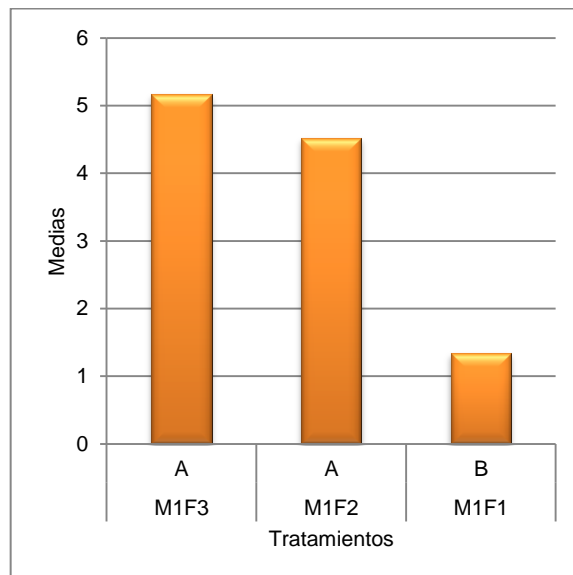
ns= no significativo

\*= significativo

\*\*= altamente significativo

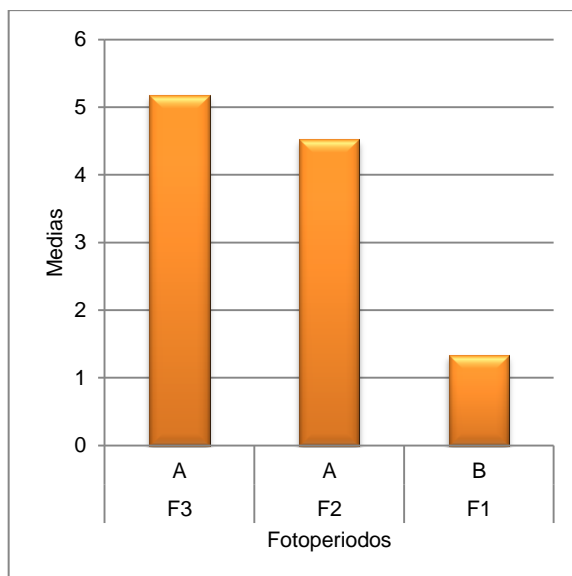
Elaboración propia

La prueba de Duncan al 5% para tratamiento a la semana 17 en formación de protocormos determina dos rangos en el medio plátano, sobresaliendo el tratamiento M1 (ver figura 31) y el fotoperiodo F3 (16 horas luz) (ver figura 32).



**Fig. 31.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en porcentajes de formación de protocormos a la semana 17

Elaboración propia



**Fig. 32.** Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en porcentajes de formación de protocormos  
Elaboración propia

A la semana 18, el cuadro 34 presenta los datos de porcentaje de formación de protocormos, (transformados a  $\sqrt{x+0,5}$ ).

**Cuadro 34.** Datos de la semana 18 formaciones de protocormos

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	0,70	3,24	7,10	5,52	16,56	4,14
M1F2	7,10	7,10	5,52	7,10	26,82	6,71
M1F3	8,39	10,02	10,02	10,02	38,45	9,61
Total Rep.	16,19	20,36	22,64	22,64	81,83	20,46
Media	5,40	6,79	7,55	7,55	27,28	6,82

Elaboración propia

El ADEVA para porcentaje de formación de protocormos, a la semana 18, detalla la existencia de diferencia estadística altamente significativa para fotoperiodos y significativa para tratamientos (ver cuadro 35).

**Cuadro 35.** Análisis de varianza de formación de protocormos

FV	SC	gl	CM	F.O	0.05	0.01	
Total	87,15	11					
Tratamientos	59,97	2	29,99	10,04	5,14	10,92	*
Fotoperiodos	265,97	2	132,99	44,51	5,14	10,92	**
Repeticiones	9,25	3	3,08	1,03	4,76	9,78	Ns
Error	17,93	6	2,99				

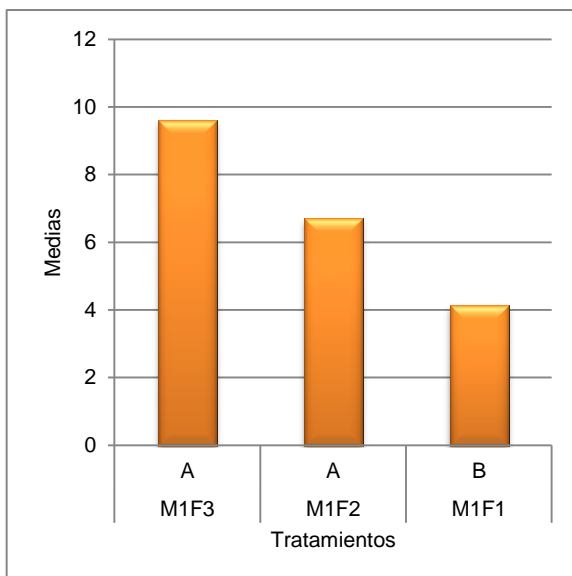
ns= no significativo

\* = significativo

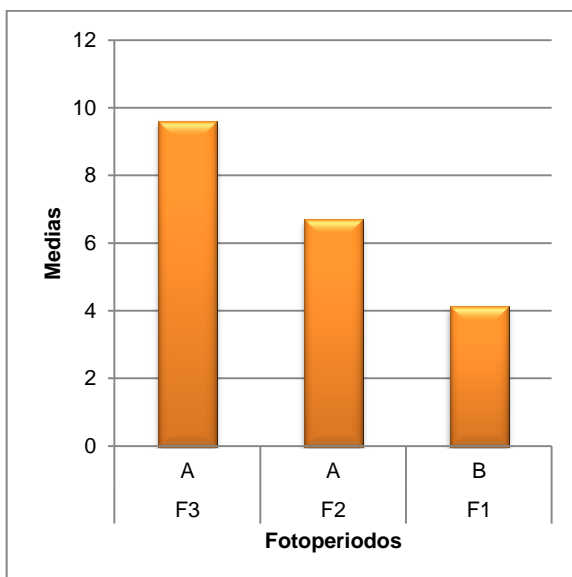
\*\*= altamente significativo

Elaboración propia

La prueba de Duncan al 5% para tratamientos y fotoperiodos en porcentajes de formación de protocormos, (semana 18) establece dos rangos destacándose el tratamiento M1F3 (ver figura 33) y el fotoperiodo F3 (ver figura 34).



**Fig. 33.** Prueba de Duncan al 5% en porcentaje de formación de protocormos en tratamientos a la semana 18  
Elaboración propia



**Fig. 34.** Prueba de Duncan al 5% en fotoperiodos para la formación de protocormos a la semana 18  
Elaboración propia

A la semana 19 el porcentaje de formación de protocormos llega a su fin (ver cuadro 36).

**Cuadro 36.** Porcentaje de formación de protocormos a la semana 19

Tratamientos	Repeticiones				Suma Total	Media
	I	II	III	IV		
M1F1	50	50	70	50	220	55
M1F2	100	100	100	100	400	100
M1F3	100	100	100	100	400	100
Total Rep.	250	250	270	250	1020	255
Media	83,33	83,33	90,00	83,33	340,00	85,00

Elaboración propia

El ADEVA, para porcentajes de formación de protocormos establece la existencia de diferencia estadística altamente significativa para tratamientos y fotoperiodos (ver cuadro 37).

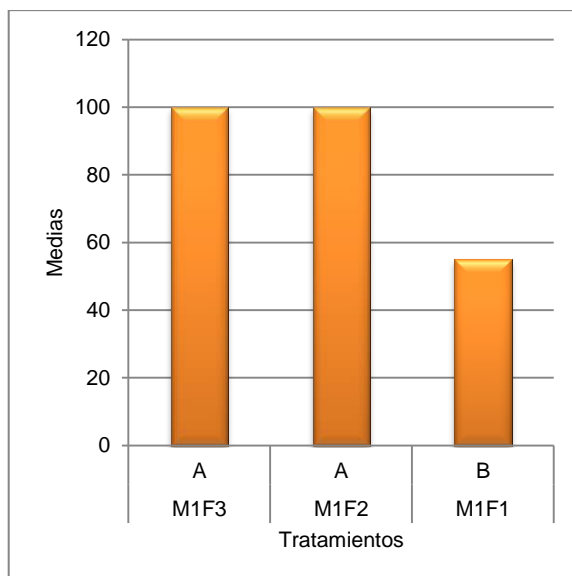
**Cuadro 37.** Análisis de varianza en porcentajes de formación de protocormos a la semana 19

FV	SC	gl	CM	F	F.r		
Total	5.700,00	11			0,5	0,1	
Tratamientos	5.400,00	2	2700,00	81,00	5,14	10,92	**
Fotoperiodos	36.100,00	2	18050,00	541,50	5,14	10,92	**
Repeticiones	100,00	3	33,33	1,00	4,76	9,78	Ns
Error	200,00	6	33,33				

\*\*= altamente significativo

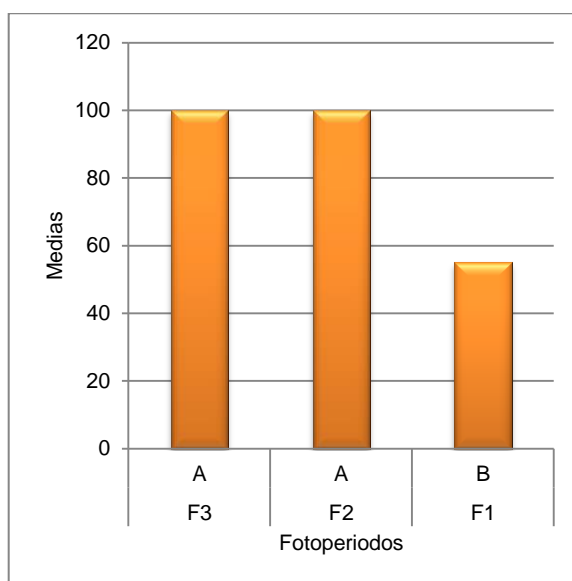
Elaboración propia

La prueba de Duncan al 5% en porcentaje formación de protocormos (semana 19), para tratamientos determina dos rangos, sobresaliendo M1F3 y M1F2 (ver figura 35).



**Fig. 35.** Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en la formación de protocormos a la semana 19  
Elaboración propia

En cuanto a fotoperiodos la existencia de dos rangos determina el comportamiento similar de F3 y F2 (rango A), (ver figura 36).



**Fig. 36.** Prueba de Duncan al 5% para fotoperiodos en la formación de protocormos a la semana 19  
Elaboración propia

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1 CONCLUSIONES**

En base a los resultados obtenidos se concluye:

El proceso de germinación inicia a la tercera semana en todos los tratamientos siendo a la cuarta donde se observa un mayor porcentaje en el medio a base de manzana con el fotoperiodo de 16 horas luz manteniéndose la tendencia hasta la sexta.

Desde la séptima semana hasta la décima se mantiene el ritmo de germinación en el medio manzana, pero ya no siendo influenciado por el fotoperiodo.

A partir de la undécima semana todos los tratamientos tienen un comportamiento similar llegando a un 100% de germinación.

El tratamiento a base de plátano con 8 horas luz presentó desde un inicio retraso germinativo a diferencia de los demás en estudio hasta la décima semana.

En el medio a base de manzana se detecta a partir de la duodécima semana una detención del proceso germinativo, evidenciado por un amarillamiento de las semillas germinadas.

La formación de protocormos se observa a partir de la semana 17 en el medio plátano sobresaliendo el fotoperiodo de 16 horas luz y manteniéndose así una semana más.

En la formación de protocormos los fotoperiodos de 12 y 16 horas luz se comportan de manera similar en la semana 19.

El fotoperiodo de 8 horas luz durante las semanas evaluadas demostró un retraso para germinación y formación de protocormos.

Experiencias realizadas por el Ing. Francisco Merchan demuestran que en germinación de orquídeas el agua de coco no tiene mayor influencia en la germinación, más si en el desarrollo de las plántulas

La utilización de un fotoperiodo de 16 horas luz en el medio a base de plátano permite ganar tiempo en la formación de protocormos y la obtención de plantas en menor tiempo.

El proceso de propagación in vitro es una gran alternativa para apoyar a la biodiversidad de especies que se encuentran en peligro de desaparecer, gracias a este método de multiplicación se logró conservar y mantener plantas endémicas.

## 5.2 RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones obtenidas se recomienda:

La utilización del medio casero a base de plátano con un fotoperiodo de 16 horas luz ya que con este tratamiento se alcanzaron los objetivos propuestos, la germinación de semillas y formación de protocormos.

Usar vitaminas y soluciones gelificantes más económicas que la tiamina y el Agar-agar.

Para el medio a base de manzana usar combinaciones con productos ricos en minerales y vitaminas que ayuden a obtener mejores resultados.

Utilizar frascos de boca ancha ya que permite un trabajo rápido, esto ayuda evitar el contacto de la plántula con el envase para disminuir la contaminación

Por facilidad de manipuleo se recomienda tapar las botellas con corchos de caucho con mecha de algodón, que permitan el intercambio de gases.

Probar en el medio a base de manzana cantidades de agar-agar ya que la manzana contiene pectinas y taninos que contribuyen a la gelificación del medio dando como un resultado un medio duro y no adecuado para siembra de la semilla.

Se debe tomar en cuenta la conductividad eléctrica en la preparación del medio ya que para germinación se necesita concentraciones bajas, mientras que para el desarrollo de plántulas cantidades altas.

Probar espectros de luz, en nuevas investigaciones, por la influencia de la luz roja y azul en la germinación de semillas y en el desarrollo de plantines, según la información generada en varios estudios

## BIBLIOGRAFÍA

1. MCKENDRICK, Sheena. Manual para la germinación in vitro de orquídeas. [en línea] 12 de Marzo de 2000. [Citado el: 12 de diciembre de 2014.] [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf).
2. MENCHACA, Rebeca. Manual para la propagación de orquídeas. [en línea] 2011. [Citado el: 12 de Diciembre de 2014.] [http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/Manual\\_para\\_la\\_propagación\\_de\\_orquideas.pdf](http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/Manual_para_la_propagación_de_orquideas.pdf).
3. AJÚ, María. Las orquídeas bases generales para su conocimiento y enseñanza. [en línea] Junio de 2009. [Citado el: 12 de Enero de 2014.] [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/07/07\\_2092.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/07/07_2092.pdf).
4. RODRÍGUEZ, L, GONZÁLEZ, R; DÍAZ, A; FAJARDO, E; SÁNCHEZ, E; HERNÁNDEZ, J; CASTAÑERA, M. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. [en línea] 2005. [Citado el: 20 de Mayo de 2013.] <http://www.orquidarionsdodesterro.com.br/fotos/4da2fbe4ef76e.pdf>.
5. ORQUIDEOTECA. Todo orquídeas cultivo in vitro. [en línea] 22 de Julio de 2008. [Citado el: 16 de diciembre de 2014.] <http://orquideoteca.blogspot.com/2008/07/frmulas-para-epfitas-y-terrestres.html>.
6. MAYO, Alberto, CÁZARES, Jaime; DE LA CRUZ, Efraín; FLORES, Alejandro. Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas. [en línea] 2010. [Citado el: 24 de Mayo de 2013.] <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf>.
7. MERINO, Gilberto. Características botánicas de *Cyrtochilum edwardii*. Cuenca, 17 de Diciembre de 2014.
8. PORTILLA, Mario. Orquideas. [entrev.] Roberto INGA. Cuenca, 25 de Abril de 2013.
9. OREJUELA, Jorge. La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali, municipio de. Cali : El Hombre y la Maquina, 2010. 35. 0121-0777.
10. CADENA, Edison. Jardín Botánico de Quito. [en línea] Ecuador Planeta maggio, 2006. [Citado el: 20 de Julio de 2015.] [http://www.jardinbotanicoquito.8m.com/jbq\\_orquidiariowhat.htm](http://www.jardinbotanicoquito.8m.com/jbq_orquidiariowhat.htm).
11. CÁRDENAS, Nelly; CRUZ, Andrea. Colección de germoplasma de especies de la familia orchidaceae del cantón Santiago de Méndez -Morona Santiago. [en línea] Octubre de 2012. [Citado el: 18 de Julio de 2015.] [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/UPS-QT03421%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/UPS-QT03421%20(1).pdf).

12. MINISTERIO DE TURISMO. Orquídeas en el Ecuador. [www.visit.ecuador.travel](http://www.visit.ecuador.travel). [en línea] 2013. [Citado el: 20 de Julio de 2015.] [http://visit.ecuador.travel/orquideas/index.php?option=com\\_tz\\_portfolio&view=article&id=64&Itemid=118](http://visit.ecuador.travel/orquideas/index.php?option=com_tz_portfolio&view=article&id=64&Itemid=118).
13. MINISTERIO DE TURISMO. Oficialmente Ecuador es el país de las orquídeas. Ecuador ama la vida. 09 de Diciembre de 2013, págs. <http://www.turismo.gob.ec/oficialmente-ecuador-es-el-pais-de-las-orquideas/>.
14. LARESERVA.COM. Descubren la orquídea más pequeña del mundo. [en línea] 14 de Septiembre de 2010. [Citado el: 17 de Julio de 2015.] [http://www.lareserva.com/home/orquidea\\_mas\\_pequena](http://www.lareserva.com/home/orquidea_mas_pequena).
15. EL UNIVERSO. Orquídea mas grande del mundo florese en la urbe. [en línea] 27 de Abril de 2013. [Citado el: 7 de Julio de 2015.] <http://www.eluniverso.com/2013/04/27/1/1445/orquidea-mas-grande-mundo-florece-urbe.html>.
16. NIEVES, José. Descubren la orquídea más pequeña del mundo. [en línea] 3 de Diciembre de 2009. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://www.abc.es/20091203/ciencia-tecnologia-biologia-botanica/descubren-orquidea-pequena-mundo-200912031111.html>.
17. ANDRADE, Luis. Orquidia nacional florece en el mundo. Explored red. 2008.
18. INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. The International Plant Names Index. [en línea] 2005. [Citado el: 17 de Julio de 2015.] [http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do;jsessionid=A65706E1C0A9ACE2C39197AF981DCB8B?id=172285-2&back\\_page=.](http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do;jsessionid=A65706E1C0A9ACE2C39197AF981DCB8B?id=172285-2&back_page=)
19. KEW ROYAL BOTANIC GARDENS. *Cyrtochilum edwardii*. [en línea] [Citado el: 19 de Junio de 2014.] [http://apps.kew.org/wcsp/synonymy.do?name\\_id=54518](http://apps.kew.org/wcsp/synonymy.do?name_id=54518).
20. Internet Orchid Species Phopo Encyclopedia. Orchid. [en línea] 2014. [Citado el: 28 de Mayo de 2013.] <http://www.orchidspecies.com/odontedwardii.htm>.
21. SÁNCHEZ, Eduardo. Micropropagación una obligación moral. Cuenca : ESS, 2009.
22. TROPICOS. *Cyrtochilum edwardii*. [en línea] 2010. [Citado el: 20 de Enero de 2015.] <http://www.tropicos.org/Name/100178310>.
23. WIKIPEDIA. *Cyrtochilum edwardii*. [en línea] 14 de Noviembre de 2013. [Citado el: 12 de Diciembre de 2014.] [https://commons.wikimedia.org/wiki/Cyrtochilum\\_edwardii](https://commons.wikimedia.org/wiki/Cyrtochilum_edwardii).
24. VARIGOS, John. *Cyrtochilum edwardii*. [en línea] 12 de Noviembre de 2012. [Citado el: 21 de Julio de 2015.] <https://www.flickr.com/photos/jvinoz/8210935272>.

25. MUÑOZ, Martín. Evaluación de medios de cultivo para la germinación in vitro de las orquídeas *Cyrtochilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rchb.F. [en línea] 29 de Septiembre de 2011. [Citado el: 22 de Julio de 2015.] [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/876/1/Tesis\\_t001agr.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/876/1/Tesis_t001agr.pdf).
26. IJARDINEROS. Características Anatómicas de las semillas de orquídeas. [en línea] 17 de Agosto de 2010. [Citado el: 22 de Julio de 2015.] <http://ijardineros.com/orquideas/caracteristicas-anatomicas-de-las-semillas-de-orquidea>.
27. SANTAMBROSIO, Eduardo, ORTEGA, Marta y GARIBALDI, Pablo. Preparación de medios de cultivo. [en línea] Universidad Tecnológica Nacional, 2009. [Citado el: 13 de diciembre de 2014.]. [http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicol.pdf](http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicol.pdf).
28. MOLINA, Jessibel. Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Comparettia speciosa* Rchb. f. [en línea] 2012. [Citado el: 22 de Mayo de 2013.] <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/387/1/TESIS.pdf>.
29. HOYOS, Luis y RODRÍGUEZ, Andrea. Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas. [en línea] Septiembre de 2013. [Citado el: 22 de Julio de 2015.]. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6012/1/UPS-QT04342.pdf>.
30. LEÓN, Marco. Conservación de especies Peruanas de orquídeas utilizando técnicas de cultivo de tejidos in vitro. [en línea] 1995. [Citado el: 22 de Julio de 2015.] <https://es.scribd.com/doc/22293214/4/La-Germinacion-Simbiotica-de-Semillas-de-orquideas>.
31. SALGADO, Jorge. Análisis del costo de producción y evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Rhyncholelia digbyana* en Zamorano. [en línea] Noviembre de 2002. [Citado el: 22 de Julio de 2015.] <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2228/1/T1606.pdf>.
32. PAREDES, Edgar. Determinación de los protocolos para cultivo in vitro de las especies *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium cultratum*. [en línea] Abril de 2012. [Citado el: 16 de Diciembre de 2014.] <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4072/1/UPS-QT02905.pdf>.

33. AVEDAÑO, Darwin. Propagación In Vitro de Orquídeas usando medios de cultivos, soportes y sustratos de bajo costo. [en línea] Facultad de Biología, Mayo de 2008. [Citado el: 15 de Diciembre de 2014.] <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/4733/1/propagacioninvitrodeorquideasusandomediosdecultivosoportesystratosdebajocosto.pdf>.
34. ROCA, Willian y MROGINSKI, Luis. Cultivos de tejidos en la agricultura. fundamentos y Aplicaciones. Cali : XYZ, Cali, Colombia, 1991. 9589183158.
35. RODRIGUEZ, Patricia. Cultivo de tejidos. [en línea] 2013. [Citado el: 27 de Julio de 2015.] [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/Contenido\\_para\\_descarga\\_PDF\\_.pdf](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/Contenido_para_descarga_PDF_.pdf).
36. FIATT, Rodrigo. La nutrición de las orquídeas. [en línea] 2000. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://www.ticorquideas.com/articulo4.htm>.
37. ROCHA, Iván. Fertilizantes para orquídeas. [en línea] 23 de Noviembre de 2012. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://blog.alnatural.com.mx/fertilizante-para-orquideas-en-df/>.
38. SEGRETÍN, María. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). [en línea] 2007. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://www.argenbio.org/adu/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>.
39. MILLER, Erston. Fisiología Vegetal. Mexico : UTEHA, 1981. 9789684384798.
40. KANNABIAN. Funciones de las vitaminas en las plantas. [en línea] 31 de Diciembre de 2011. [Citado el: 23 de Diciembre de 2015.] <http://www.kannabia.co/2011/12/31/funciones-de-las-vitaminas-en-las-plantas/>.
41. ROSALES, José. Micropropagación de *Calahuala Phlebodium pseudoaureum*(Cav) *Lellinger* con tres tipos de explantes en diferentes medios de cultivo in vitro. Guatemala : Univesidad de San Carlos de Guatemala, 2005.
42. MORALES, Gloria, VANEGAS, Luis; GÓMEZ, Diomar; CANON, Jhon; RAMÍREZ, Lorena. Propagación in vitro de orquídeas. Bogotá : Univesidas Abierta y a Distancia, 2009.
43. Ruíz, Jesús. Embriogénesis somática de *Rhynchoaelia glauca*,(Lindley)Schltr. y producción de semilla sintética para la conservación del germoplasma ex situ. [en línea] 2012. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/35093/1/ruizcortesjesus.pdf>.
44. SARDI, Lucía y GUZMÁN, Sandra. Análisi de la variación de la tasa de germinación y crecimiento de las orquídeas *Epidendrum secundum* y *Oncidium excabatum* através de medios de cultivo convencionales combinados con naturales. [en línea] Universidad del Azuay Facultad de Ciencia y Tecnología, 2007. [Citado el: 16 de Diciembre de 2014.] <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/79/1/06583.pdf>.

45. MICROBIOLOGÍA GENERAL UVG. De donde viene el agar. [en línea] 19 de Octubre de 2013. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <https://microbiologiageneraluvg.wordpress.com/2013/10/19/de-donde-viene-el-agar/>.
46. CALVO, Miguel. Agar. [en línea] [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/agar.html>.
47. PORTO, Samuel. Agargel. [en línea] AGARGEL, 2003. [Citado el: 21 de Enero de 2015.] <http://www.agargel.com.br/agar-es.html>.
48. MERCHAN, Francisco. Medios de cultivo, cultivo in vitro, agua de coco, conductividad eléctrica. Orquideas. Cuenca, 28 de Junio de 2015.
49. PATIÑO, Carlos y MOSQUERA, Freyler. Efecto Inductor del Agua de Coco sobre La Germinación de semillas y brotamiento de los Cormos de la Hierba de la Equis *Dracontium grayumianum*. [en línea] 2 de Marzo de 2011. [Citado el: 9 de Febreo de 2015.] [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2011000100010&script=sci\\_arttext.0120-548X](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2011000100010&script=sci_arttext.0120-548X).
50. MORENO, David y MENCHACA, Rebeca. Efectos de los compuestos organicos en la propagación in vitro de *Stanhopea tigrina Bateman* (orchidaceae). [en línea] Agosto de 2007. [Citado el: 16 de Julio de 2015.] <http://www.redalyc.org/pdf/497/49790204.pdf.14057247>.
51. SMITH, Roberta y GOULD, Jean. Toshio Murashige and Folke skoo. [en línea] Department of soil and crop Sciences, 2015. [Citado el: 24 de Enero de 2015.] <https://essm.tamu.edu/media/46257/murashigeandskoogintropapersjanick.pdf>.
52. BADILLO, Jesús, OLIVER, María; MORENO, Karen; PACHECO, Verónica; CORTEZ, Hernán Manual de laboratorio de cultivo de tejidos. [en línea] Instituto Politécnico Nacional, 12 de Agosto de 2009. [Citado el: 13 de Diciembre de 2014.] <http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Manual%20del%20Laboratorio%20de%20Cultivo%20de%20Tejidos%20.pdf>.
53. EVELYN, Maria. Medios de cultivos definidos e indefinidos. [en línea] 15 de Febrero de 2013. [Citado el: 12 de Junio de 2013.] <http://bioloevelyn.blogspot.com/2013/02/tarea-medios-de-cultivo-definidos-e.html>.
54. MURIEL, Alberto. Desarrollo de un producto alimenticio: Láminas de fruta deshidratada, utilizando pulpa de mora y manzana para frozen tropic CIA. LTDA. [en línea] 2013. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/2924/1/56T00416.pdf>.
55. LARA, Juan. Diferencias nutricionales entre un plátano verde y uno maduro. [en línea] 25 de Octubre de 2012. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://www.vitonica.com/alimentos/diferencias-nutricionales-entre-un-platano-verde-y-uno-maduro>.

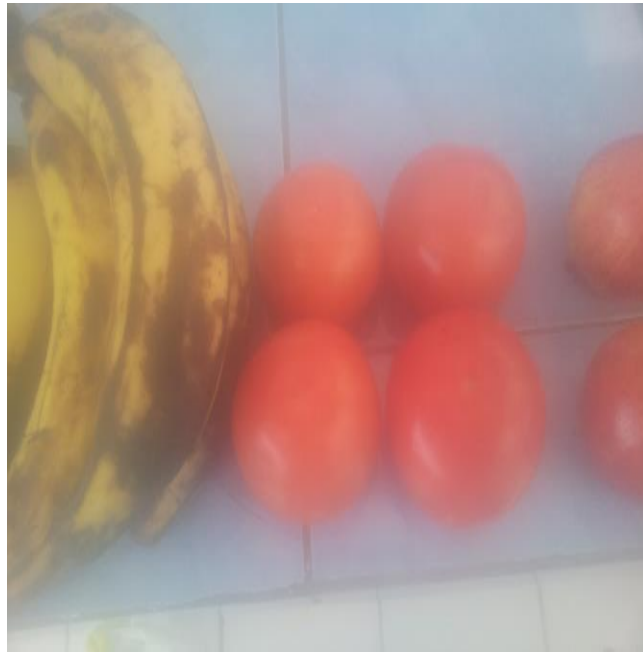
56. NATURSAN. Composición nutricional del plátano. [en línea] Naturvida Factoría de Internet S.L., 2008. [Citado el: 21 de Enero de 2015.] <http://www.natursan.net/informacion-nutricional-platano/>. B-76103522.
57. HERNÁNDEZ, Luz y VIT, Patricia. El Plátano un cultivo tradicional con importancia nutricional. [en línea] Revista del Colegio de Farmacéuticos del Estado Mérida, 2009 de Septiembre de 2013. [Citado el: 16 de Diciembre de 2014.] [http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30260/3/ff2009\\_iiplatano.pdf](http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30260/3/ff2009_iiplatano.pdf).
58. RECALDE, David. Elaboración de una bebida alcohólica de Jícama (*Smallanthus sonchifolius*) y Manzana (*Pyrus malus L.*). [en línea] Escuela Politecnica Nacional, Octubre de 2010. [Citado el: 21 de Enero de 2015.] <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2465/1/CD-3171.pdf>.
59. ALNATURAL. La floración de las orquídeas. [en línea] 2011. [Citado el: 26 de Junio de 2013.] <http://blog.alnatural.com.mx/la-floración-de-las-orquídeas/#more-73>.
60. LEE, Hilda, LAGUNA, Antonio; MURGUÍA, Joaquin; ELORZA, Pablo; IGLESIAS, Lourdes; GARCÍA, Benjamin; BARREDO, Felipe; SANTANA, Nancy. Regeneración in vitro de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. [en línea] 29 de Diciembre de 2007. [Citado el: 7 de Junio de 2015.] <http://www.bioline.org.br/pdf?cg07009>.
61. PAZMIÑO, Rosa. Caracterización Morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la UTPL. [en línea] 2011. <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/1921/BQ%2017.pdf?sequence=1>.
62. CASTILLO, Alicia. Propagación de plantas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. [en línea] 2013. [Citado el: 4 de Marzo de 2014.] <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>.
63. SALGADO, Rafael. La Propagación de plantas in vitro, un éxito biotecnológico. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. [en línea] 29 de Mayo de 2015. [Citado el: 24 de Julio de 2015.] <http://www.sabermas.umich.mx/archivo/secciones-antteriores/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html>. 2007-7041.
64. PORTILLA, Vanesa. Cultivo in vitro. [entrev.] Roberto Inga. *Orquídeas*. Cuenca, 14 de noviembre de 2014.
65. TIZA, Georgina. Propagación in vitro de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*. [en línea] Diciembre de 2010. [Citado el: 26 de Junio de 2015.] <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/31065/1/TizaArias.pdf>.

66. AGROMÁTICA. Agricultura de caracter técnico. [en línea] 05 de Agosto de 2014. [Citado el: 28 de Junio de 2015.] <http://www.agromatica.es/conductividad-electrica-del-agua/>.
67. SIMON, Mauricio, PERALTA, Nahuel y COSTA, José. Relación entre la conductividad eléctrica aparente con propiedades del suelo y nutrientes. [en línea] 3 de Marzo de 2013. [Citado el: 18 de Junio de 2015.] [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-20672013000100005.1850-2067](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672013000100005.1850-2067).
68. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Determinación del pH y conductividad eléctrica del suelo. [en línea] Laboratory methods manual, 1996. [Citado el: 2 de Julio de 2015.] [mct.dgf.uchile.cl/AREAS/medio\\_mod1.1.htm](http://mct.dgf.uchile.cl/AREAS/medio_mod1.1.htm).

## ANEXOS

### ANEXO A: REGISTRO FOTOGRÁFICO

Se presenta una secuencia fotográfica del procedimiento llevado a cabo en la investigación.



}  
**Fig. 1A.** Materiales para la preparación de los medios  
Elaboración propia



**Fig. 1A.** Pesado de plátano  
Elaboración propia



**Fig. 2A.** Pesado del agar-agar  
Elaboración propia



**Fig. 3A.** Licuado de los componentes del medio  
Elaboración propia



**Fig. 4A.** Colación de la solución  
Elaboración propia



**Fig. 5A.** Medidor de pH  
Elaboración propia



**Fig. 6A.** Lavado de botellas  
Elaboración propia



**Fig. 7A.** Etiquetado de botellas  
Elaboración propia



**Fig. 8A.** Colocación de la sustancia en la botella  
Elaboración propia



**Fig. 9A.** Sellado de botellas  
Elaboración propia



**Fig. 10A.** Esterilización de los medios  
Elaboración propia



**Fig. 11A.** Autoclave  
Elaboración propia



**Fig. 12A.** Enfriado del medio  
Elaboración propia



**Fig. 13A.** Aislación de botellas previo a la siembra  
Elaboración propia



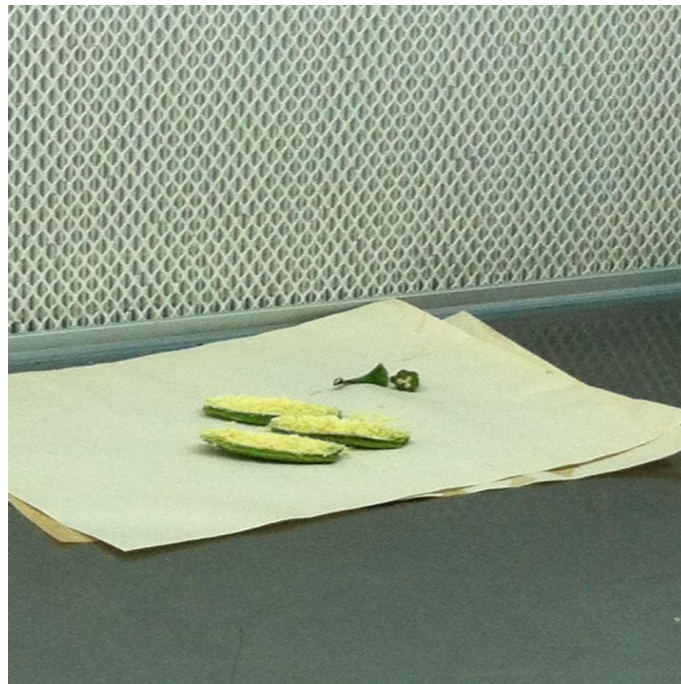
**Fig. 14A.** Cámara de flujo laminar  
Elaboración propia



**Fig. 15A.** Desinfección de la capsula  
Elaboración propia



**Fig. 16A.** Disección de los bordes de la capsula  
Elaboración propia



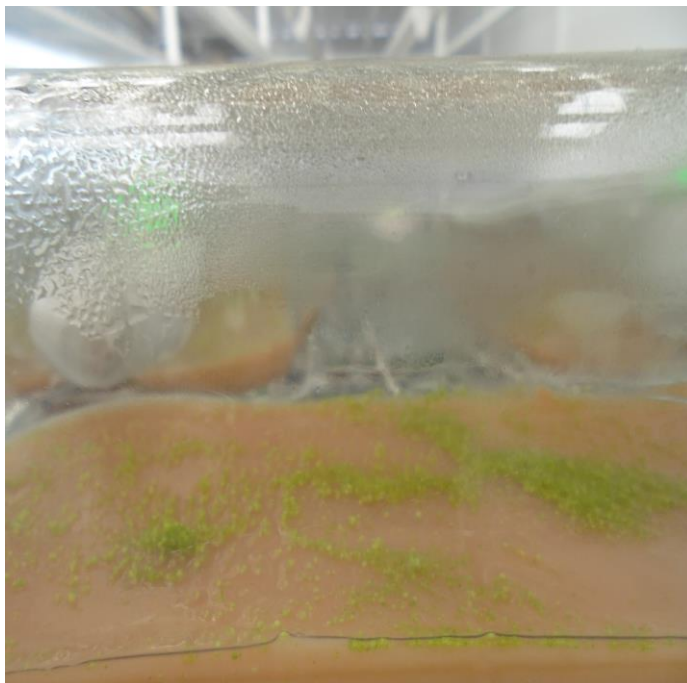
**Fig. 17A.** Abertura de la capsula  
Elaboración propia



**Fig. 18A.** Siembra  
Elaboración propia



**Fig. 19A.** Colocación en las perchas  
Elaboración propia



**Fig. 20A.** Germinación  
Elaboración propia



**Fig. 21A.** Revisión de botellas  
Elaboración propia