



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL

**“Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de Auxinas,
Citoquininas y Giberelinas en la multiplicación *in vitro* de *Epidendrum secundum*,
como pauta para su conservación *in vitro*”**

**Tesis previa la obtención
del título de Ingeniero en
Gestión Ambiental**

Autor: Juan Pablo Jara Izquierdo

Directora: Ing. Augusta Yadira Cueva Agila

LOJA – ECUADOR

2009

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Loja, Marzo de 2009

Ingeniera

Augusta Yadira Cueva Agila

DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UTPL

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis denominado: "Evaluación de la Influencia de diferentes concentraciones de Auxinas, Citoquininas y Giberelinas en la multiplicación *in vitro* de *Epidendrum secundum*, como pauta para su conservación *in vitro*" presentado por el Sr. Juan Pablo Jara Izquierdo, ha sido dirigido, revisado y discutido en todas sus partes. Por lo cual autorizo la presentación, sustentación y defensa del mismo.

Ing. Augusta Yadira Cueva A.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Juan Pablo Jara Izquierdo, autor del trabajo “Evaluación de la Influencia de diferentes concentraciones de Auxinas, Citoquininas y Giberelinas en la multiplicación *in vitro* de *Epidendrum secundum*, como pauta para su conservación *in vitro*” certifico que las ideas, opiniones, criterios y recomendaciones plasmadas en el presente trabajo, son de mi exclusiva responsabilidad y que el mismo ha sido realizado en su integridad y no se ha publicado anteriormente.

Juan Pablo Jara Izquierdo

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Juan Pablo Jara Izquierdo, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad.

Juan Pablo Jara Izquierdo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposa Diana, mis hijos Sebastián, Carolina, y Florcita; a mis padres y hermano.

Juan Pablo

AGRADECIMIENTO

A la oportunidad que la vida me dio de transitar por este mundo.

A mi trabajo, que facilito los recursos; a mi esposa, por ayudarme; a mis hijos, por su curiosidad; a mi madre, por su preocupación; a mi padre, por sus consejos; a mi hermano, por confiar en mí.

También a la UTPL por contar con nuestro servicio de seguridad, a los profesores por su paciencia, a Ximenita por atenderme, a Eliana por su participación, a Ecuadorianorchids por su perseverancia, y de manera especial a la Ing. Augusta Cueva A por toda su colaboración.

Sinceramente gracias.

Juan Pablo Jara Izquierdo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Certificación del Director de Tesis	ii
Autoría	iii
Cesión de Derechos	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice de contenidos	vii
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISION DE BIBLIOGRAFIA	4
3.1. Las Orquídeas	4
3.1.1. Generalidades de las Orquídeas	4
3.1.2. Descripción de las semillas de orquídeas	5
3.1.3. Vida y Reproducción de las Orquídeas en Medio Natural	5
3.2. Características botánicas de la especie <i>Epidendrum secundum</i>	7
3.2.1. Clasificación botánica	7
3.2.2. Etimología e historia	7
3.2.3. Características	7
3.2.4. Ecología	9
3.2.5. Distribución	9
3.3. Cultivo <i>in vitro</i>	10
3.3.1. Definición	10
3.3.2. Generalidades del cultivo <i>in vitro</i>	10
3.3.3. Fundamentos del cultivo <i>in vitro</i>	11
3.3.4. Crecimiento en cultivo <i>in vitro</i>	12
3.4. Medio para el cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	12
3.4.1. Componentes del Medio	13
3.5. Reguladores de Crecimiento	18
3.5.1. Generalidades	18
3.5.2. Auxinas	19
3.5.3. Citoquininas	21
3.5.4. Giberelinas	24
3.5.5. Problemas en la micropropagación	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Materiales	29
4.2. Métodos	31
4.2.1. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog	31
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES	44
7. RECOMENDACIONES	45
8. BIBLIOGRAFIA	46
9. ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis de Auxinas en mg/l	20
Tabla 2. Dosis de Citoquininas en mg/l	23
Tabla 3. Dosis de Giberelinas en mg/l	26
Tabla 4. Medios de cultivo utilizados	32
Tabla 5. Respuesta de crecimiento en plántulas de <i>Epidendrum secundum</i> a los 21, 42, 63 y 84 días	37
Tabla 6. Respuesta de crecimiento de raíces de <i>Epidendrum secundum</i> a los 84 días	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Epidendrum secundum</i>	8
Figura 2. <i>Epidendrum secundum</i> en la naturaleza	9
Figura 3. Reguladores de crecimiento utilizados	18
Figura 4. Cámara de flujo laminar	33
Figura 5. Herramientas modificadas	34
Figura 6. Plántulas de <i>Epidendrum secundum</i> a los 84 días	38
Figura 7. Gráfico de Medias M1D0	39
Figura 8. Gráfico de Medias M1D0	39
Figura 9. Gráfico de Medias M1D0	40
Figura 10. Gráfico de Medias M1D0	40
Figura 11. Gráfico de Medias M1D0	41
Figura 12. Raíces de <i>Epidendrum secundum</i> a los 84 días	43

RESUMEN

Durante los procesos de micropropagación desarrollados en nuestro laboratorio se han comprobado que varias especies de la familia Orchidaceae demuestran comportamientos diferentes al estar sometidos bajo las mismas condiciones *in vitro*, estos diversos resultados son un indicativo de la importancia de desarrollar sistemas de propagación específicos para especies de importancia.

Los resultados de crecimiento de *Epidendrum secundum* en los 4 tratamientos que incluyeron reguladores de crecimiento vegetal demostraron que existe desarrollo vegetativo diferenciado dependiendo de las diversas concentraciones usadas, los mejores resultados provinieron de usar el medio de cultivo M1d1 a 5ml de concentración para crecimiento de las plántulas, al igual que M1d0 a 0ml proporciono mejores resultados en el crecimiento de raíces.

Con la culminación de este trabajo mi propósito es el de motivar a los estudiantes y diversos interesados, a intervenir en el campo de la Biotecnología, micropropagación de especies de interés, ya que de esta forma podemos contribuir a desarrollar un país sostenible en este campo, con múltiples beneficios y siendo sobre todo responsables con nuestro entorno biótico.

1. INTRODUCCIÓN

Al hablar de la familia de las Orquídeas, nos referimos a la familia que ha sido apreciada por diferentes civilizaciones desde hace muchos siglos, debido a la belleza y variabilidad de colores y perfumes que sorprenden y seducen a todo ser humano que estima la belleza y magia de la naturaleza. Esta es la familia más diversa de las plantas vasculares del país (Endara et al., 2000 en Valencia, 2000); hasta hoy más de 4000 especies de orquídeas han sido científicamente clasificadas (Jorgensen and León-Janez, 1999), siendo el país uno de los más pequeños del mundo tropical.

Simultáneamente a esta realidad, la familia Orchidaceae está sometida a una serie de presiones debido a los disturbios que sufren sus hábitats. La principal causa de pérdida de especies de la familia es la destrucción acelerada de los bosques en nuestro país, ésta unida a la presión por extracción sobre las poblaciones ha traído como consecuencia la alteración o pérdida de los hábitats en que crecen las orquídeas. (Dodson, 2004).

Del género *Epidendrum* se han observado múltiples formas y colores. Las especies de este género son fuente importante de alimentación de varias especies de colibríes. Es un género amplio con más de 1000 especies distribuidas a lo largo de América Tropical. *Epidendrum secundum* es una especie distribuida en la provincia de Loja, Azuay, Cañar, Carchi, Manabí, Pastaza, Puyo, Pichincha, Quito, Santo Domingo y Tungurahua. (Dodson, 2002).

El cultivo *in vitro* es una de las alternativas de propagación para especies de la familia, ya que permite la germinación asimbiótica de las mismas, sin embargo la mayoría de las plantas cultivadas en el país no proceden ni de cultivo *in vitro* ni de la división asexual; si no de la extracción de su hábitat natural, alterando de esta manera el equilibrio del ecosistema.

Conscientes de esta problemática la fundación Bonanza ha creado hace varios años el laboratorio de micropropagación "Ecuadorianorchids", ubicado en el sector de Zhullín, provincia del Cañar, a 2300 m s.n.m. Este laboratorio ha sido creado con algunas innovaciones de equipamiento, materiales y procesos relacionados con el cultivo *in vitro*.

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio "Ecuadorianorchids" y pretende ilustrar algunas de la innovaciones del mismo para que otros investigadores apliquen la propagación *in vitro* de orquídeas, presentando como modelo la multiplicación in vitro de *Epidendrum secundum*, en esta especie se evaluará la influencia de reguladores de crecimiento vegetal comerciales en la tasa de multiplicación.

2. OBJETIVOS

- Evaluar la influencia de distintas concentraciones de auxinas, citoquininas y giberelinas durante la multiplicación *in vitro* de *Epidendrum secundum*.
- Estudiar el crecimiento de raíz y tallo de *Epidendrum secundum*.

3. REVISION DE BIBLIOGRAFIA

3.1. LAS ORQUÍDEAS

3.1.1. Generalidades de las Orquídeas

Orchidaceae es una de las familias más grandes y diversas del reino vegetal, con un número variable entre 12.000 y 35.000 especies (Dodson et al., 2004).

La máxima concentración de especies de orquídeas se encuentra en los trópicos de ambos hemisferios. En estas áreas tropicales están distribuidas especies epífitas y terrestres (Dodson et al., 2004).

Es una familia muy diversa y variada en cuanto a preferencias de hábitat, sistemas reproductivos y tipos de polinización. Algunas especies son abundantes y están ampliamente distribuidas en todo el país (e. g., *Epidendrum picincha*). En contraste otras parecen crecer únicamente en hábitats pequeños y restringidos que satisfacen sus requerimientos específicos de humedad, nutrientes y sombra. Otro grupo de especies de la familia son oportunistas y aparecen solamente en áreas disturbadas como bordes de carretera (e.g., *Elleanthus ecuadorensis*). Otras toleran moderadamente las áreas intervenidas por el hombre, como plantaciones de cacao y café (e. g., *Góngora rossa*), (León-Yáñez y Jorgensen, 2000).

Las flores de las orquídeas, conocidas como parte de las llamadas “Flores no recompensadoras” tienen muchas características que contribuyen a la evolución de estas especies (Harder y Barrett, 2006). La información básica sobre ecología y dinámica poblacional de la mayoría de las especies es nula o simplemente no existe (Endara et al., 2000).

3.1.2. Descripción de las semillas de orquídeas

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas, con un peso aproximado de 0.001 mg. (Herrera y Pellmyr, 2002), son fácilmente transportables por el viento y se producen en cantidades elevadas por cápsula de 1.300 a 4'000.000. Las semillas tienen una testa relativamente gruesa, que encierra un embrión de alrededor de 200 células. La cubierta tiene un aspecto exterior característico, en forma de red, que es diferente para cada especie. La testa está formada por un tejido muerto, compuesto hasta en un 96% de aire, de tal forma que cada semilla puede ser considerada como un auténtico globo.

El embrión tiene una forma redondeada o esférica. La mayor parte de las semillas de orquídeas están escasamente diferenciadas. No se distinguen cotiledones ni raíces y carecen de endospermo. En el extremo distal del embrión existe un punto de crecimiento potencial, no identificable en el estado de semilla. (Portilla et al., 2007).

3.1.3. Vida y Reproducción de las Orquídeas en Medio Natural

La mayoría de las orquídeas son plantas que toleran condiciones de estrés; las epifitas así como algunas terrestres toleran niveles de escasez de agua que muchas otras plantas no soportarían ya que sus raíces están expuestas al viento, al asentarse sobre los troncos de árboles o rocas tienen un acceso limitado a nutrientes, y muchas de ellas se desarrollan en ambientes muy sombríos, lo que puede ser tan estresante como un ambiente seco rocoso. Para sobrevivir estas condiciones adversas, las orquídeas han desarrollado una manera especializada de vivir, la mayor parte del tiempo crecen lentamente economizando agua y nutrientes. Sólo durante los períodos de crecimiento y floración invierten más energía para lograr reproducirse exitosamente.

La reproducción sexual es fundamental para la evolución de los organismos. Generalmente para que ésta ocurra en las orquídeas, el polinio debe ser transportado de un individuo a otro por un agente polinizador externo, normalmente abejas, mariposas, polillas, moscas, unas

pocas avispas y algunas aves como los colibríes. Lo común en la familia es que el polinizador sea distinto para cada especie, pudiendo algunas ofrecer una recompensa floral a sus polinizadores como néctar, aceites, polen y pseudo-polen que les sirve de alimento; o en otros casos conseguir la visita del polinizador por engaño, ya que sus flores asemejan a la hembra del polinizador, o a las flores que producen néctar o a comida para sus larvas. Si el insecto no visita a la orquídea correcta, no hay polinización ya que sólo unos pocos insectos pueden colocar el polinio de una determinada especie en el sitio adecuado de la flor. Al aislarse reproductivamente requiriendo polinizadores específicos, las orquídeas no han desarrollado otros mecanismos de aislamiento reproductivo. Esto hace que las orquídeas a diferencia de otros organismos, puedan cruzarse artificialmente no sólo entre diferentes especies, sino también entre diferentes géneros. (Portilla et al., 2007).

A diferencia de la mayoría de las plantas con flores, las semillas de las orquídeas carecen de endospermo, tejido nutritivo que sirve para el desarrollo del embrión (Ammirato, 1990), y la semilla para que ocurra una germinación exitosa, debe llegar al sustrato en un hábitat adecuado y entrar en contacto con un hongo apropiado. El término micorriza hace referencia a la relación simbiótica que se establece entre un hongo y las raíces de una planta vascular, en este caso las orquídeas. Esta relación puede ser mutualista, en el sentido de que la orquídea recibe los carbohidratos necesarios para su desarrollo y el hongo recibe vitaminas y otras sustancias; o bien, la orquídea puede parasitar y controlar al hongo. Una vez que la plántula está suficientemente grande y es capaz de fotosintetizar y satisfacer sus propios requisitos energéticos, la asociación con el hongo deja de ser necesaria pero, a pesar de esto, la relación frecuentemente permanece. Esta es la razón por la cual es tan difícil que germinen las semillas de las orquídeas, sin recurrir al uso de técnicas de cultivo *in vitro*.

3.2. Características botánicas de la especie *Epidendrum secundum*

3.2.1. Clasificación botánica

Reino: PLANTAE

División: MAGNOLIOPHITA

Clase: LILIOPSIDA

Orden: ORCHIDALES

Familia: ORCHIDACEAE

Sub familia: EPIDENDROIDEAE

Tribu: EPIDENDREAE

Género: *Epidendrum*

Especie: *secundum*

Nombre científico: *Epidendrum secundum*

Nombre vulgar: Flor de cristo

3.2.2. Etimología e historia

El nombre *Epidendrum* deriva de las palabras griegas *Epi*: sobre y *Dendrom*: árbol. A pesar del significado del nombre no todos los *Epidendrum* son epífitos, muchos de ellos crecen sobre rocas (litofitos) o sobre el suelo (terrestres). (Portilla et al., 2007).

El género fue propuesto por Linnaeus en 1763 para incluir todas las orquídeas que se conocían de la región tropical y fueron reportadas como epifitas, posteriormente mediante análisis filogenéticos, el género fue separado en grupos pequeños: *Aggregatum*, *Albertii*, *Alpicolum*, *Amblostomoides*, *Anceps*, *Arbuscula*, *Cernuum*, entre otros (Dodson, 2002).

3.2.3. Características

Caracterizadas por plantas tipo caña o pseudo bulbos, hojas anchas, inflorescencia terminal (raramente lateral) y flores sin articulación entre el ovario y el pedicelo. Sus principales

polinizadores son mariposas y polillas diurnas y nocturnas, aunque hay especies que son polinizadas también por colibrís (Dodson, 2002). Tienen crecimiento monopodial o plantas que tienen un solo tallo (Obsarrac, 2002). *Epidendrum secundum* (Flor de cristo), posee un tallo en forma de caña que alcanza 3m de altura (Bustos, 2006). Inflorescencia apical, alargada con numerosas flores en el ápice en una bola capitada color rojo, rosado, blanco o amarillo, labio erecto callo grande a menudo de color diferente al de otras partes florales, lóbulos de labios fimbriados. (Dodson y Mármol, 1989).



Figura 1. *Epidendrum secundum* a. Detalle de la raíz, b. Tallos y hojas, c. Flor y d. fruto

3.2.4. Ecología



Figura 2., *Epidendrum secundum* en la naturaleza

Las especies del género ocupan un amplio rango de condiciones ecológicas. La mayoría son epifitas y se encuentran en bosques húmedos tropicales o bosques lluviosos montanos en las pendientes de los Andes.

Según Dodson (2002), tienden a crecer en áreas abiertas expuestas en pendientes rocosas y empinadas. En los taludes de las carreteras existen verdaderas poblaciones de varias especies de *Epidendrum* que muchísimas veces, producen híbridos naturales de variados colores y gran belleza (Bustos 2006). *Epidendrum secundum* pueden ser epífita o terrestre y establecerse sobre cuevas empinadas de bosque húmedo tropical o bosque lluvioso montano. (Dodson y Mármol, 1989).

3.2.5. Distribución

Género neotropical integrado por alrededor de 1.500 especies distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, desde el nivel del mar hasta los 3600m de altura. (Portilla et al., 2007).

Epidendrum secundum, es una especie distribuida en diferentes partes del Ecuador, en la provincia de Loja habita desde 200 a 3500 m s.n.m. en ecosistemas que van desde los 8 a

26°C. También se encuentran en Azuay (2400 m s.n.m), Cañar (1700 a 1900 m s.n.m), Carchi (1200 m s.n.m), Manabí (300 m s.n.m), Pastaza (1000 m s.n.m), Pichincha (1600 m s.n.m) y Tunguragua (2000 m s.n.m). (Dodson, 2002).

3.3. CULTIVO *IN VITRO*

3.3.1. Definición








La expresión cultivo *in vitro* de plantas, agrupa en forma genérica un conjunto de técnicas que se usan como una herramienta eficaz en el estudio de numerosos aspectos de la biología vegetal. El término *in vitro* generalmente significa “en vidrio” y hace referencia al aislamiento estéril de plantas o partes de plantas en un medio de cultivo aséptico, que generalmente es de vidrio (González et al., 1993).

3.3.2. Generalidades del Cultivo *in vitro*

La propagación *in vitro* constituye dentro de la biotecnología la técnica que mayor aporte práctico a brindado. Sus aplicaciones van desde estudios teóricos de fisiología y bioquímica vegetal a la propagación masiva, la conservación de germoplasma y el mejoramiento genético (Moran, s.f).

A nivel mundial se ha desarrollado toda una industria de micropropagación que se inicio en países desarrollados como Estados Unidos y Europa extendiéndose a países de América Latina, Asia y África. Hoy en día la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y en especies leñosas. Según Moran (s.f.), en algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación.

En el caso de las orquídeas, que poseen características especiales de la semilla y de condiciones de crecimiento, hoy en día la práctica *in vitro* es fundamental para poder conservarlas, tomando en cuenta que:

-  Las semillas de las orquídeas son muy pequeñas y contienen poco o nada de reserva alimenticia. Por lo tanto, la germinación tiene más probabilidades de éxito en condiciones *in vitro*, que en condiciones naturales. (Cuya, 1997).
-  En la naturaleza la germinación depende de una relación simbiótica con un hongo. Sin embargo en condiciones *in vitro* hay la posibilidad de sustituir la acción del hongo por un medio de cultivo nutritivo. (Cuya, 1997).
-  Al elegir un medio de cultivo apropiado se puede lograr que la mayoría de semillas germinen *in vitro*. (Cuya, 1997).
-  La siembra *in vitro* permite germinar embriones inmaduros de orquídeas como consecuencia se acorta el ciclo de mejora. (Cuya, 1997).
-  La germinación y el desarrollo tiene lugar más rápidamente *in vitro*, ya que se realiza en un ambiente acondicionado y sin competencia con hongos y bacterias. (Cuya, 1997).
-  Existe una mayor posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existe pocos individuos. (Moran, s.f).
-  Es posible multiplicar grandes cantidades de plantas en un área reducida a bajos costos. (Moran, s.f).

3.3.3. Fundamentos del cultivo *in vitro*

En un laboratorio de cultivo *in vitro* deben tomarse en cuenta principalmente las condiciones de asepsia que se requiere para el establecimiento de cultivos, por asepsia se entiende por el conjunto de métodos destinados a preservar de gérmenes infecciosos al organismo. Además entre las condiciones ambientales generales, se controlan: el fotoperiodo, la temperatura, la humedad y la intensidad lumínica, de acuerdo a las diferentes fases de crecimiento. (Hurtado y Merino, 1988).

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos, y por consiguiente es un factor fundamental a considerar.

En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo, el cual puede interactuar con la temperatura óptima de crecimiento, la

luz y la composición del medio (Merchán, s.f). Un rango de temperatura entre 22 y 25 °C es el adecuado para las orquídeas (Cuya, 1997).

La luz tiene una parte de la energía radiante, algunas de las radiaciones infrarrojas y ultravioletas (próximas) que tienen influencia conocida sobre el desarrollo de las plantas. Es un factor principal que determina el desarrollo de los organismos autótrofos (Merchán, s.f.), siendo importante para el cultivo *in vitro* la irradiación (cantidad de luz), el espectro (la calidad de luz) y el fotoperiodo (la alteración de los ciclos de luz con la oscuridad).

3.3.4. Crecimiento en cultivo *in vitro*

Gracias a los avances obtenidos por Bernard (1909) y Knudson (1922), hoy en día es posible lograr la propagación *in vitro* por medio de semillas en un medio de cultivo que contiene los carbohidratos aportados por el hongo en la naturaleza.

Previo a la introducción *in vitro*, la polinización se realiza manualmente entre flores de una misma especie, de especies diferentes dentro de un mismo género o entre géneros diferentes. Una vez que madura el fruto se esterilizan las diminutas semillas y se siembran en medios creados para reemplazar el aporte que hace el hongo benéfico (micorriza).

Actualmente la germinación se realiza en medio estéril con la presencia de macro y micronutrientes, azúcar, hormonas, estimulantes y vitaminas (Portilla et al.2007).

3.4. MEDIO PARA EL CULTIVO DE ORQUÍDEAS

Las semillas pueden crecer sobre medios diferentes dependiendo de las especies (Cuya 1997), es muy difícil conocer todos los requerimientos que las semillas de una especie de orquídea con respecto a las sales minerales y nutrientes en general. (Sánchez et al., 1994).

Arditti (1977), señala que existe gran heterogeneidad en cuanto al medio de cultivo a usarse, algunos medios utilizados en el cultivo de tejidos de orquídeas son productos que contienen gran cantidad de compuestos y sus concentraciones varían considerablemente entre los

medios. Sin embargo el medio nutritivo utilizado en nuestro estudio para las orquídeas es el Murashige Skoog MS 8280 (Anexo 2).

3.4.1. Componentes del Medio

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contienen entre 15 y 35 compuestos químicos que conforman el medio, Roca (1993) clasifica éstos compuestos químicos de la siguiente manera:

a) Fuentes de Carbono

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza y se puede reemplazar por glucosa, en menor medida por fructosa, y en general, la maltosa y galactosa son menos efectivas (Roca, 1993).

El azúcar blanco refinado que se vende en los supermercados puede resultar adecuado para la micropropagación en muchos casos. Se trata de un producto purificado y de acuerdo con los análisis se compone de 99.94% de sacarosa, 0.02% de agua y 0.04% de otras sustancias; no hay indicaciones que estos constituyentes puedan causar toxicidad en condiciones *in vitro* (Roca, 1993).

b) Nutrimientos minerales

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micro nutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. (Roca, 1993).

Macronutrientes

El cultivo de tejidos requiere de una fuente continua de ciertas sustancias químicas inorgánicas, además de carbono, hidrogeno y oxígeno los elementos requeridos relativamente en grandes cantidades son principalmente: N, P, K, Ca, Mg y S. (García, 1986).

Micronutrientes

Las células vegetales requieren ciertos micronutrientes, los más esenciales son Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co, y Mo.

Los últimos cinco elementos son esenciales para la síntesis de clorofila y la función de cloroplastos (García, 1986).

Agentes Quelantes

Se conoce como agente quelante a un compuesto o sustancia que forma complejos (quelatos) con iones de metales pesados. Este complejo puede evitar la toxicidad o permitir que el nutriente este más disponible para la planta. Un ejemplo de agente quelante es el E.D.T.A. (Ácido etilendinitrotetra-acético), que en bajas concentraciones estimulan el crecimiento ya que hace que el hierro esté disponible en bajas cantidades por períodos más prolongados (García, 1986).

c) Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridos en pequeñas cantidades.

Las vitaminas más ampliamente usadas son:

1) Tiamina: (Vitamina B1)

Se añade como Tiamina – HCL en cantidades que varían de 0.1 a 30mg/l.

2) Ácido Nicotínico: (Niacina)

La vitamina B₃ es una vitamina hidrosoluble cuyos derivados, NADH y NAD⁺, y NADPH y NADP⁺, juegan roles esenciales en el metabolismo energético de la célula y de la reparación de ADN. La designación vitamina B₃ también incluye a la correspondiente amida, la nicotinamida, o niacinamida, con fórmula química C₆H₆NO₂ (Gass, 1973).

3) Piridoxina (Vitamina B6) se añade como Piridoxina HCL

La vitamina B₆ es una vitamina hidrosoluble y es en realidad un grupo de tres compuestos químicos llamados piridoxina (peridoxol), piridoxal y peridoxamina; Participan en muchas reacciones enzimáticas del metabolismo de los aminoácidos y su función principal es la transferencia de grupos amino; por tanto, son coenzimas de las transaminasas, enzimas que catalizan la transferencia de grupos amino entre aminoácidos (Lehninger, 1976).

4) Mio-inositol

Se denomina también meso-inositol ó i-inositol, no es una vitamina propiamente, sino una azúcar de alcohol; compuesto derivado del fraccionamiento neutral del extracto de malta y agua de coco. Es estable al calor y a la luz. Tiene efecto estimulante sobre la morfogénesis, probablemente participa en la vía biosintética del ácido galacturónico, ayudando a la formación de varios constituyentes celulares, como el ácido ascórbico y la pectina, también tiene efectos sinérgicos, para el crecimiento de tejidos con los compuestos activos del agua de coco y otros compuestos que intervienen en la división celular.

5) Ácido Pantoténico

Ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.

6) Ácido para Aminabenzoico

En varios reportes se ha señalado la inefectividad, mientras que la luz aumenta, esto es debido a que en la luz es hidrolizado y se ha formado el ácido-p-amino enzoico.

7) Riboflavina

Es inhibidor del crecimiento de raíces, es termoestable pero se descompone fácilmente.

8) Vitamina E

Ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células individuales.

9) Vitamina K

Tiene efecto antagónico con el 2,4-D en el crecimiento de tejidos de zanahoria y girasol tuberoso.

10) Vitamina B12

En el crecimiento de tejidos tumorales, tiene efecto de sintetizar purinas y pirimidinas. (García, 1986).

d) Agente gelificante

Cuando se utilizan medios sólidos, se emplea el agar como un soporte. El agar es una mezcla compleja de carbohidratos y poca proteína que se obtiene de un alga de Ceilán, cuando el objetivo del estudio es evaluar la influencia de nutrientes específicos no es conveniente utilizar agar comercial como agente gelificante, pues contiene pequeñas cantidades de tiamina, biotina y minerales.

En experimentaciones realizadas en el laboratorio Ecuadorianorchids se ha podido observar que si disminuimos la cantidad de agar de la recomendación 6.57gr/L en un 15% mejora el enraizamiento en etapas de resiembra.

Dentro de los medios de cultivo existen otras sustancias cuyo sistema de soporte no es al agar, como el Gelrite; que es un polimerizador derivado de bacterias.

e) Sustancias reguladoras de crecimiento

Adicionalmente a los nutrientes es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente Auxinas y/o Citoquininas, pero a veces también Giberelinas o Ácido absicico, para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro* (Roca, 1993).

f) Otros componentes

Existe una larga lista de componentes que se adiciona ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos y otros. Entre ellos está el agua de coco, el jugo de frutos de tomate, el extracto de la levadura, y el estrato de tubérculos de papa. El carbón activado (0.1% a 5%) incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos. (Roca, 1993).

Dentro de este grupo el componente más común es el agua, aunque ésta es uno de los componentes químicos más importantes en el medio de cultivo, frecuentemente se conoce muy poco acerca de su pureza, por esta razón es necesario preparar el medio utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada- destilada (H₂O, DD). (García, 1986).

3.5. REGULADORES DE CRECIMIENTO



Figura 3. Reguladores de crecimiento comercializados como insumos agrícolas.

3.5.1. GENERALIDADES

Generalmente son sustancias de acción hormonal que bajo condiciones naturales la planta sintetiza en pequeñas cantidades (endógenas) y que utilizan en sitios diferentes a los de la síntesis.

Cuando se agrega a un medio de cultivo (exógeno) el balance entre ellas determinará el tipo de repuesta del tejido en el desarrollo posterior. Por ejemplo, más auxinas que citoquininas en el medio favorece a la formación de callos, mientras que al revés (más citoquininas que auxinas) inducen la diferenciación u organogénesis (García. 1986).

3.5.2. AUXINAS

3.5.2.1. Nomenclatura

Auxina es un término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la elongación celular. Algunas auxinas son naturales y otras se producen sintéticamente. (Weaver, 1976).

3.5.2.2. Auxinas Naturales

Los compuestos que tiene actividad auxínica son orgánicos, todos ellos poseen hidrogeno y oxigeno en proporciones y disposiciones diferentes y algunos de ellos contienen además nitrógeno y cloro.

El Ácido Indol Acético (AIA) es una de las principales auxinas que aparecen en las plantas superiores. Comúnmente el nivel del AIA en tejidos de las plantas varía según la etapa de desarrollo vegetal; por ejemplo, se ha encontrado la hormona en las hojas internas e incoloras de las coles de Bruselas, pero no en las hojas verdes exteriores (Linser et al, 1954).

El AIA fue la primera hormona de crecimiento que se extrajo de las hojas y del tallo de las plantas superiores de crecimiento rápido. Los miembros de la familia de las crucíferas son especialmente ricos en AIA.

3.5.2.3. Auxinas Sintéticas

Poco después de demostrarse que el AIA era la auxina que con más frecuencia aparece en las plantas superiores, se realizo una búsqueda de compuestos sintéticos, de constitución química y actividad similar.

En 1936, Zimmerman y sus colegas, en el Óbice Thompson Institute de Yonkers, Nueva York, investigaron varios nuevos compuestos, incluyendo el Ácido Indol Butírico (AIB), el ANA, el ácido B-naftalenacético, el ácido fenilácetico y el ácido antracenacético. En 1924,

Zimmerman y Hitchcok investigaron la serie POA, de la que es miembro el 2-4D, MCPB, el ácido 2 fenoxipropiúnico, el ácido 2-(2,6-diclorofenoxi) butírico y la 2,6 diclorofenoxiacetamida.

Otro grupo importante son los derivados de ácido benzoico, como el ácido 2, 3, 6 trimetilbenzoico y un gran número de enzimas sintetizadas a partir de la década de 1940, (Weaver, 1976).

3.5.2.4. Efectos Biológicos

Según Weaver (1976), entre los principales efectos de las auxinas, podemos mencionar:

- ✚ Expansión de células de tallos y coleóptidos
- ✚ División celular
- ✚ Inicio de formación de raíces de varias especies vegetales
- ✚ Inducción del periodo de floración e inducción del cuajado de frutos y su desarrollo en algunas especies
- ✚ Crecimiento en tamaño de frutos jóvenes y en desarrollo aumentan su tamaño
- ✚ Aceleración de la maduración de algunos frutos, como el higo.

3.5.2.5. Cantidades que se pueden utilizar

En la práctica el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar, sin embargo Roca (1993), sugiere la utilización de las cantidades detalladas en la siguiente tabla.

Tabla N° 1. Dosis de Auxinas en mg/l

AUXINAS	CONCENTRACIONES mg/l	PUNTO ÓPTIMO mg/l
AIA	0.001 – 10	0.1 a 10
2,4-D	0.1 – 10	1 a 5
ANA	1 – 10	2

3.5.3. CITOQUININAS

3.5.3.1. Nomenclatura

Son sustancias del crecimiento de las plantas, que provocan la división celular. Muchas Citoquininas exógenas y todas las endógenas derivan probablemente de la adenina, una base nitrogenada de purina. (Weaver, 1976).

3.5.3.2. Presencia y naturaleza química

Las Citoquininas son sustancias naturales o sintéticas que provocan la división celular en ciertos tejidos vegetales, en presencia de las auxinas. Por su actividad se asemeja a la cinetina, primera citocina descubierta. (Weaver, 1976).

3.5.3.3. Citoquininas Naturales

De más de cuarenta especies vegetales, se han obtenido extractos cuyos compuestos manifiestan actividad citocinica (Lethan, 1967). Niveles relativamente altos de esos compuestos se han hallado sobre todo en tejidos que presentan una división celular activa, como las semillas en germinación y frutos jóvenes.

Por esta razón las citoquininas se consideran reguladores de división celular. Sustancias similares a las Citoquininas se han hallado en microorganismos y estratos de levadura. Por su parte las citoquininas se hallan en semillas en germinación de cebada, lechuga y chincharro.

Generalmente las actividades de las Citoquininas se correlacionan con la ubicación de las regiones de la división celular activa. Se han encontrado citoquininas en la savia exudada de varias especies incluyendo el tabaco, la vid y el girasol. La cromatografía ha revelado que por lo general la savia contiene más de una citocina, en la savia de la birda se encontraron cinco compuestos diferentes (Loeffler y Van Overbeek, 1964), y por lo menos dos en el girasol (Kend, 1964). Es probable que las Citoquininas se sintetizan en las puntas de las

raíces y se desplacen por el xilema hacia las hojas donde desempeñan importantes funciones en el metabolismo y envejecimiento. (Weaver, 1976).

3.5.3.4. Naturaleza química

La primera citocina cristalina se extrajo de la semilla de *Zea mays* y se le denominó “Zeatina” (Lethan, 1967). La zeatina que ya se ha sintetizado es un compuesto extremadamente activo (aproximadamente 10 veces más que la cinetina). Se ha encontrado un compuesto de estructura similar a la de la zeatina, el 2-ip en cultivos de *Corynebacterium fascians*, bacteria que produce un tipo de desarrollo de crecimiento excesivo en algunas plantas superiores.

3.5.3.5. Citoquininas Sintéticas

Después de que Miller y colaboradores (1965), trabajaron en el laboratorio del profesor Folker Skoog, aislaron la cinetina a partir de un preparado envejecido de ADN, se le identificó químicamente como 6-furfurilaminopurina. Más tarde se emprendieron investigaciones para identificar compuestos más poderosos.

Se ha estudiado una multitud de purinas, sustancias sintéticas y se ha descubierto que muchas de ellas resultan más activas que la cinetina (por ejemplo, el complejo BA, sintetizado por la Shell Development Company).

Hay una gran variedad de sustitutos que pueden reemplazar al anillo de furano, dando así a los compuestos un nivel más amplio de solubilidad en las grasas. Por sí sola la adenina da muestras de tener cierta actividad como citocinina, aunque la cinetina es aproximadamente 30.000 veces más potente. Van Overbeek (1964), se refirió a la cinetina, como una “adenina con agarradera”.

Se encontró que otro compuesto producido por la Shell Development Company, el BAP similar a la BA, con la salvedad de que en el nitrógeno 9 el hidrógeno se reemplaza con una estructura anillada no polar de tetrahidropirano. El aumento de la actividad quizás se deba a la mayor solubilidad de su producto y su mayor capacidad para penetrar el tejido de las plantas, como a su mayor movilidad dentro de la planta.

Se señala que hay una gran variedad de tipos químicos, incluyendo varios tipos de compuestos aromáticos y no aromáticos que dan muestra de actividad citocinica. (Skoog et. al, 1967), pusieron a prueba 69 compuestos la mayoría derivados de purina, a fin de determinar características como inductores de crecimiento y la formación de órganos, en el bioanálisis, de medula de tabaco. Se sintetizaron 43 de esos compuestos, 13 de los cuales por primera vez se mencionaban. Un total de 51 de esos compuestos, incluyendo gran variedad de sustitutos, demostraron tener actividad citocinica. (Weaver, 1976).

3.5.3.6. Efectos biológicos

Calle (2005), menciona los siguientes efectos de las citoquinas en las plantas:

- ✚ Estimulación de germinación de las semillas
- ✚ Estimulación de la formación de frutas sin semillas
- ✚ Ruptura de letargo de semillas
- ✚ Inducción de la formación de brotes
- ✚ Mejora de la floración
- ✚ Alteración en el crecimiento de frutos
- ✚ Ruptura de la dormancia apical

3.5.3.7. Cantidades que se pueden utilizar

Tabla N° 2. Dosis de Citoquininas en mg/l

CITOQUININAS	CONCENTRACIONES mg/l
KIN	0.1 – 2.0
ZEA	0.1 – 2.0
BAP	0.1 – 2.0

(Roca, 1993)

3.5.4. GIBERELINAS

3.5.4.1. Nomenclatura

La giberelina puede definirse como un compuesto que tiene un esqueleto de gibane y estimula la división o la población celular, o ambas cosas (Paleg, 1965). Las giberelinas pueden provocar un aumento sorprendente de la prolongación de los brotes en muchas especies, que resulta particularmente notable cuando se aplica a ciertos mutantes enanos (Weaver, 1976).

3.5.4.2. Presencia y naturaleza química

El ácido Giberélico (AG3), se convierte en un tema de intensa investigación aunque la adición de estos compuestos a los medios de cultivo ha sido ocasional. Se sabe que hay varios giberélicos, relacionados con el (AG3), que son productos complejos del metabolismo de las plantas superiores, que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría (Weaver, 1976).

Kurosawa, trabajando en el Japón en 1926, demostró la presencia de un estimulante del crecimiento en filtrados de cultivos de *Fusarium moniliforme*, se iniciaron estudios para establecer la naturaleza química del estímulo, dando como resultado el aislamiento de un material cristalino que estimula el crecimiento al aplicarlo a las raíces de plantas. Esta sustancia se denominó "giberelina", las giberelinas son producto del crecimiento del hongo *Gibberella fujikuroi*, en un medio líquido (Weaver, 1976).

3.5.4.3. Giberelinas Naturales

Se sabe que hay varios compuestos giberélicos con el AG₃, que son productos complejos de metabolismo de las plantas superiores y son uno de los tipos importantes de hormonas reguladoras del crecimiento de los vegetales, capaces de intervenir en el crecimiento de

muchas plantas ocasionado especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría. (Paley, 1965).

3.5.4.4. Naturaleza química

Las giberelinas se han definido como compuesto que contiene un esqueleto de gibberelano y propiedades biológicas apropiadas no obstante una nueva potencia presentada ante el International of pure and Applied Chemistry Committee on Organic nomenclature, sugiere que todas las giberelinas contengan el esqueleto del enantiómero giberelano (ent-giberelano) (Rowe, 1968). Dicho esqueleto tiene la ventaja de utilizar un sistema de numeración que corresponde al de otros diterpenos cíclicos, categoría a las que pertenecen todas las Giberelinas.

3.5.4.5. Efectos biológicos

Entre los principales efectos de la giberelinas Weaver (1976), menciona:

- ✚ Estimulan el crecimiento en los internodos más jóvenes y frecuentemente se incrementa la longitud de los internodos individuales, mientras el número de internodos permanece sin cambios.
- ✚ Provoca la floración de muchas especies que requieren temperaturas frías.
- ✚ En los tallos produce un incremento pronunciado de la división celular en el meristemo sub.-apical.
- ✚ Termina con el reposo de muchas semillas.
- ✚ Incrementa el tamaño de muchos frutos jóvenes como uvas y los higos.

3.5.4.6. Cantidades que se pueden utilizar

Tabla N° 3. Dosis de Giberelinas en mg/l

GIBERELINAS	CONCENTRACIONES mg/l	PUNTO ÓPTIMO mg/l
AG3	0.01 – 1	0.1

(Roca, 1993)

3.5.5. PROBLEMAS EN LA MICROPROPAGACIÓN

3.5.5.1. Contaminación microbiana en cultivos *in vitro*

La contaminación es uno de los principales y más severos problemas para quien trabaja en micro propagación y es un factor que tiene que tenerse en cuenta principalmente dentro de un laboratorio. Factores como el acondicionamiento físico del lugar de trabajo, la procedencia y la edad del explante inicial, la higiene ambiental o las técnicas de siembra de los operarios, entre otros, puede favorecer al control de la incidencia de contaminantes microbianos. La contaminación puede ingresar también del explante inicial utilizado.

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos en su totalidad, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares, en donde quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos periodos de tiempo (Pérez, 1988).

Los frascos que muestran signos de contaminación pocos días después de su siembra habitualmente fueron inoculados fuera y en el proceso de esterilización no se eliminó a los contaminantes o la contaminación ocurrió durante el proceso de siembra del explante o la semilla. Si las colonias están esparcidas al azar en la superficie del medio, es probable que fueran introducidos de la atmósfera, durante el proceso de siembra. Si los frascos llegan a contaminarse luego de pocas semanas esto puede deberse a que las bacterias y esporas del

hongo ingresan al medio a través de las tapas por la condensación de humedad que ocurre alrededor, lo cual puede ser reducido con el uso de parafina. (Seatom y Ramsay, 2005).

3.5.5.2. Asepsia y esterilización

En el cultivo *in vitro* la asepsia es uno de los procesos más importantes que llevan a feliz término el cultivo de tejidos.

La esterilización se considera como el proceso mediante el cual se obtiene materiales o sustancias libres de organismos vivos. Las técnicas utilizadas para lograr la esterilización varían según el tipo del material por esterilizar y pueden ser: esterilización física esterilización con calor (García, 1986).

3.5.5.2.1. Manejo de hornos o estufas para esterilizar con calor seco

El manejo de estos hornos o estufas es realmente sencillo, ya que consiste en aplicar una temperatura constante, durante el tiempo necesario para lograr la esterilización. El horno o estufa permanecerá cerrado, durante el tiempo de esterilización, la estufa deberá calibrarse previamente a la temperatura deseada. Este procedimiento de esterilización, aún cuando requiere de mayor tiempo que la esterilización con calor húmedo, es apropiado cuando se desea esterilizar material de vidrio e instrumentos de metal.

Este tipo de esterilización se lleva a cabo en estos hornos o estufas construidas en un diseño general, en las que puede variar las fuentes de calor: gas, resistencia eléctrica; las estufas disponen de un termostato y deben mantenerse cerradas a temperatura constante durante el tiempo de esterilización (García, 1986).

3.5.5.2.2. Tiempos y temperaturas requeridas para esterilizar con calor seco

Según García (1986), los tiempos y temperaturas necesarios para la esterilización en seco son:

170°C	60 minutos	1 hora
160°C	120 minutos	2 horas
150°C	150 minutos	2 horas y 1/2
140°C	180 minutos	3 horas
121°C	720 minutos	12 horas

3.5.5.2.3. Esterilización con calor húmedo a presión o esterilización a presión alta

Para lograr la esterilización con calor húmedo a presión se utiliza ollas de presión y autoclaves de diferentes tipos:

- a. Autoclave horizontal manual de una cámara de tres colores y sin control automático de presión.
- b. Manejo de autoclave horizontal manual, de doble cámara y de control automático de presión.
- c. Manejo de autoclave horizontal manual, de doble cámara y de control automático de presión.

Esta técnica se utiliza frecuentemente por su alta efectividad y el corto tiempo que se requiere. Su forma de acción se basa en el uso de vapor a presión, empleando recipientes herméticamente cerrados. La esterilización se hace en forma incompleta cuando el aire de la autoclave no se reemplaza completamente por vapor de agua. Esta técnica es apropiada para la esterilización de papel, agua, material de vidrio, metálico, suelo experimental, líquidos estables, como son la mayor parte de los medios de cultivo utilizados (García, 1989).

3.5.5.2.4. Relación de presión y temperatura en la autoclave y olla de presión

Presión en lb/pulg ²	Temperatura
5	108
10	116
15	121
20	127
25	131
30	134

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de tesis se desarrollo en el laboratorio de micropropagación de Fundación Bonanza “Ecuadorianorchids”, ubicado en el sector de Zhullín, provincia del Cañar, a 2300 m s.n.m; ya que en el mismo se dispone de la infraestructura indispensable para el desarrollo del tema propuesto. (Anexo 1). Durante el desarrollo de la investigación se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas, una temperatura promedio de 22°C y una humedad promedio de 65%.

4.1. Materiales

Materiales biológicos

- Plántulas de *Epidendrum secundum*, provenientes de un proceso micropropagación por semilla en medio de cultivo MS 8280, con una edad promedio de 10 meses.

Materiales físicos

- Bisturí
- Cajas Petri

- Erlenmeyers
- Frascos de vidrio
- Pinzas
- Pipetas
- Varillas

Materiales químicos

- Alcohol 99%
- Agar - Agar (Sigma)
- Agua destilada
- Agua Oxigenada
- Azúcar
- Myoinositol
- Hidróxido de Sodio (NaOH) y Ácido clorhídrico (HCl) para regular el pH
- Piridoxina
- Reguladores de crecimiento ANA, AG3 y BAP
- Sales Murashige y Skoog 8280 (Preparado en el laboratorio)
- Soluciones Buffer (2) (pH 4 a 5) (pH 6 a 7)
- Tiamina
- Vitamina complejo B

Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Peachímetro
- Rociador de alcohol
- Refrigerador

Otros

- Etiquetas
- Tijeras
- Lápices

4.2. Métodos

4.2.1. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog

El medio de cultivo fue preparado a partir de las soluciones madre (Anexo 2), adicionando 20 g/l de sacarosa, 100 mg/l de Mioinositol (SIGMA), 1mg/l de Tiamina (SIGMA) y 1mg/l de Piridoxina (SIGMA). A este medio de cultivo se adicionó los reguladores de crecimiento según cada combinación.

Reguladores de crecimiento utilizados

Como auxina se utilizó ANA, fabricada por COLINAGRO (Bogotá Colombia), distribuido por Ecuaquímica. La concentración comercial del ANA es de 17.2 g/l en presentación de 250 cm³.

Como citoquinina se utilizó el BAP, fabricada por MILLER (Miami Fl. Usa), distribuido por Ecuaquímica. La concentración comercial del BAP es 0.01% en una presentación de 250 cm³.

Como giberelina se utilizó el AG₃, fabricado por MARKETING ARM INTERNATIONAL (Port Charlotte Florida Usa), distribuido por Ecuaquímica. La concentración comercial es de 100g/kg en presentación de 10 g.

Tabla N° 4. Medios de cultivo utilizados

Tratamiento	Combinación de Reguladores de Crecimiento
M1d0 (Testigo)	MS
M1d1	MS + 5 ml AG ₃ + 5 ml BAP + 5ml ANA
M1d2	MS + 10 ml AG ₃ + 10 ml BAP + 10ml ANA
M1d3	MS + 15 ml AG ₃ + 15 ml BAP + 10ml ANA
M1d4	MS + 20 ml AG ₃ + 20 ml BAP + 20ml ANA

- ❖ El pH requerido para el cultivo *in vitro* esta alrededor de 5.5 – 5.6 por lo que en el medio que tuvo un pH ácido se procedió a elevar con una solución de hidróxido de sodio 0.5 N hasta llegar a 5.5. El pH del medio fue ajustado antes del autoclavado.
- ❖ En cada tratamiento se adicionó 6,57 gramos de Agar agar (Bacto agar) por litro de solución y se procedió a disolver y dispensar en los frascos de cultivo.

Esterilización de medios de cultivo

- ❖ Los frascos con medio de cultivo se colocaron en la autoclave y se esterilizaron a una presión de 10 libras por pulgada durante 10 minutos a una temperatura de 240°C. Normalmente es recomendado realizar la esterilización durante 20 minutos, con el fin de conservar mejor los reguladores de crecimiento se realizó la esterilización durante 10 minutos, sin obtener contaminación del medio de cultivo.

Esterilización del laboratorio

- ❖ Previo a la siembra se desinfectó el laboratorio y se encendió el productor de ozono, luego se aplicó hipoclorito de sodio comercial al piso y se encendió la cámara de flujo laminar.

Desinfección de las manos pinzas y papel

- ❖ Previo a la siembra se realizó una limpieza de las manos con alcohol, el material de siembra se introdujo en fundas plásticas herméticas y fue esterilizado en la autoclave a una presión de 10 libras por pulgada durante 10 minutos. Luego de la esterilización se procedió a la desinfección de las pinzas colocándolas en alcohol y flameándolas en el mechero, también se desinfectaron las cajas Petri con el mismo procedimiento de flameado.

Desinfección de la cámara de flujo laminar

- ❖ La cámara de flujo laminar usada fue construida en base a principios establecidos con las siguientes innovaciones: sistema de purificación de aire que utiliza filtros Hepa, y el sistema de conducción de aire purificado hacia el interior de la cámara de flujo (figura 4). La desinfección de la cámara de flujo laminar se realizó con un algodón empapado de alcohol potable en las áreas de vidrio.



Figura 4. Cámara de flujo laminar

Repique

- ❖ Las plántulas para el repique se encontraban en los frascos madre. Previo a ingresar los frascos a la cámara de flujo laminar se les roció con alcohol para desinfectarlos y se procedió a sacar las plántulas. Antes de ingresar los frascos con medio de cultivo a la cámara de flujo laminar también los roseamos con alcohol y en el momento de abrirlos se los flameo “la parte de la tapa” para evitar una posible contaminación. La colocación de las plántulas en el frasco se la realizó con la ayuda de una pinza modificada previamente esterilizada; procurando no maltratarlas. Las pinzas utilizadas fueron modificadas para evitar el exceso de presión en la planta. (Figura 5).



Figura 5. Herramientas modificadas. a. herramienta para manipular protocormos, b. herramienta para repique y siembra de plántulas, c. herramienta para siembra de plántulas.

- ❖ Se colocó 15 plántulas por frasco, dejándolas en una posición vertical. Al momento de tapar los frascos se repitió el flameado en la parte superior del frasco para evitar una posible contaminación. Por cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones siguiendo el mismo procedimiento.

Toma de datos

- ❖ Los parámetros que se evaluaron dentro del ensayo fueron los siguientes:

Tamaño de la planta en centímetros

- ❖ La medición se realizó utilizando un calibrador, se procedió a medir desde el cuello de la planta hasta el ápice de la hoja más alta. Esta medición se realizó cada 21 días, se midió 4 plantas por frasco y 4 frascos por cada tratamiento.

Tamaño de la raíz en centímetros

- ❖ La medición se realizó utilizando un calibrador, se colocó una señal en el frasco y de esta se medía en sentido de las manecillas del reloj, se midió desde el cuello de la planta hasta el ápice de la raíz. La medición se realizó una sola vez debido a que no se tenía presencia de raíces. Se midió 4 plantas por frasco y 4 frascos por cada tratamiento, no fue posible medir a todas las plantas debido a la distribución interna que impedían que las plantas que están en el centro del frasco fuesen registradas, seleccionando las que facilitaban este proceso al estar ubicadas cerca de la pared de vidrio del frasco.

Diseño experimental:

Para el ensayo se utilizó bloques completos al azar en arreglo factorial de 5 tratamientos (incluyendo el testigo) con 4 repeticiones, llegando a una totalidad de 20 frascos experimentales.

El factor de diseño es el medio de cultivo (la combinación de MS + Acido giberélico + BAP +ANA) obteniendo 4 niveles para este factor de diseño (es decir cuatro combinaciones de medio) y un testigo que es el que no tiene Reguladores de crecimiento.

Las variables de respuesta serían el tamaño de la planta y tamaño de las raíces al final de la experimentación.

Los datos fueron analizados con el programa XLSTAT VERSION 7.5.

Como primer paso en el análisis se realizó la prueba de normalidad para determinar el modelo estadístico adecuado. El análisis posterior se realizó con el modelo estadístico ANOVA, con el test de comparación múltiple de Duncan a un 95% de intervalo de confianza.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Influencia de los reguladores de crecimiento vegetal en el crecimiento en plántulas de *Epidendrum secundum*

Con las pruebas estadísticas se determinó que la distribución de los datos es normal (Anexo 3).

Las respuestas de crecimiento en las fechas de levantamiento de la información se detallan a continuación:

Tabla N° 5. Respuesta de crecimiento en plántulas de *Epidendrum secundum* a los 21, 42, 63 y 84 días

Medio de cultivo con RCV	Crecimiento Acumulado en cm \pm error estándar			
	Tiempo (días)			
	21	42	63	84
M1d0	1,7 \pm 0,1b	1,8 \pm 0,1b	1,9 \pm 0,1b	2 \pm 0,1b
M1d1	2,1 \pm 0,1a	2,3 \pm 0,1a	2,4 \pm 0,1a	2,6 \pm 0,1 ^a
M1d2	2,4 \pm 0,1a	2,5 \pm 0,1a	2,6 \pm 0,1a	2,7 \pm 0,1 ^a
M1d3	2,1 \pm 0,1ab	2,2 \pm 0,1a	2,4 \pm 0,2a	2,5 \pm 0,1 ^a
M1d4	2 \pm 0,2ab	2,2 \pm 0,1a	2,4 \pm 0,2a	2,3 \pm 0,2ab

Los datos ubicados en la misma columna seguidos de letras distintas corresponden a respuestas significativamente diferentes. Según la prueba de Duncan 95% de confianza.

Los datos de crecimiento a los 21 días demuestran que M1d2(10ml) y M1d1(5ml) fueron significativamente diferentes con respecto a los medios M1d0(0ml), M1d3(15ml) y M1d4(20ml) los mismos que experimentaron 2,4cm y 2,1cm de crecimiento con un error estándar de \pm 0,1 para los dos casos. Los datos de crecimiento a los 42 días demostraron un comportamiento relativamente similar entre los medios M1d1, M1d2, M1d3 y M1d4, todos estos mantuvieron el mismo error estándar de \pm 0,1 y se ordenaron en el grupo **a** demostrando ser significativamente diferente a M1d0(0 ml).

A los 63 días de crecimiento se mantuvieron los datos de significancia de los medios M1d1(5ml), M1d2(10ml), M1d3(15ml) y M1d4(20ml), ordenándose en el grupo "a" con un

error estándar de $\pm 0,1$ para el medio M1d1 y M1d2 y con un error estándar de $\pm 0,2$ para los medios M1d3(15ml) y M1d4(20ml).

A los 84 días presentaron un crecimiento significativo los medios M1d1(5ml), M1d2(10ml), M1d3(15ml) con un error estándar de $\pm 0,1$ en comparación con el medio M1d0(0ml) y M1d4 (20ml). Al final de la experimentación se pudo determinar que el medio de cultivo M1d1 (5ml) presento un crecimiento de 5 décimas de 0,5cm de crecimiento demostrando ser significativamente diferente con el medio M1d0 (0ml) que no contiene reguladores de crecimiento al igual que M1d4 (20ml), seguido en significancia por M1d3(15ml) y M1d2(10ml), al haber presentado ellos al final de la evaluación 0,4cm y 0,3cm de crecimiento respectivamente. (Figura 6).



Figura 6. Plántulas de *Epidendrum secundum* a los 84 días, a. plántula M1d2(10ml), b. plántula M1d1(5ml) c. plántula M1d3(15ml), d. plántula M1d4(20ml), e. plántula M1d0(0ml).

5.1.1 Gráficos de medias crecimiento en plántulas de *Epidendrum secundum*.

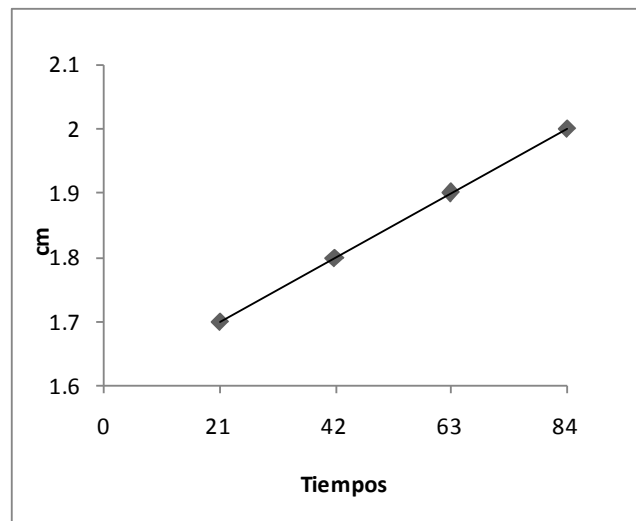


Figura 7. medias de crecimiento M1d0

En este gráfico se puede apreciar las medias de crecimiento experimentado por las plántulas de *Epidendrum secundum* al estar en contacto con M1d0(0ml), el crecimiento fue constante durante todo el periodo de experimentación.

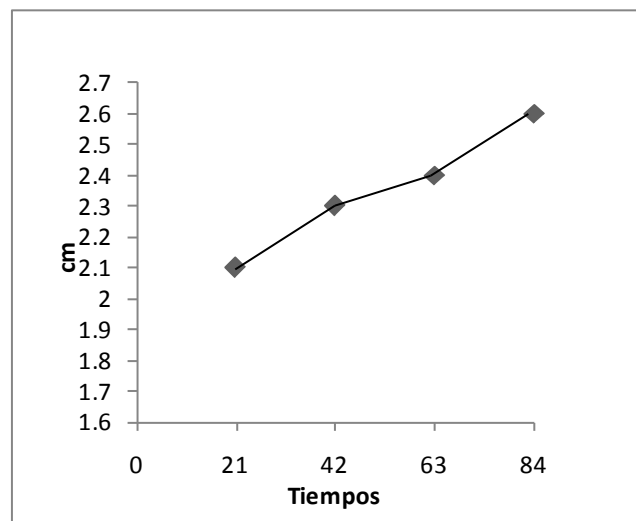


Figura 8. medias de crecimiento M1d1

En este gráfico se puede apreciar las medias de crecimiento de las plántulas de *Epidendrum secundum* al estar en contacto con M1d1 (5ml), estas demostraron un desarrollo de 0.5cm

hasta el final de la experimentación, siendo el que mejores resultados de crecimiento ha proporcionado.

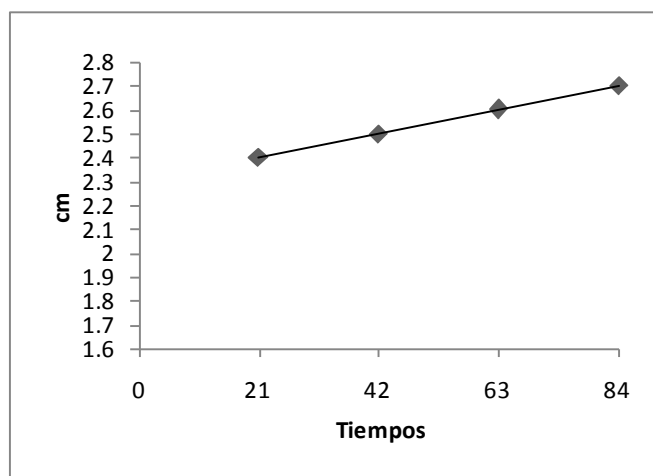


Figura 9. medias de crecimiento M1d2

En este grafico se puede apreciar las medias de crecimiento de las plántulas de *Epidendrum secundum*, al estar en contacto con M1d2 (10ml) demostraron un desarrollo constante durante todo el periodo de experimentación.

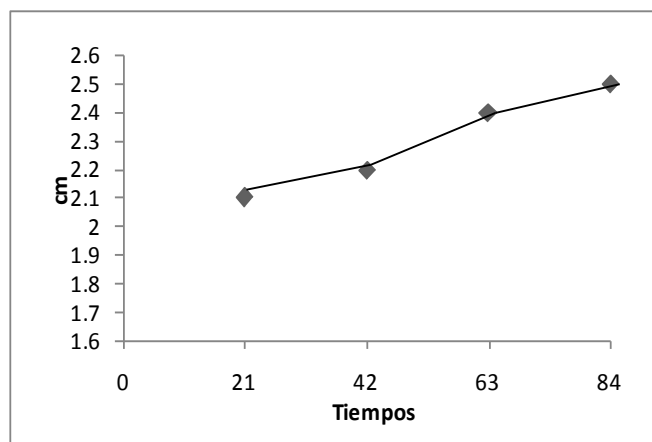


Figura 10. medias de crecimiento M1d3

En este grafico se puede apreciar las medias de crecimiento de las plántulas de *Epidendrum secundum* al estar en contacto con M1d3 (15ml), estas demostraron un crecimiento acumulado al final de los 84 días de 0.4cm.

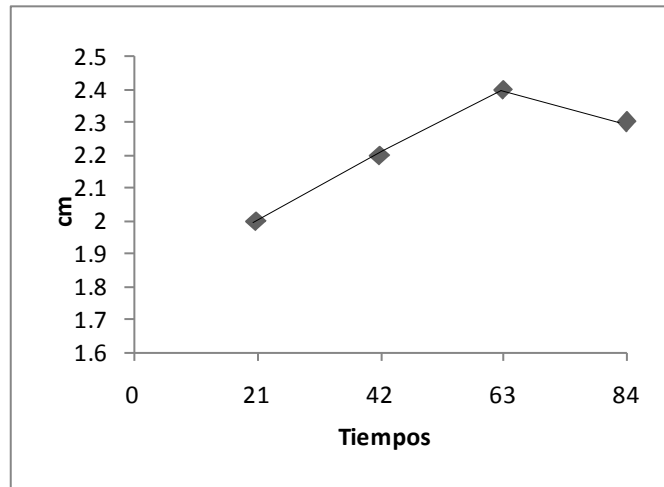


Figura 11. medias de crecimiento M1d4

En este grafico se puede apreciar las medias de crecimiento de las plántulas de *Epidendrum secundum* al estar en contacto con M1d4 (20ml), estas demostraron un crecimiento significativamente mayor entre los 21 y 63 días en comparación con el último período de 63 y 84 días; el fenómeno de decrecimiento producido en este periodo se produjo por muerte del tejido vegetal que estuvo en contacto con el medio de cultivo.

5.2 Influencia de los reguladores de crecimiento en crecimiento de raíces

Como primer paso en el análisis se realizó la prueba de normalidad (Anexo 6) para determinar el modelo estadístico adecuado dando como resultado que la distribución de datos no es normal. El análisis posterior se realizó con el modelo estadístico Kruskal-Wallis, con el test de comparación de Bonferroni a un 95% de intervalo de confianza.

Tabla N° 6. Respuesta de crecimiento de raíces de *Epidendrum secundum* a los 84 días

Medio de cultivo con RCV	Crecimiento de raíces en cm \pm error estándar
M1d0	0,90 \pm 0,09 c
M1d1	0,37 \pm 0,04 b
M1d2	0,25 \pm 0,04 ab
M1d3	0,01 \pm 0,04 a
M1d4	0,38 \pm 0,07bc

Los datos ubicados en la misma columna seguidos de letras distintas corresponden a respuestas significativamente diferentes. Según el test de Bonferroni 95% confianza.

Los datos de crecimiento de raíces de *Epidendrum secundum* demostraron que el M1d0 (0ml) fue altamente significativo con un crecimiento de raíz a los 84 días de 0.90cm y un error estándar de \pm 0,09; en comparación con M1d1 (5ml), M1d2 (10ml), y M1d3 (15ml). Seguido de M1d4 (20ml), con un crecimiento altamente significativo de 0.38cm y un error estándar de \pm 0,04 a los 84 días, en comparación con M1d3 (15ml). (Figura 7).

El crecimiento de raíces en el medio M1d0 (0ml) fue altamente significativo con un crecimiento de raíz a los 84 días de 0.90cm en comparación con el resto de medios que usaron reguladores de crecimiento vegetal; el medio M1d0 (0ml) produjo un desarrollo aceptable de las raíces de *Epidendrum secundum* sin la presencia de reguladores de

crecimiento vegetal esto podría explicarse como una estrategia de supervivencia de las plantas.

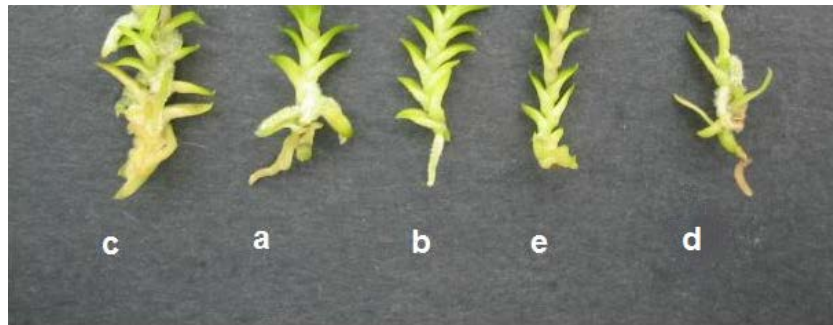


Figura 12. Raíces de *Epidendrum secundum* a los 84 días, a. plántula M1d0(0ml), b. plántula M1d4(20ml) c. plántula M1d1(5ml), d. plántula M1d2(10ml), e. plántula M1d3(15ml).

6. CONCLUSIONES

Luego de analizar los resultados obtenidos podemos concluir que:

El medio que mejor resultado produjo en cuanto al crecimiento de las plántulas de *Epidendrum secundum* durante todo el periodo de experimentación fue el medio M1d1 (5ml) con un crecimiento a los 84 días de 0,5cm.

El medio que mejor resultado produjo en lo referente al crecimiento de raíces de *Epidendrum secundum* durante todo el periodo de experimentación fue el medio M1d0 (0ml) con un crecimiento de 0.90cm hasta los 84 días.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Al momento de sembrar distribuir espaciadamente y de una manera homogénea las plantas, para disminuir la competencia entre si, por los nutrientes.
- ❖ Dirigir el trabajo de investigación para encontrar medios y dosis específicos para cada género.
- ❖ Las futuras experimentaciones que estén dirigidas a etapas de replante proyecten la utilización de medios establecidos a concentraciones medias o incluso menores, más la adición de reguladores de crecimiento en una escala mínima para hallar un punto óptimo.
- ❖ Las resiembras se deben realizar cuando la planta tenga como mínimo 2 hojas y 1cm de largo para que se facilite la adaptación de la planta al medio.
- ❖ Se recomienda probar distintos periodos de tiempo y libras de presión aplicadas a procesos de esterilización como alternativa para evitar daños en sustancias termolábiles que son indispensables para las plantas.
- ❖ Usar el medio MS al 100% más concentraciones mínimas de AG3, BAP y ANA, esterilizando a 10 libras de presión y durante 10 minutos.
- ❖ Utilizar dosis de hormonas entre el 5% y 10% cuando se necesite acelerar el desarrollo de *Epidendrum secundum*.

8. BIBLIOGRAFIA

- ARDITTI J. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture manual. Vol 1. N.Y. EE.UU. Cornell University Press. 1977. 293 pp. 1era edición.
- BUSTOS T. Ecuador patria de orquídeas (Loja y Zamora Chinchipe). Loja. Ecuador. Editorial Universidad Técnica Particular de Loja. 2006. 286pp. 1era edición.
- CALLE G. Telmo. Monografía. Acercamiento al conocimiento sobre la Embriogénesis somática y sus aplicaciones agrícolas. La Habana. Cuba. 2005, Cita a (González et al 2002)
- CUYA M. 1997. Micropropagación de Orquídeas *In vitro*. Documento electrónico fuente de Internet (en línea)
- CLUB PERUANO DE LAS ORQUIDEAS. 2005. Documento electrónico fuente de Internet (en línea)
- DODSON b C. MÁRMOL P. 1989. Icones Plantarum Tropicarum. Orchids of Ecuador. Florida. EE.UU. Editorial The Marie Selby Botanical Garden.
- DODSON d C. Native ecuadorian orchids. Volumen 2. Quito. Ecuador. Soluciones Gráfica D & G Cia Ltda. 2002. 417pp. 1era Edición
- DODSON g C. Orchids of Ecuador. In. pret. (s. a.). (s. n.). (s. e.)
- DODSON, C. 2004. Native Ecuadorian Orchids Volume V: *Rodriguezia-Zygosepalum*. Imprenta Mariscal. Quito-Ecuador.
- ENDARA, L., C. DODSON, L. JOST, y A. TYE 2000. Orchidaceae in: Valencia, R. (Ed): Libro rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario de la Pontificia Universidad Católica de Quito – Ecuador.
- GARCÍA DE LA ROSA Gricela. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Chapigno México. 1986.
- GONZALEZ M, J IRIONDO, C. FERNANDEZ Y C. PERES. 1993. Manual de Laboratorio de técnicas de micropropagación. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid-España.
- HURTADO D. MERINO M. Cultivo de tejidos vegetales. México, D. F. México. Editorial Trillas. 1988. 232pp. Primera reimpresión.
- JORGENSEN, P. M., LEON-YANEZ (Eds.) 1999. Catálogo de plantas vasculares del Ecuador. Missouri Botanical Garden Press, 354 pp.

- MERCHÁN F. Cultivo de orquídeas *in vitro*. Cuenca. Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. (s.a.). 1-20
- MORÁN E. Propagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos: Apuntes teóricos. Cuba. Universidad del Oriente. Departamento de Biología. (s.a.). 150 pp. (s.e.)
- NAVARRO GARCIA Gines, Química Agrícola. Editorial Mundi prensa Barcelona España 2000.
- OBSARRAC, S. Orquídeas en su vida. Cuenca. Ecuador. Sin editorial. 2002. 7pp. 1ra edición.
- PÉREZ J. PROPAGACIÓN Y Mejora Genética de las Plantas por Biotecnología. Cuba Instituto de Biotecnología de las Plantas. Ediciones Geo. 1988. 155pp. (s.e.).
- PORTILLA José, DIAZ Alejandra, SALAZAR Luís. Manual de Cultivo de Orquídeas. 2007
- ROCA M. William, Cultivo de tejidos en la agricultura, Cali, Colombia, 1993.
- RODRIGUEZ, L. et al. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. Cuba. 2005.
- SÁNCHEZ, E. VÁZQUES D. R. AGUILAR. Reproducción de Orquídeas a partir de sus semillas utilizando medios de cultivos orgánicos e inorgánicos. Cuenca. Ecuador. Editorial talleres de I.I.C.T. 1994. 135pp. Edición Única.
- SEATON P. RAMSAY M. Growing Orchids from seeds. Italia.Royal Botanic. Gardens, Kew. Editorial Mandatory Printig. 2005. 83pp. 1ra
- WEAVER Robert J. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas (s.a.) México. 1976.
- Gass, J. D. 1973. Nictonic Acid Maculopathy. Am. J. Opthamology
- Lehninger, A. L., 1976. Curso breve de Bioquímica. Omega, Barcelona, 447 pp.
- PALEG, 1965. Revista de investigaciones agropecuarias. Serie 2, Biología y producción vegetal. Universidad California 1970.

9. ANEXOS

ANEXO N°1

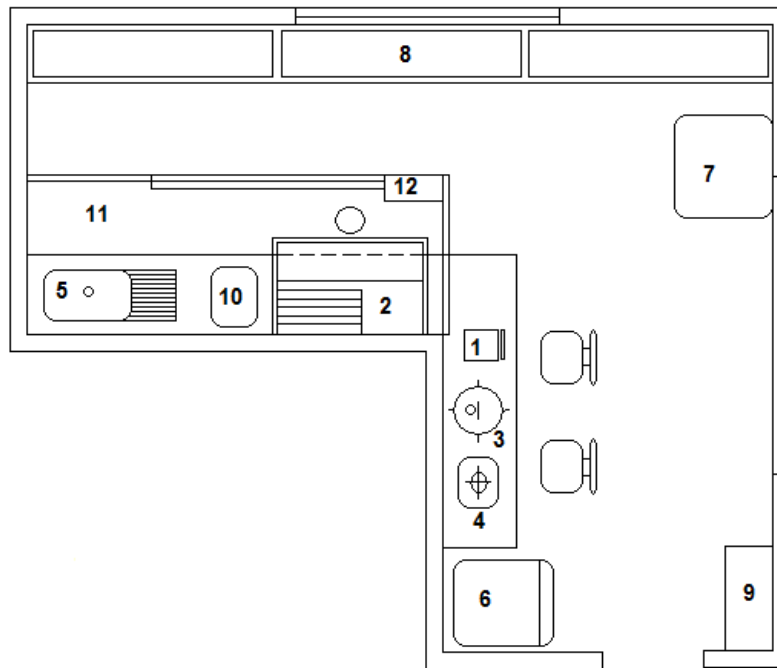


Diagrama de laboratorio

1. Balanza analítica, 2. Cámara de flujo laminar, 3. Autoclave, 4. Estufa, 5. Fregadero, 6. Refrigerador, 7. Mesa de trabajo, 8. Estantes de crecimiento, 9. Almacenamiento de químicos, 10. Instrumental, 11. Cabina, 12. Productor de ozono.

ANEXO N° 2 COMPONENTES DEL MEDIO MURASHIGE SKOOG AL 100% DE CONCENTRACIÓN

Soluciones Madre			
Solución A (Frasco oscuro al ambiente)	mg / L	g / L	g / 10L
Nitrato de Amonio	0	0	0
Nitrato de Potasio	1900	1.9	19
Nitrato de Sodio	1751	1.751	17.51
Solución B (Cubrir con papel aluminio y refrigerar)			
Sulfato de Magnesio	180.7	0.1807	1.807
Sulfato de Manganeso	16.9	0.0169	0.169
Sulfato de Zinc - 7H ₂ O	8.6	0.0086	0.086
Sulfato Cúprico - 5 H ₂ O	0.025	0.00025	0.0025
Solución C (Frasco oscuro refrigerar)			
Yoduro de Potasio	0.83	0.00083	0.0083
Cloruro de Cobalto - 6 H ₂ O	0.025	0.000025	0.00025
Cloruro de Calcio Anhídrido	332.2	0.3322	3.322
Solución D (Frasco oscuro al ambiente)			
Fosfato de Potasio monobásico	170	0.17	1.7
Ácido Bórico	6.2	0.0062	0.062
Ácido Molíbdico	0.25	0.00025	0.0025
Solución E (Frasco oscuro refrigerar)			
Sulfato ferroso - 7 H ₂ O	27.8	0.0278	0.278
EDTA	37.3	0.0373	0.373

ANEXO N° 3

Tablas de las pruebas de normalidad

Varianza k muestras 21 días.

Estadísticas simples:

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
M1d0	16	0	16	1.100	2.700	1.706	0.431
M1d1	16	0	16	1.400	3.300	2.138	0.446
M1d2	16	0	16	1.700	3.200	2.450	0.550
M1d3	16	0	16	1.400	3.100	2.081	0.489
M1d4	16	0	16	1.300	3.500	2.075	0.642

Prueba de Levene (Media) (M1d0):

F (Valor observado)	1.194
F (Valor crítico)	2.494
GDL1	4
GDL2	75
p-valor (unilateral)	0.320
Alfa	0.05

Interpretación de la prueba:

H0: Las varianzas no son significativamente diferentes.

La distribución es NORMAL

Ha: Al menos una de las varianzas es significativamente diferente de otra

Como el p-valor calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se puede aceptar la hipótesis nula H0.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es de 32,04%.

Varianza k muestras 42 días.

Estadísticas

simples:

Variable	Observaciones	Obs. con	Obs. sin	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
		datos perdidos	datos perdidos				
M1d0	16	0	16	1.200	2.900	1.813	0.430
M1d1	16	0	16	1.500	3.700	2.331	0.464
M1d2	16	0	16	1.800	3.300	2.525	0.565
M1d3	16	0	16	1.400	3.200	2.200	0.551
M1d4	16	0	16	1.400	3.600	2.219	0.619

Prueba de Levene (Media) (M1d0):

F (Valor observado)	1.527
F (Valor crítico)	2.494
GDL1	4
GDL2	75
p-valor (unilateral)	0.203
Alfa	0.05

Interpretación de la prueba:

H0: Las varianzas no son significativamente diferentes.

Ha: Al menos una de las varianzas es significativamente diferente de otra

Como el p-valor calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se puede aceptar la hipótesis nula H0.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es de 20,30%.

Varianza k muestras 63 días.

Estadísticas simples:

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
M1d0	16	0	16	1.300	2.900	1.850	0.437
M1d1	16	0	16	1.600	3.800	2.438	0.454
M1d2	16	0	16	2.000	3.330	2.591	0.552
M1d3	16	0	16	1.500	3.800	2.356	0.604
M1d4	16	0	16	1.400	3.700	2.381	0.605

Prueba de Levene (Media) (M1d0):

F (Valor observado)	1.252
F (Valor crítico)	2.494
GDL1	4
GDL2	75
p-valor (unilateral)	0.296
Alfa	0.05

Interpretación de la prueba:

H0: Las varianzas no son significativamente diferentes.

Ha: Al menos una de las varianzas es significativamente diferente de una otra

Como el p-valor calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se puede aceptar la hipótesis nula H0.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es de 29,63%.

Varianza k muestras 84 días.

Estadísticas simples:

Variable	Observaciones	Obs. con	Obs. sin	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
		datos perdidos	datos perdidos				
M1d0	16	0	16	1.400	3.000	1.969	0.425
M1d1	16	0	16	1.800	3.900	2.581	0.471
M1d2	16	0	16	2.000	3.400	2.688	0.568
M1d3	16	0	16	1.600	3.800	2.483	0.545
M1d4	16	0	16	0.000	3.700	2.288	0.855

Prueba de Levene (Media) (M1d0):

F (Valor observado)	1.206
F (Valor crítico)	2.494
GDL1	4
GDL2	75
p-valor (unilateral)	0.316
alfa	0.05

Interpretación de la prueba:

H0: Las varianzas no son significativamente diferentes.

Ha: Al menos una de las varianzas es significativamente diferente de una otra

Como el p-valor calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se puede aceptar la hipótesis nula H0.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es de 31,56%.

ANEXO N° 4

Tablas de media y error estándar crecimiento de plántulas

21 días

Estadística	M1d0	M1d1	M1d2	M1d3	M1d4
Media	1.706	2.138	2.450	2.081	2.075
Error estándar de la media	0.108	0.111	0.138	0.122	0.161

42 días

Estadística	M1d0	M1d1	M1d2	M1d3	M1d4
Media	1.813	2.331	2.525	2.200	2.219
Error estándar de la media	0.108	0.116	0.141	0.138	0.155

63 días

Estadística	M1d0	M1d1	M1d2	M1d3	M1d4
Media	1.850	2.438	2.591	2.356	2.381
Error estándar de la media	0.109	0.114	0.138	0.151	0.151

84 días

Estadística	M1d0	M1d1	M1d2	M1d3	M1d4
Media	1.969	2.581	2.688	2.483	2.288
Error estándar de la media	0.106	0.118	0.142	0.136	0.214

ANEXO N° 5

TEST DE DUNCAN 21 DÍAS

Tratamientos / Duncan / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
M1d2 vs M1d0	0.744	4.065	2.215	0.001	0.185	Si
M1d2 vs M1d4	0.375	2.050	2.165	0.179	0.143	No
M1d2 vs M1d3	0.369	2.016				No
M1d2 vs M1d1	0.313	1.708				No
M1d1 vs M1d0	0.431	2.357	2.165	0.094	0.143	Si
M1d1 vs M1d4	0.062	0.342	2.096	0.938	0.098	No
M1d1 vs M1d3	0.056	0.307				No
M1d3 vs M1d0	0.375	2.050	2.096	0.108	0.098	No
M1d3 vs M1d4	0.006	0.034				No
M1d4 vs M1d0	0.369	2.016				No

Categoría	Media estimada	Grupos
M1d2	2.450	A
M1d1	2.138	A
M1d3	2.081	A B
M1d4	2.075	A B
M1d0	1.706	B

TEST DE DUNCAN 42 DÍAS

Tratamientos / Duncan / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
M1d2 vs M1d0	0.712	3.799	2.215	0.003	0.185	Si
M1d2 vs M1d3	0.325	1.733	2.165	0.314	0.143	No
M1d2 vs M1d4	0.306	1.633				No
M1d2 vs M1d1	0.194	1.033				No
M1d1 vs M1d0	0.519	2.766	2.165	0.035	0.143	Si
M1d1 vs M1d3	0.131	0.700	2.096	0.764	0.098	No
M1d1 vs M1d4	0.113	0.600				No
M1d4 vs M1d0	0.406	2.166	2.096	0.084	0.098	Si
M1d4 vs M1d3	0.019	0.100	1.992	0.921	0.050	No
M1d3 vs M1d0	0.387	2.066	1.992	0.042	0.050	Si

Categoría	Media estimada	Grupos
M1d2	2.525	A
M1d1	2.331	A
M1d4	2.219	A
M1d3	2.200	A
M1d0	1.813	B

TEST DE DUNCAN 63 DIAS

Tratamientos / Duncan / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
M1d2 vs M1d0	0.741	3.914	2.215	0.002	0.185	Si
M1d2 vs M1d3	0.234	1.239	2.165	0.605	0.143	No
M1d2 vs M1d4	0.209	1.106				No
M1d2 vs M1d1	0.153	0.809				No
M1d1 vs M1d0	0.588	3.105	2.165	0.014	0.143	Si
M1d1 vs M1d3	0.081	0.429	2.096	0.904	0.098	No
M1d1 vs M1d4	0.056	0.297				No
M1d4 vs M1d0	0.531	2.807	2.096	0.017	0.098	Si
M1d4 vs M1d3	0.025	0.132	1.992	0.895	0.050	No
M1d3 vs M1d0	0.506	2.675	1.992	0.009	0.050	Si

Categoría	Media estimada	Grupos
M1d2	2.591	A
M1d1	2.438	A
M1d4	2.381	A
M1d3	2.356	A
M1d0	1.850	B

TEST DE DUNCAN 84 DIAS

Tratamientos / Duncan / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%:

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
M1d2 vs M1d0	0.719	3.433	2.215	0.008	0.185	Si
M1d2 vs M1d4	0.400	1.910	2.165	0.233	0.143	No
M1d2 vs M1d3	0.205	0.979				No
M1d2 vs M1d1	0.106	0.507				No
M1d1 vs M1d0	0.613	2.925	2.165	0.023	0.143	Si
M1d1 vs M1d4	0.294	1.403	2.096	0.345	0.098	No
M1d1 vs M1d3	0.099	0.472				No
M1d3 vs M1d0	0.514	2.454	2.096	0.043	0.098	Si
M1d3 vs M1d4	0.195	0.931	1.992	0.355	0.050	No
M1d4 vs M1d0	0.319	1.522	1.992	0.132	0.050	No

Categoría	Media estimada	Grupos
M1d2	2.688	A
M1d1	2.581	A
M1d3	2.483	A
M1d4	2.288	A B
M1d0	1.969	B

ANEXO N° 6

Pruebas de normalidad para la variable de crecimiento de raíces.

Estadísticas simples:

Variable	Observaciones	Obs. con	Obs. sin	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
		datos	datos				
		perdidos	perdidos				
M1d0	16	0	16	0.580	1.600	0.990	0.382
M1d1	16	0	16	0.100	0.500	0.369	0.163
M1d2	16	0	16	0.100	0.500	0.248	0.149
M1d3	16	0	16	0.000	0.400	0.098	0.173
M1d3	16	0	16	0.000	0.800	0.376	0.274

Prueba de Levene (Media) (M1d0):

F (Valor observado)	5.072
F (Valor crítico)	2.494
GDL1	4
GDL2	75
p-valor (unilateral)	0.001
alfa	0.05

Interpretación de la prueba:

H0: Las varianzas no son significativamente diferentes.

Ha: Al menos una de las varianzas es significativamente diferente de una otra

Como el p-valor computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la

hipótesis nula H_0 , y aceptar la hipótesis alternativa H_a .

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H_0 cuando es verdadera es menor que 0,11%.

ANEXO N° 7

Tratamiento M1d0



Tratamiento M1d1



Tratamiento M1d2



Tratamiento M1d3



Tratamiento M1d4

