

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
GERMINACIÓN “IN VITRO” DE LAS ORQUÍDEAS *Cyrtorchilum*
macranthum Y *Epidendrum jameisoni* Rchb.F.**

MARTÍN ISAAC MUÑOZ BARRIONUEVO

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN ESTRUCTURADO DE MANERA
INDEPENDIENTE COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



AMBATO - ECUADOR

2011

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de investigación, nos corresponde exclusivamente a: el Egresado Martín Isaac Muñoz Barrionuevo y a la Ing. Agr. M.Sc. Nelly Cherres R.; como también los análisis, conclusiones y recomendaciones; y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Técnica de Ambato”.

Cevallos, septiembre 2011

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Martín Isaac Muñoz', is written over a horizontal line.

Martín Isaac Muñoz Barrionuevo

AUTOR

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Nelly Cherres R.', is written over a horizontal line.

Ing. Agr. M.Sc. Nelly Cherres R.

DIRECTORA

DERECHO DE AUTOR

Al presentar esta tesis como uno de los requisitos previos para la obtención del título de Tercer Nivel en la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que haga de esta tesis un documento disponible para su lectura, según las normas de la universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de esta tesis dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la universidad Técnica de Ambato la publicación de esta tesis, o de parte de ella.

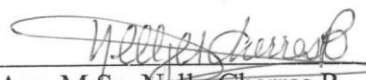


Martín Isaac Muñoz Barrionuevo

Fecha: 30/SEP/2011

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN “IN
VITRO” DE LAS ORQUÍDEAS *Cyrtorchilum macranthum* Y *Epidendrum
jameisoni* Rchb.F.**

REVISADO POR:


Ing. Agr. M.Sc. Nelly Cherres R.
DIRECTORA


Ing. Mg.Sc. Jaime Avalos R.
ASESOR DE BIOMETRÍA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO:

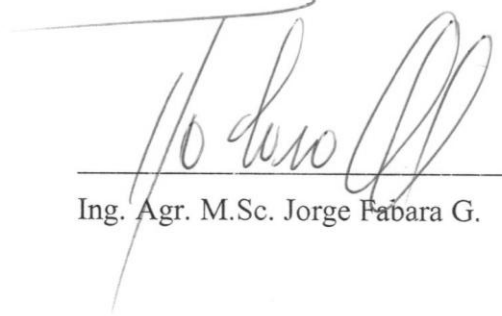
Fecha


Ing. Agr. Mg.Sc. Hernán Zurita V.
PRESIDENTE

29/09/11


Ing. Agr. M.Sc. Eduardo Cruz T.

28/sep/2011


Ing. Agr. M.Sc. Jorge Fabara G.

28/SEP/2011

DEDICATORIA

Este proyecto le dedico principalmente a Dios, por acompañarme y cuidarme siempre en todo momento.

Este trabajo, fruto de mi esfuerzo, deseo de superación y cumplimiento de mi sueño, se lo dedico a mis padres, José Muñoz y María Inés Barrionuevo, a mis hermanos, Juan, Diego, Soraya, a mi esposa Rocío Elizabet Pilco; a mis abuelitos; a mis tíos y a las personas que estuvieron cerca de mi, para que mi esfuerzo recompense en algo todo el amor, cariño y comprensión que me han sabido brindar.

Así mismo con profundo respeto y gratitud a las personas que me permiten ser mejor cada día y a los que nos impartieron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ingeniería Agronómica, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por preocuparse del bienestar de la comunidad a través de los beneficios de dicha carrera.

A mi tutora Ing. M.Sc. Nelly Cherres, ya que fue quien me guió con sus altos conocimientos para poder culminar esta presente Tesis.

A todos quienes fueron mis maestros de la Facultad de Ingeniería Agronómica, Medicina Veterinaria y Zootecnia gracias por inculcar y ser nuestros guías en la vida estudiantil.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	01
1.1. Planteamiento del problema	01
1.2. Análisis crítico del problema	01
1.3. Justificación	03
1.4. Objetivos	04
1.4.1 Objetivo general	04
1.4.2. Objetivos específicos	04
II. MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS	05
2.1. Antecedentes investigativos	05
2.2. Marco conceptual	05
2.2.1. Cultivo <u>in vitro</u>	05
2.2.1.1. Germinación de semillas	06
2.2.1.2. Medios de cultivo <u>in vitro</u>	08
2.2.2. Cultivo de las orquídeas	14
2.2.2.1. Origen	14
2.2.2.2. Importancia	14
2.2.2.3. Características botánicas	15
2.2.3. Características de las especies de orquídeas evaluadas	18
2.2.3.1. <i>Cyrtorchilum macranthum</i>	18
2.2.3.2. <i>Epidendrum jameisoni</i> Rchb.F.	19
2.3. Hipótesis	20
2.4. Variables de la hipótesis	20
2.5. Operacionalización de variables	20
III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	22
3.1. Modalidad y tipo de investigación	22
3.2. Ubicación del ensayo	22
3.3. Características del lugar	22
3.4. Factores en estudio	23
3.5. Diseño experimental	23
3.6. Tratamientos	23
3.7. Características del ensayo	24
3.8. Datos tomados	26

	Pág.
3.9. Manejo de la investigación	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Resultados, análisis estadísticos y discusión	32
4.1.1. Viabilidad de la semilla	32
4.1.2. Días a la germinación	32
4.1.3. Porcentaje de germinación	39
4.1.4. Altura de planta	46
4.1.5. Número de hojas	51
4.1.6. Días al trasplante	57
4.2. Resultados, análisis económico y discusión	63
4.3. Verificación de hipótesis	64
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
5.1. Conclusiones	65
5.2. Recomendaciones	66
VI. BIBLIOGRAFÍA	68
VII. APÉNDICE	71

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	21
CUADRO 2. TRATAMIENTOS	24
CUADRO 3. VIABILIDAD DE LA SEMILLA	32
CUADRO 4. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	33
CUADRO 5. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	34
CUADRO 6. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	34
CUADRO 7. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	35
CUADRO 8. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	35
CUADRO 9. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	36
CUADRO 10. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	37
CUADRO 11. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	37
CUADRO 12. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN	38
CUADRO 13. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	39

CUADRO 14. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	40
CUADRO 15. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	41
CUADRO 16. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	41
CUADRO 17. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	42
CUADRO 18. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	43
CUADRO 19. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, DENTRO DE LA ESPECIE E2, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	44
CUADRO 20. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	44
CUADRO 21. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	45
CUADRO 22. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	46
CUADRO 23. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y	

	Pág.
150 DÍAS	47
CUADRO 24. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIESES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	48
CUADRO 25. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	49
CUADRO 26. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	49
CUADRO 27. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	50
CUADRO 28. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	51
CUADRO 29. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS	52
CUADRO 30. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS	53
CUADRO 31. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIESES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS	53
CUADRO 32. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS	54
CUADRO 33. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS	55
CUADRO 34. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A	

	Pág.
LOS 120 Y 150 DÍAS	55
CUADRO 35. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTI- VO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS	56
CUADRO 36. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE	57
CUADRO 37. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE	58
CUADRO 38. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIESES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIA- BLE DÍAS AL TRASPLANTE	59
CUADRO 39. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE	59
CUADRO 40. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, DENTRO DE LA ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE	60
CUADRO 41. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTI- VO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLAN- TE	60
CUADRO 42. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, LA ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE	61
CUADRO 43. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE	62
CUADRO 44. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MA- DUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE	62
CUADRO 45. COSTOS DE INVERSIÓN DEL ENSAYO	63
CUADRO 46. COSTOS VARIABLES DEL ENSAYO POR TRATAMIENTO	64

RESUMEN EJECUTIVO

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Ambato, localizada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, a 16 km, al Sur Oeste de la ciudad de Ambato, en las coordenadas geográficas 01° 22' 20" de latitud Sur y 78° 36' 22" de longitud Oeste, a la altitud de 2 688 m.s.n.m, con el objetivo de: evaluar la germinación de semillas de cápsulas verdes y maduras de las orquídeas *Cyrtorchilum macrantum* y *Epidendrum jameisonic* y determinar el medio de cultivo para la germinación in vitro de semillas.

Se utilizó el diseño de bloques completamente al azar (DBCA), mediante distribución grupal, con tres repeticiones. Los tratamientos fueron 24. Se efectuó el análisis de variancia mediante análisis grupal, agrupando el factor especies de orquídeas; pruebas de Tukey al 5% y pruebas de Diferencia Mínima Significativa al 5%. Se efectuó así mismo el análisis de costos de cada uno de los tratamientos.

La orquídea *Epidendrum jameisonic* (E2), reportó los mejores resultados, con menor tiempo a la germinación (90,92 días), mayor porcentaje de germinación a los 90 días (38,98%), como a los 120 días (48,00%) y a los 150 días (67,56%); mayor crecimiento en altura de planta a los 90 días (0,19 cm), a los 120 días (0,56 cm) y a los 150 días (1,01 cm); mejor número de hojas a los 120 días (1,03 hojas) y a los 150 días (2,25 hojas) y menor tiempo al trasplante (99,31 días).

Dentro de la especie *Cyrtorchilum macranthum* (E1), los tratamientos de cápsulas verdes (C1) germinaron en menor tiempo (91,78 días), alcanzando mayor germinación a los 90 días (31,17%), a los 120 días (32,19%) y a los 150 días (79,66%), redujeron el tiempo al trasplante (100,78 días). El medio M4 (Murashigue & Skook 1+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l), produjo mayor precocidad a la germinación (65,17 días) y al trasplante (71,17 días); los tratamientos del medio de cultivo M5 (Murashigue & Skook 1/2+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l) reportaron mayor porcentaje de germinación a los 90 días (56,89%) y a los 150 días (94,30%), como mayor altura de planta a los 90 días (0,17 cm), a los 120 días (0,33 cm) y a los 150 días (0,53 cm), con mejor número de hojas a los 120 días (1,17 hojas) y a los 150 días (2,00 hojas).

Dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), los tratamientos de cápsulas verdes (C1), redujeron los días a la germinación (98,06), mejorando la germinación a los 90 días (64,44%), a los 120 días (65,83%) y a los 150 días (95,43%), alcanzaron mayor altura de planta a los 90 días (0,32 cm), a los 120 días (0,87 cm) y a los 150 días (1,53 cm), con mayor número de hojas a los 120 días (1,17 hojas) y a los 150 días (2,72 hojas). El medio M4 (Murashigue & Skoock 1+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l), produjo mayor precocidad a la germinación (64,00 días) y al trasplante (72,17 días) y el medio M3 (Murashigue & Skoock 1/4+ carbón activado 8 g/l), mayor porcentaje de germinación a los 90 días (69,13%), a los 120 días (74,08%) y a los 150 días (76,65%), con plántulas de mayor altura a los 90 días (0,52 cm), a los 120 días (1,07 cm) y a los 150 días (1,77 cm) y mejor número de hojas a los 120 días (2,00 hojas) y a los 150 días (3,83 hojas).

Del análisis de costos se concluye que, en general, el costo fue menor en los tratamientos cuyos medios no incluyeron pulpa de plátano, especialmente aquellos que se conformaron del medio de cultivo M3 (Murashigue & Skoock 1/4+ carbón activado 8 g/l), debido a la menor concentración de Murashigue & Skoock, respectivamente.

I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La pérdida de su hábitat es la principal amenaza para la persistencia de la especie, a la cual se exponen la familia de las orquidáceas a nivel mundial y la causa directa es la actividad humana que busca nuevos territorios en donde desarrollar actividades con fines económicos.

1.2. Análisis crítico del problema

En Ecuador, la actividad agropecuaria se halla desarrollada en especial la ganadería extensiva, en un mayor porcentaje por pequeños productores, que es la causante de la tala de nuestros bosques, seguido de la agricultura de subsistencia realizada por familias de bajos recursos quienes colonizan zonas boscosas vírgenes para producir los alimentos que son el sustento de sus familias. Este tipo de actividad ocasiona grandes pérdidas de biodiversidad lo cual degenera en un círculo de miseria y pobreza, ya que las zonas colonizadas pierden pronto los nutrientes existentes en los suelos producto de la erosión de la tierra desprotegida. Motivando de esta forma, la colonización de nuevas zonas boscosas en busca de suelos más fértiles y la pérdida de la biodiversidad (Central Ecuatoriana de Servicios Agropecuarios, 1992)..

La tala de árboles para el aprovechamiento forestal es otra de las causas de la pérdida de nuestras orquídeas. Esta actividad, aún cuando se haga de manera selectiva, es decir, talando únicamente los árboles madereros adultos, ocasiona un gran daño a la población de orquídeas y demás epífitas del bosque ya que las mismas habitan en su mayoría en el dosel de los árboles de mayor altura. Además, existen orquídeas que únicamente se desarrollan en determinadas especies de árboles que de desaparecer provocarían la extinción de las mismas. Además, al producirse los claros de luz en las áreas en donde se ha talado el árbol adulto, se produce una sobre exposición solar en zonas que anteriormente se encontraban en penumbra, lo que produce la sobre irradiación debido a la exposición solar directa, que ocasiona que las plantas afectadas mueran producto de las quemaduras por la luz solar (Franqueza, 2011).

La colecta y comercio ilegal de plantas silvestres es la tercera causa de la pérdida de la biodiversidad del bosque. Al ser las orquídeas, dentro de nuestra flora de gran valor económico, genético, cultural, ornamental, se genera un comercio ilegal de plantas que en su mayoría son extraídas de su medio natural, ejerciendo tanta presión sobre la población existente, que en la mayoría de los casos ocasiona la desaparición de las plantas de las áreas aledañas al sitio en donde vive el comerciante o vendedor de orquídeas (La Molina, 2010).

El crecimiento de las ciudades, producto del aumento de la población, contribuye a la destrucción del hábitat de las orquídeas, ya que por regla general el desarrollo de los nuevos asentamientos lleva consigo el desmonte de la vegetación existente y en algunos casos la canalización y pavimentación de las quebradas existentes. Así mismo, por el incremento de habitantes que han establecido su residencia en zonas rurales o zonas agrícolas, fragmentando los bosques existentes con la creación de nuevas urbanizaciones y cambiando el clima de la zona en donde se desarrollan (Franqueza, 2011)..

El aumento de la temperatura y el cambio de duración de las estaciones seca y húmeda, producto de la contaminación del ambiente y la tala indiscriminada, provoca efectos negativos en la salud de las comunidades de orquídeas, afectando su periodo de floración y el ciclo de vida de sus polinizadores. El incremento de la estación seca o de la humedad ambiental puede ocasionar la muerte o pudrimiento de los nuevos brotes y alterar el periodo de floración de las orquídeas. Este efecto, a simple vista, es el que menos percibimos, pero que a lo largo de los años puede afectar enormemente la supervivencia de las plantas (La Molina, 2010).

El desarrollo de la reforestación en nuestro país con especies exóticas incrementa la pérdida del hábitat para el crecimiento y desarrollo de las especies epifitas. La reforestación con pino, eucalipto y otras especies foráneas, así como el uso de la teca procedente de la India, imposibilitan la colonización de nuevas comunidades de orquídeas en las zonas reforestadas (Franqueza, 2011).

La práctica común, en nuestro país, de tumba y roza y la quema de los residuos del bosque talado y pastizales afecta principalmente a las orquídeas terrestres y a especies que se han adaptado a crecer en potreros y estacas de cercas (La Molina, 2010).

La germinación de semillas de orquídeas en el medio natural se reproduce en asociación con micorrizas que permiten su correcta adaptación al medio; en condiciones artificiales la reproducción asexual mediante esquejes provee máximo de tres a cinco nuevas plantas al año y no permite la obtención masiva, lo que dificulta la producción comercial de orquídeas (Franqueza, 2011).

1.3. Justificación

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo como son la obtención de nuevas plantas en sustratos, cultivo de estacas, estolones, tubérculos, hojas, etc., el cultivo in vitro es una poderosa herramienta que permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, herramienta aplicable para la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. El enorme potencial que posee este método, ha propiciado que en los últimos 25 años se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo de tejidos en el país, para la producción comercial de plantas ornamentales y frutales lo que ha motivado que algunos floricultores lo estén utilizando como una alternativa viable en sus programas de producción (Cañas, 1991).

El cultivo in vitro permite el mejoramiento genético de las especies produciendo nuevas plantas más productivas o más vistosas como son las plantas ornamentales. Además nos permite la domesticación de las orquídeas a un hábitat controlado y así realizar su producción y comercialización (Invitrorquideas, 2010).

Debido a la belleza y a los altos costos que alcanzan las orquídeas actualmente, son motivo de cultivo por particulares e industriales como plantas ornamentales y para la venta de flor cortada, lo que tiene una gran importancia económica a nivel mundial (Sánchez, 2009).

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar una sólida base tecnológica para germinación in vitro de semillas de dos especies de orquídeas *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* procedentes del bosque húmedo montano de la parroquia El Triunfo.

1.4.2. Objetivos específicos

Evaluar el proceso de germinación de semillas de las orquídeas especies *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic*, en dos estados de madurez, cápsulas verdes y maduras.

Determinar el medio de cultivo apropiado para la germinación in vitro de semillas de orquídeas.

II. MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS

2.1. Antecedentes investigativos

En un estudio de medios de cultivo para la inducción de brotes en callos de orquídeas terrestres (*Blettia purpure*), efectuado en la Universidad Del Pinar del Río en Cuba, destacó como los resultados mas relevantes al medio MSO (sacarosa 20 g/l, Vit Gambort 25 ml, ANA 0,2 mg/l, 6BA 2 mg/l, Agar 8 g/l y pH 5,4) con promedios de 20,25 brotes, color verde intenso y vigorosos (García y Hernández, sf).

El objetivo de otro trabajo fue determinar el medio de cultivo apropiado para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. La germinación se realizó en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), mientras que para el desarrollo de las plántulas se probaron los medios MS (T1), MS (T2) suplementados con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y carbón activado y MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y polivinil pirrolidona (T3). La germinación alcanzada fue de 47,69%. El análisis de medias Tukey mostró diferencias significativas para número de brotes, longitud de hoja, número de raíz y altura de plántula. El comportamiento de las variables evaluadas mostró que el medio de cultivo (T3) suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y polivinil pirrolidona influyó de manera positiva en el desarrollo de las plantas, mejorando el tamaño de las hojas y la altura de las plántulas (Flores et al, 2008).

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Cultivo *in vitro*

Hurtado y Merino (1988) mencionan que desde 120 años aproximadamente, en las investigaciones fisiológicas se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos de tallo y hojas y algunas veces ovario, óvulos, anteras y polen. Los mismo autores cita que los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Sacks (1860) y Knops (1861), quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran

sustancias inorgánicas y prepararon una solución nutritiva que las contenía, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces. En 1878 Volchting estudió la polaridad en la formación de nuevas yemas y raíces de yemas axilares en *Salix* que se suspendían en una nueva cámara Bellgar de vidrio vacío; las yemas brotaron de la parte superior y las raíces de la parte inferior terminal.

Murashigue y Skoog (1962), experimentaron con cultivos de tejidos y células, en medios que contenían sales y azúcares; reportaron en 1932 los resultados de sus primeras experiencias y su teoría sobre la totipotencia celular, que es la capacidad que tienen las células vegetales para producir una planta completa y fértil a partir de una célula.

2.2.1.1. Germinación de semillas

McKendrick (2000), menciona que las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas de polvo porque son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento. Usualmente estas semillas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorriza, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento. Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. En el caso de orquídeas terrestres, es de vital importancia que la relación orquídea-hongo se conserve durante los estados tempranos del ciclo de vida de la planta ya que el protocormo enterrado no puede fabricar alimento por sí mismo. Por otro lado, los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento. La relación orquídea-hongo no ha sido en su totalidad investigada para el caso de las orquídeas tropicales.

Cañas (1991), menciona que bajo condiciones naturales, las semillas de orquídeas son liberadas de sus cápsulas cuando estas maduran y son llevadas por el viento, pudiendo germinar y crecer si eventualmente caen en un

medio adecuado para la germinación. Sin embargo, dichas semillas tienen pocas posibilidades de sobrevivir, debido a que muchas de las especies de orquídeas sólo son capaces de crecer en presencia de un hongo simbiótico: *Rhizoctonia spp.* Las semillas de orquídeas pueden germinar en troncos y raíces de árboles establecidos; sin embargo, el porcentaje de germinación es muy bajo. A pesar de que cada cápsula puede contener aproximadamente tres millones y medio de semillas, en el hábitat natural sólo unas cuantas germinan, dificultando así la selección y producción masiva para fines comerciales.

Pierik (1989), describe la germinación de las semillas de orquídeas, de la siguiente forma: el embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen, después se inicia la división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células y sobre aquel se puede distinguir un meristemo del vástago. Luego se diferencian los órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comienza un período de crecimiento intenso. Si el protocormo está expuesto a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrollan hojas. Como resultado de la formación de la clorofila la planta se hace autótrofa, luego se forman las raíces verdaderas en forma endógena. Posteriormente el protocormo y los rizoides pierden su misión nutritiva y desaparecen.

Grupo CRO (Cultivadores Rosarinos de Orquídeas) (2007), menciona que mediante la germinación in vitro, se reproducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan. Hay dos tipos básicos de germinación in vitro: simbiótica y asimbiótica. En la germinación simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo micorriza apropiado. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que éste produzca hojas y se vuelva autotrófico. Esta técnica es ampliamente usada para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas. Tiene la ventaja de usar un medio simple (uno de los más comúnmente usados consiste en avena en polvo con una pequeña cantidad de extracto de levadura) y como resultado las plantas micorrizales suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente. Sin embargo, la desventaja es que se necesita

seleccionar el tipo de hongo micorriza adecuado para que se origine la simbiosis y prevenir parasitismo y la consecuente muerte de las semillas. La germinación asimbiótica es usada para la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes en zonas templadas. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo.

2.2.1.2. Medios de cultivo in vitro

Según Thompson (1980), el medio puede ser preparado ya sea utilizando ingredientes básicos o adquirirlo preparado. Hay diferentes tipos de medios disponibles así como otros específicos para ciertas especies diseñados por expertos profesionales. Cuando se inicia el proceso de germinación de una nueva especie es aconsejable probar con diferentes medios a una concentración total y parcial para determinar cuál es el mejor medio para dicha especie. Por ejemplo, el género *Masdevallias* es conocido como un género "escogedor" del medio sobre el cual se va a desarrollar. El nivel de pH es también importante. La mayoría de orquídeas germinan en un medio de pH 5,5, sin embargo, especies andinas prefieren niveles más altos de pH, 5,6 al 5,9.

Las preparaciones comerciales de Phytamax (Químicos Sigma, Aldrich, Inglaterra) y Murashige y Skoog, cualquiera de estos medios pueden ser preparados tanto a una concentración parcial o total (la concentración parcial es recomendada para Murashige y Skoog).

Hurtado y Merino (1988), señalan que el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, asepsia, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Según los autores, los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales, materiales inertes de soporte.

2.2.1.2.1. Sales inorgánicas

Los mismos autores mencionan que se han llevado a cabo investigaciones con el fin de optimizar las necesidades de plantas específicas, lo cual ha traído como consecuencia la formulación de varias mezclas salinas. La fórmula de Murashige y Skoog (1962) se ha demostrado que es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta. La fórmula contiene grandes cantidades de macro nutrientes y contiene una alta concentración de nitrógeno en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 . Recomiendan generalmente el empleo de diluciones de 3 a 1.

2.2.1.2.2. Compuestos orgánicos

Hurtado y Merino (1988) dicen que se pueden clasificarlos en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean otros aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

2.2.1.2.3. Fuente de carbono

Estos autores, mencionan que la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada y se emplea a una concentración de 2 a 396 ppm; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledoneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies.

2.2.1.2.4. Sustancias hormonales

Parra (2007), dice que las hormonas vegetales, compuestos químicos especializados producidos por las plantas, son los principales

factores internos que controlan el crecimiento y el desarrollo. Las hormonas se producen en cantidades muy pequeñas en unas partes de las plantas y son transportadas a otras, donde ejercen su acción. Una misma hormona puede desplegar efectos distintos en diferentes tejidos de destino

2.2.1.2.5. Auxinas

El mismo autor señala que la auxina, una de las más importantes hormonas vegetales, se sintetiza en las yemas apicales de los tallos y pasa desde allí a otras partes de la planta, donde puede tanto estimular el crecimiento como inhibirlo. En los tallos, por ejemplo, la auxina favorece el alargamiento de las células y la diferenciación del tejido vascular, mientras que en las raíces inhibe el crecimiento en la parte central y favorece la formación de raíces adventicias. También retrasa la abscisión o caída de flores, frutos y hojas.

Parra (2007), menciona que las funciones de las auxinas son las siguientes: dominancia apical, aumentar el crecimiento de los tallos, promover la división celular en el cambium vascular y diferenciación del xilema secundario, estimular la formación de raíces adventicias, estimular el desarrollo de frutos (partenocárpicos en ocasiones), fototropismo, promover la división celular, promover la floración en algunas especies, promover la síntesis de etileno (influye en los procesos de maduración de los frutos) y favorece el cuaje y la maduración de los frutos, inhibe la abscisión ó caída de los frutos.

Hurtado y Merino (1988), mencionan que las auxinas se usan en una concentración de 0,1 a 1 0,0 mg/1. Principales auxinas utilizadas para la preparación de medios de cultivo: ácido 3-indolacético (ALA) (muy termolábil), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 4-clorofenoxiacético (CPA), ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Tordon, producto comercial, M. R.).

2.2.1.2.6. Citocininas

Parra (2007), informa que las citocininas se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas. Transporte en la planta por vía acropétala, desde el

ápice de la raíz hasta los tallos, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema. Funciones: estimulan la división celular y el crecimiento, inhiben el desarrollo de raíces laterales, rompen la latencia de las yemas axilares, promueven la organogénesis en los callos celulares, retrasan la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales, promueven la expansión celular en cotiledones y hojas, promueven el desarrollo de los cloroplastos.

Hurtado y Merino (1988), mencionan que las citocininas se usan en una concentración de 0,03 a 30,0 mg/l. Principales auxinas utilizadas para la preparación de medios de cultivo: N⁶ bencil aminopurina (BA), N⁶ dimetil alil aminopurina (2iP), N⁶ furfuril aminopurina (cinetina), N⁶ (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina (zeatina).

2.2.1.2.7. Vitaminas

Miller y Erston (2010), señalan que las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, asemejándose a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo.

Los mismos autores mencionan que la tiamina (B1), es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Por eso, sin esta vitamina las células vivas no pueden realizar sus funciones vitales siendo utilizada en 0,4 mg/l.

La riboflavina (B2), es necesaria para el crecimiento de las raíces y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radicular. Una gran cantidad de auxina inhibe el crecimiento de la raíz.

La niacina (B12), desempeña un papel importante en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, que son grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación.

El ácido ascórbico (vitamina C), interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de oxidación-reducción. Se emplean cristales de ácido ascórbico (vitamina C) para reducir los taninos oxidados in vitro o en la superficie de frutos recién cortados.

Hurtado y Merino (1988), dicen que la única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivos de células y órganos es la tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos.

2.2.1.2.8. Aminoácidos y amidas

Los mismos autores señalan que los requerimientos de aminoácidos y/o amidas se pueden determinar rápidamente por medio de la adición de un hidrolizado proteico. Cualquier efecto positivo puede ser investigado por una adición posterior de una mezcla de aminoácidos y amidas en lugar del hidrolizado. Así, un aminoácido o amida específicos pueden detectarse por un proceso de eliminación.

Los aminoácidos y amidas que han demostrado tener efectos benéficos son la L-arginina, ácido L-aspartico, L-asparagina, ácido L-glutámico y L-glutamina. La L-serina juega un papel muy importante en la iniciación de embriones haploides en cultivos de anteras; la L-tirosina es crítica en la formación de tallos de cultivos de callos.

2.2.1.2.9. Otros compuestos orgánicos

Los mismos autores manifiestan que entre los hexitoles el inositol tiene un efecto estimulante muy significativo. La concentración de inositol comúnmente empleada es de 100 mg/1. En la producción de embriones haploides a partir de microsporas aisladas se emplean 500 mg/1.

La adenina o el sulfato de adenina frecuentemente favorecen la formación de tallo in vitro. Su concentración varía de 40 a 160 mg/1.

Las bases nitrogenadas (ácido citidílico y guanílico) promueven el crecimiento de cultivos de callos, usándose en una concentración de 100 mg/l.

Cuando se agrega jugo de naranja, el aumento en el crecimiento de algunos callos es atribuible, parcialmente, al ácido cítrico. Este ácido, junto con ascórbico, se emplea para evitar la oxidación de ciertos inóculos.

El ácido málico, en una concentración de 100 mg/l, se emplea en algunos medios para el cultivo de embriones.

2.2.1.2.10. Complejos naturales

Hurtado y Merino (1988), mencionan que muchas preparaciones de composición indefinida han sido empleadas para enriquecer los medios de cultivo; frecuentemente se han empleado como última alternativa después de que todos los ingredientes definidos del medio han fallado en el establecimiento de cultivos de células y órganos. Ejemplos de estas preparaciones son las siguientes:

Ingredientes	Concentración
Pulpa de plátano:	150 g/l
Endospermo de coco:	10 a 20%
Emulsión de pescado:	1 cu/l
Extracto de malta:	500 mg/l
Jugo de naranja:	3 a 30%
Hidrolizado proteico: (caseína, lactoalbúmina, peptona y triptona)	30 a 3 000 mg/l
Jugo de tomate:	30%
Extracto de levadura:	50 a 5 000 mg/l

El hidrolizado proteico se emplea principalmente como fuente de aminoácidos. El jugo de naranja contribuye con el ácido cítrico, así como con otros estimulantes del crecimiento, no identificados. La pulpa de plátano y la emulsión de pescado se usan principalmente en los medios para cultivo de orquídeas,

mientras que el endospermo de coco, extracto de malta y extracto de levadura tienen un uso más general.

2.2.1.2.11. Materiales inertes de soporte

Hurtado y Merino (1988), dicen que el agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibidoras o estimulantes del crecimiento. Otros agentes gelificantes usados algunas veces en lugar del agar son la poliacrilamida y la silicagel. En medio líquido se usa, papel filtro como puente o plataforma que es muy frecuente, así como la fibra de vidrio, recomienda añadir carbón, en bajas concentraciones, ayuda a adsorber sustancias que se forman como desecho en algunos medios de cultivo, se emplea carbón que debe ser muy fino y preferentemente prelavado.

2.2.2. Cultivo de las orquídeas

2.2.2.1. Origen

Según Caneva (1984), las orquídeas son mencionadas en escritos chinos que datan de varios siglos A.C. Sin embargo, el primero que las estudió con criterio científico fue el filósofo y naturalista griego Teofrasto. Muchas centurias después Carlos de Linneo (1707-1778), se interesó por ellas como lo hicieron durante el siglo XVIII, Nicolaus Joseph Jacquin, Hipólito Ruiz López y José Pavón, seguidos más tarde en el siglo XIX, por Humbolt, Darwin, Noel Bernard y otros. El autor cree que especial mención merecen las curiosidades observadas por Darwin, quien intentó explicar la influencia que tienen los insectos sobre las curiosas formas que presentan las orquídeas especialmente en sus funciones reproductivas.

2.2.2.2. Importancia

Tiscornia y Tiscornia (1963), señalan que las orquídeas son especies muy importantes por la belleza, extraña forma y colorido de sus flores y desde su punto de vista científico presentan una serie de características singulares.

Baines y Key (1981), creen que la familia de las orquídeas más que ninguna otra, contiene las flores más maravillosa, por su color, forma y a veces por su fragancia.

2.2.2.3. Características botánicas

Sánchez (2009), menciona que por lo general, las orquídeas se encuentran adaptadas a la vida sobre troncos y ramas de árboles que les sirven únicamente de soporte, es decir, que son epífitas y no parásitas. La mayoría de las especies de orquídeas existentes en nuestro país son epífitas. Un rasgo característico de este tipo de plantas es la presencia de pseudobulbos, que son engrosamientos del tallo compuestos de uno o más entrenudos y funcionan como almacén de agua y alimento. En algunos sirven como hospederos de colonias de insectos asociados. Las orquídeas también pueden crecer directamente sobre el suelo (terrestre). En este caso los pseudobulbos son sustituidos por cormos o tubérculos que son el equivalente a tallos subterráneos engrosados, o bien, pueden presentar raíces suculentas. Otro sustrato en el que se pueden desarrollar las orquídeas es sobre materia orgánica en descomposición (saprofíticas). Se ha reportado también la existencia de orquídeas subterráneas.

2.2.2.3.1. Sistema radicular

Grupo CRO (Cultivadores Rosarinos de Orquídeas) (2007), menciona que el sistema radicular de las orquídeas se diferencia de las raíces del resto de plantas. Son más gruesas, de color blanco, gris o amarillento y de superficie similar a un alambre. La función de todas las raíces es de absorber agua y nutrientes. Las orquídeas han llegado a la especialización de éstas y llegan a tener la función de asimilación. En las orquídeas epífitas han desarrollado las raíces aéreas, debido al modo de vida, ya que estas especies no pueden absorber el agua del suelo. Otra función de las raíces aéreas es la de anclar la planta a la base, incluso cuando la raíz ha muerto sirven de alambre. La mayoría de las orquídeas epífitas tienen las raíces aéreas cubiertas con una capa de células muertas conocidas como velamen que absorben la humedad presente en la atmósfera. Cuando se llena de agua el velamen se vuelve transparente permitiendo a la luz alcanzar el tejido verde de las raíces

desarrollándose el proceso de fotosíntesis. Cuando el agua escasea el velamen seco restringe la pérdida de agua de las raíces.

2.2.2.3.2. Pseudobulbos

El mismo autor, cita que los engrosamientos de las orquídeas no tienen nada que ver con los bulbos. Están formados por un nódulo engrosado de forma redondeada, o varios nódulos engrosados, llamados pseudobulbos. Sirven para almacenar nutrientes y agua. En el vértice de los pseudobulbos hay una o dos hojas, a veces están envueltos en vainas. A la unión entre dos pseudobulbos se le llama rizoma.

2.2.2.3.3. Tallo

Dimitri (1972), describe que las orquídeas poseen tallos erguidos, postrados o trepadores por medio de raíces adventicias y otros presentan tallos engrosados en pseudobulbos.

2.2.2.3.4. Hojas

El mismo autor describe que las hojas de las orquídeas, como las hojas de otras plantas, tienen la función de transformar sustancias inorgánicas en orgánicas, a través de la fotosíntesis. Pero en las orquídeas saprófitas, las hojas carecen de función y quedan reducidas a escamas o vainas. Las hojas son como en el resto de las monocotiledóneas, enteras, nunca compuestas, con nervios longitudinales paralelos, aunque en algunos casos pueden presentar unos nervios secundarios transversales. Pueden ser redondas, alargadas, tiernas, suculentas (carnosas). En ocasiones las orquídeas utilizan sus hojas como órganos de almacenamiento.

2.2.2.3.5. Flores

Grupo CRO (Cultivadores Rosarinos de Orquídeas) (2007), señala que algunas de las orquídeas producen una sola flor, otras son capaces

de dar lugar a miles de flores. Las flores son de los más variados colores. Algunas plantas florecen sólo una vez al año; otras florecen varias veces al año. Algunos géneros de orquídeas tienen flores fragantes; otros no. Estructuralmente, la flor es trómera. Pero con la adaptación de la flor a los insectos polinizadores, ha habido una reducción de los pétalos con respecto a los sépalos; el tercer pétalo es denominado labelo. El labelo puede tener forma de zapato, como en las “zapatillas de Venus” (*Paphiopedilum* etc). Sobre la superficie del mismo se suelen detectar unas protuberancias carnosas, son como unas estrías llamadas callos. El labelo, durante el desarrollo, se sitúa en la parte inferior y sirve de pista de aterrizaje de los insectos. La zona más especializada de la flor, se llama columna. Ésta, contiene los órganos reproductores fusionados, a excepción del ovario. La columna suele estar coloreada, decorada y conformada para inducir a los insectos a probar el néctar. Las orquídeas poseen tres estambres, generalmente solo uno es funcional y éstos están soldados al estilo y al estigma; el órgano resultante recibe el nombre de ginostemo. El único estambre fértil presenta dos lóculos situados cerca del ápice del ginostemo, albergando cada uno de uno a cuatro polinios, constituidos por los granos de polen agrupados en tétradas. De los tres estigmas que existen, solo dos son fértiles y el tercero está situado entre los polinios y la cavidad estigmática, de esta forma se evita que se produzca la autopolinización. El resultado de estas estructuras, confieren a la flor una simetría bilateral, con un solo eje de simetría, llamada zigomorfa. Los insectos, atraídos por la flor, la polinizarán inconscientemente y la semilla comenzará a crecer en una cápsula. Cada cápsula contiene cientos de miles de semillas, cuyas dimensiones son tan minúsculas que se encuentran entre las más pequeñas producidas por las plantas florales en todo el mundo. El tamaño de las semillas de las orquídeas, pueden ser tan pequeñas como 0,03 milímetros. Algunas cápsulas de las orquídeas *Cattleya* llegan a tener hasta cinco millones de semillas.

2.2.2.3.6. Fruto

Dimitri (1972), describe que las orquídeas poseen frutos llamados cápsula, raramente baya, con placentación parietal, multiovular.

2.2.2.3.7. Semillas

El mismo autor dice que las orquídeas poseen semillas con embrión generalmente no diferenciado sin tejido nutritivo.

Pierik (1989), señala que las semillas de orquídeas son muy pequeñas, 1-2 mm de largo y 0,5-1 mm de ancho. Se producen en cantidades elevadas por cápsula: 1 300-4 000 000. Las semillas constan de una testa 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.

2.2.2.3.8. Crecimiento

Dimitri (1972), dice que la forma de crecimiento de las plantas son simpodiales o monopodiales. Las primeras crecen a partir de una serie de brotes y las monopodiales, crecen a partir de un único brote. El brote principal crece de forma ilimitada, pero en este caso el crecimiento se interrumpe dependiendo de las condiciones climáticas. Las flores en el crecimiento simpodial aparecen al final o a los lados del brote, mientras que los monopodiales son siempre laterales.

2.2.3. Características de las especies de orquídeas evaluadas

2.2.3.1. *Cyrtorchilum macranthum*

El nombre, derivado del griego hace alusión a uno de los rasgos característicos del género; *Kwtos* “curvo”, *Kheilos* “labio, labelo”. Las plantas son predominantemente terrestres, en laderas y en orillas de los bosques, y trepan con sus largos rizomas por los matorrales y los árboles vecinos. Las inflorescencias, pueden alcanzar varios metros, llevan en ramos laterales cortos, con ordinariamente 4-5 flores cada uno, un total de hasta cien flores, que pueden tener hasta 10 cm de diámetro. Las flores son de color amarillo en el centro de color morado y blanco. Los sépalos son unguiculados y con bordes ondulados. El “labelo

curvo” es de tal consistencia que resulta imposible aplanarlo y siempre tiene forma triangular, de manera que los ángulos basales se doblan hacia abajo y aparecen como lóbulos laterales (Sociedad Colombiana de Orquideología, 1993).

La columna es erecta, a veces sigmoidea y soldada por su base con el labelo. El callo del labelo consta de varios tubérculos dispuestos uno en frente del otro. Los polinios tienen un estípite ancho, rectangular hasta transversalmente ovalado. Las plantas tienen rizomas alargados, quedando los pseudobulbos separados unos de otros. Los pseudobulbos aparecen envueltos por 3-4 pares de hojas cuyas laminas tienen 40-80 cm de longitud (Sociedad Colombiana de Orquideología, 1993).

La clasificación botánica según Font Quer (1976), es de la siguiente manera:

Reino:	Vegetal
División:	Angiosperma
Orden:	Gynandrales
Familia:	Orchidaceae
Genero:	<i>Cyrtochilum</i>
Especie:	<i>macranthum</i>
Nombre científico:	<i>Cyrtochilum macranthum</i>



2.2.3.2. *Epidendrum jameisoni* Rchb.F.

El nombre del género deriva del griego *epi*, encima de y *dendron*, árbol, o sea son especies que se encuentran en árboles. El tallo es tipo caña; las flores presentan inflorescencia racemosa de color morado, el labelo está unido al vientre de la columna y el róstelo está formado por una lamina transversal que produce un viscidio semilíquido transparente o blanquecino que al extraerse deja una rajadura en el róstelo, siendo esto diagnóstico del género. Son polinizadas generalmente por mariposa tanto diurna como nocturna (Sociedad Colombiana de Orquideología, 1993).

En la zona se la conoce como Maygua por los habitantes, siendo utilizado para remedios caseros.

La clasificación botánica según Font Quer (1976), es de la siguiente manera:

Reino:	Vegetal
División:	Angiosperma
Orden:	Gynandrales
Familia:	Orchidaceae
Genero:	<i>Epidendrum</i>
Especie:	<i>jameisonic</i>
Nombre científico:	<i>Epidendrum jameisonic</i> Rchb.F



2.3. Hipótesis

Las semillas de orquídeas germinan en un medio de cultivo in vitro

2.4. Variables de las hipótesis

Variable independiente: medio de cultivo.

Variable dependiente: germinación de semillas de cápsula verde y cápsula madura.

2.5. Operacionalización de variables

La operacionalización de variables para los factores en estudio se muestra en el cuadro 1.

CUADRO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Concepto	Categoría	Indicadores
Especies de orquídeas	Conjunto de los genes de un individuo	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Días a la germinación
		<i>Epidendrum jameisonic</i>	Altura de plántula Días al trasplante
Madurez de las cápsulas	Característica fisiológica del estado de desarrollo de la semilla	Cápsulas verdes	Número de semillas germinadas
		Cápsulas maduras	Número de hojas
Medios de cultivo	Conjunto de elementos nutritivos que permiten el crecimiento vegetativo	M1	Viabilidad de la semilla
		M2	
		M3	
		M4	
		M5	
		M6	

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Modalidad de la investigación

El enfoque predominante fue cuantitativo. La modalidad fue netamente experimental de laboratorio. En este trabajo se realizó una asociación de variables donde se probaron dos especies de orquídeas, dos estados de madurez de las cápsulas y seis medios de cultivo.

3.2. Ubicación del ensayo

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Ingeniería Agronómica, de la Universidad Técnica de Ambato, localizada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, a 16 km, al Sur Oeste de la ciudad de Ambato, en las coordenadas geográficas 01° 22' 20" de latitud Sur y 78° 36' 22" de longitud Oeste, a la altitud de 2 688 m.s.n.m. (Sistema de Posicionamiento Global, GPS).

3.3. Caracterización del lugar

3.3.1. Clima

De manera general, el clima del sector es templado frío, donde se registra una temperatura media anual de 12,85°C, humedad relativa media anual de 74%, precipitación de 482,3 mm, evaporación 118,64 mm, heliofanía 1 742,6 horas luz, nubosidad 7 octavos y velocidad de viento 3,23 m/seg con frecuencia Este (Estación Meteorológica Querochada, 2009).

3.3.2. Ecología

Según el sistema de clasificación de Holdridge (1987), la zona corresponde a la formación ecológica estepa espinosa Montano Bajo (ee-MB) en transición con bosque seco Montano Bajo (bs-MB) con clima templado.

3.4. Factores en estudio

3.4.1. Especies de orquídeas

<i>Cyrtochilum macranthum</i>	E1
<i>Epidendrum jameisoni</i> Rchb.F.	E2

3.4.2. Madurez de las cápsulas

Cápsulas verdes	C1
Cápsulas maduras	C2

3.4.3. Medios de cultivo

El 1, 1/2, 1/4 es la concentración del medio

M1	Murashigue & Skoog 1+ carbón activado 8 g/l	
	Murashigue & Skoog 1/2+ carbón activado 8 g/l	M2
	Murashigue & Skoog 1/4+ carbón activado 8 g/l	M3
	Murashigue & Skoog 1+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l	M4
	Murashigue & Skoog 1/2+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l	M5
	Murashigue & Skoog 1/4+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l	M6

3.5. Diseño experimental

Se utilizó el diseño de bloques completamente al azar (DBCA), mediante distribución grupal, agrupando el factor especies de orquídeas y dentro de ellos, los factores madurez de las cápsulas, medios de cultivos y la interacción, con tres repeticiones.

3.6. Tratamientos

Los tratamientos fueron 24, como consta en el cuadro 2.

CUADRO 2. TRATAMIENTOS

No.	Símbolo	Especies de orquídeas	Madurez de las cápsulas	Medios de cultivo
1	E1C1M1	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas verdes	M1
2	E1C1M2	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas verdes	M2
3	E1C1M3	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas verdes	M3
4	E1C1M4	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas verdes	M4
5	E1C1M5	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas verdes	M5
6	E1C1M6	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas verdes	M6
7	E1C2M1	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas maduras	M1
8	E1C2M2	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas maduras	M2
9	E1C2M3	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas maduras	M3
10	E1C2M4	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas maduras	M4
11	E1C2M5	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas maduras	M5
12	E1C2M6	<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	Cápsulas maduras	M6
13	E2C1M1	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas verdes	M1
14	E2C1M2	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas verdes	M2
15	E2C1M3	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas verdes	M3
16	E2C1M4	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas verdes	M4
17	E2C1M5	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas verdes	M5
18	E2C1M6	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas verdes	M6
19	E2C2M1	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas maduras	M1
20	E2C2M2	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas maduras	M2
21	E2C2M3	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas maduras	M3
22	E2C2M4	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas maduras	M4
23	E2C2M5	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas maduras	M5
24	E2C2M6	<i>Epidendrum jameisonic</i>	Cápsulas maduras	M6

3.6.1. Análisis

Se efectuó el análisis de variancia (ADEVA), mediante análisis grupal, agrupando el factor especies de orquídeas; pruebas de significación de Tukey al 5%, para diferenciar entre tratamientos, factor madurez de las cápsulas e interacciones y pruebas de Diferencia mínima Significativa al 5% para los factores especies y madurez de las cápsulas.

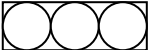
Se efectuó así mismo el análisis de costos de cada uno de los tratamientos.

3.7. Características del ensayo

La unidad experimental se conformó de tres frascos de vidrio de 12 cm de alto y 5 cm de diámetro.

Número de tratamientos totales:	24
Numero de tratamientos para cada especie:	12
Número total de unidades experimental:	240
Numero total de unidades experimentales/especie:	120
Volumen por unidad experimental:	50 ml
Volumen total de medio de cultivo:	12 l
Distancias entre repeticiones:	0,10 m
Distancias entre tratamientos:	0,10 m

3.7.1. Esquema de la disposición del ensayo en el laboratorio

E2C1M4	E2C1M3	E1C1M6	Cada unidad experimental constó de tres frascos de vidrio
E2C2M5	E2C2M6	E2C2M6	
E2C2M2	E1C1M5	E1C1M3	
E2C1M5	E1C1M3	E2C1M5	
E1C1M1	E2C1M4	E1C2M1	
E1C2M6	E1C1M2	E2C1M1	
E1C1M4	E2C2M3	E1C2M2	
E1C1M2	E1C1M6	E1C1M2	
E2C2M1	E2C2M5	E2C2M2	
E1C2M4	E1C2M2	E1C2M5	
E2C2M6	E1C2M6	E2C1M2	
E2C1M1	E1C1M1	E2C1M6	
E2C1M6	E2C1M1	E1C1M1	
E1C1M3	E1C2M1	E1C2M4	
E1C2M5	E1C2M5	E2C2M1	
E1C2M2	E1C1M4	E1C1M4	
E2C2M4	E2C1M2	E2C2M3	
E2C1M3	E2C1M6	E2C2M4	
E2C2M3	E2C2M4	E2C1M3	
E1C2M3	E1C2M4	E1C2M6	
E1C2M1	E2C1M5	E2C2M5	
E2C1M2	E2C2M1	E1C1M5	
E1C1M5	E1C2M3	E2C1M4	

3.8. Datos tomados

3.8.1. Viabilidad de la semilla

Para observar la viabilidad, se colocaron las semillas en una solución de tetrazolio al 2% por 24 horas, luego se recolectó una muestra para observar al microscopio. Para tal efecto, se aplicó dos gotas de muestra en un porta objeto, cubriendo con un cubre objeto (en el portaobjetos se trazó una cuadrícula), para luego proceder a contabilizar las semillas pigmentadas y no pigmentadas. Los resultados se expresaron en porcentaje. Se procedió con las cápsulas abiertas y las cápsulas cerradas efectuando tres repeticiones. En el caso de las cápsulas cerradas se aplicó el método luego de haber hecho la transferencia.

3.8.2. Días a la germinación

Se contabilizaron los días transcurridos desde la siembra hasta cuando se observó el inicio de germinación de las cápsulas (presencia de protocormo), en el total de semillas ubicadas en un centímetro cuadrado de muestra.

3.8.3. Porcentaje de germinación

Se contaron las semillas germinando en los frascos, con la ayuda de un estereoscopio en 4 cm^2 . Las lecturas se efectuaron a los 90, 120 y 150 días de la siembra, expresando los valores en porcentaje.

3.8.4. Altura de planta

Se registró la altura de planta, con ayuda de escalímetro y lupa, a diez plantas tomadas al azar de cada frasco, registrando las lecturas a los 90, 120 y 150 días de la siembra.

3.8.5. Número de hojas

Se contó el número de hojas por plántula, con la ayuda de una lupa, a diez plantas tomadas al azar de cada frasco, efectuando lecturas a los 90, 120 y 150 días de la siembra.

3.8.6. Días al trasplante

Se contabilizaron los días transcurridos desde la siembra hasta cuando las plántulas presentaron al menos una hoja.

3.9. Manejo de la investigación

3.9.1. Recolección y almacenamiento de las semillas

Las cápsulas fueron recolectadas en el bosque primario de propiedad del señor Manuel Aimara, sector Las Orquídeas de la parroquia El Triunfo del cantón Patate. En un día seco. Las capsulas verdes se recogieron antes de que se abran y las cápsulas maduras después de que se abrieron. Las cápsulas fueron almacenadas por algunas semanas envueltas en papel de cocina y en un lugar con refrigeración y aireación.

3.9.2. Preparación del medio

Se preparó el medio de Murashige y Skoog, con pH de 5,5, con las siguientes sales minerales (Murashige and Skoog, 1962).

	(g/l)
(NH ₄)NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,440
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,370
KH ₂ PO ₄	0,170
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0278
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	0,0372
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0169
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0086
H ₃ BO ₃	0,0062
KI	0,00083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,00025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,000025

Además se añadió a la solución:

Mioinositol	0,100
Piridoxina HCl	0,0005
Glicina	0,002

- A la solución se añadió 20 g de azúcar, 2 g/l de carbón activado, 150 g/l de pulpa de plátano, 0,4 mg/l de tiamina, 0,5 mg/l de ácido nicotínico.

- En un Erlenmeyer con barra magnética, se añadió una pequeña cantidad de agua destilada para mezclar y disolver, aforando con agua destilada a un litro, agitando continuamente.

- Se midió el pH y se ajustó a 5,5 usando HCl o NaOH y mezclando completamente con la ayuda de la barra magnética.

- Se añadió la mitad del líquido en un frasco, y se colocaron los siguientes ingredientes:

M1: Murashigue & Skook 1+ carbón activado

M2: Murashigue & Skook 1/2+ carbón activado

M3: Murashigue & Skook 1/4+ carbón activado

M4: Murashigue & Skook 1+ carbón activado + pulpa de plátano

M5: Murashigue & Skook 1/2+carbón activado+pulpa de plátano

M6: Murashigue & Skook 1/4+carbón activado+pulpa de plátano.

- Se añadió 8 g/l de agar y se mezcló para que se disperse.

- Se cerró la tapa del Erlenmeyer con papel aluminio y una liga, para luego colocar en el microondas por 1 minuto y 30 segundos. Finalmente se sacó y se dejó enfriar.

3.9.3. Traspaso del medio (verter en los frascos)

- Cuando bajó la temperatura del agar, se colocó en los frascos, con movimientos de izquierda a derecha para facilitar el llenado, en cantidad de 50 ml.

- Se dejó que se asiente el medio y se tapó con papel aluminio, asegurando con una liga.

- Los frascos con el medio se colocaron en la autoclave por 30 minutos para esterilizarlos, para posteriormente almacenarlos en una repisa aséptica.

- De igual forma se procedió con el resto de materiales como cajas petri, pinzas, porta bisturís, etc.

3.9.4. Esterilización de la cámara

Fue de gran importancia que el medio, los frascos, los aparatos y las semillas se mantengan desinfectados desde el inicio del proceso de germinación, para evitar contaminación de bacteria y hongos.

Las condiciones de esterilización en la preparación del medio duró 30 minutos. Esta temperatura y presión fueron suficientes para mantener asepsia.

3.9.5. Uso de la cámara de flujo laminar

Con atomizador y algodón, se desinfectó completamente la cámara usando etanol (70%), incluyendo las paredes y el techo, antes y después de utilizar la cámara, manteniendo siempre los instrumentos en asepsia.

3.9.6. Siembra de las semillas

3.9.6.1. Siembra a partir de cápsulas verdes

El método general para sembrar semillas a partir de cápsulas verdes es el siguiente:

- Con la ayuda de un bisturí, se removieron las cápsulas de las flores, utilizando un cepillo de dientes suave con solución de detergente (Deja) 10 g/l.
- Se enjuagaron las cápsulas en agua y se introdujeron por 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% a la que se añadió una gota de jabón líquido Protex.
- Se transfirieron las cápsulas sumergida en solución de cloro a la cámara de flujo laminar.
- Se extrajeron las cápsulas de la solución usando pinzas y tomándolas del pecíolo. Se sumergieron en alcohol al 90% flameando rápidamente. Se dejó que las cápsulas y las pinzas se enfríen, repitiendo este proceso en cada cápsula.

- Se colocaron las cápsulas en una caja petri esterilizada. Se cortó transversalmente con la ayuda de un bisturí desinfectado, utilizando una hoja de bisturí nueva para cada cápsula, para prevenir la propagación de virus.

- Se introdujeron los frascos desinfectados con alcohol. Se prendió el mechero, se destaparon los frascos y se diseminaron las semillas sobre el medio.

- Se añadió una gota de agua en cada frasco para que las semillas se distribuyan sobre el agar, rápidamente para evitar contaminaciones.

3.9.6.2. Siembra a partir de capsulas dehiscentes (abiertas con semillas secas)

- Se elaboró un paquete con papel, en donde se introdujo una pequeña cantidad de semillas, en pequeña cantidad para favorecer la penetración del cloro.

- Los paquetes se sellaron usando grapas; se sumergieron en agua destilada por 10 minutos y se apretó suavemente para dispersar burbujas de aire.

- Utilizando pinzas, se transfirieron los paquetes una la solución de cloro 1% con una gota de detergente, manteniendo por 10 minutos y agitando continuamente.

- Los paquetes se llevaron a la cámara de flujo laminar (rociando las semillas con alcohol), para colocarlos con pinzas en un frasco con agua destilada, para enjuagar las semillas. Esta operación se repitió tres veces.

- Se exprimió suavemente los paquetes para eliminar excesos de agua y se colocó en una superficie esterilizada. Se abrieron los paquetes usando tijeras desinfectadas.

- Se introdujeron los frascos rociándolos con alcohol. Se encendió el mechero de alcohol. Se abrió la tapa del frasco y se colocó una cantidad de semillas con la ayuda de unas pinzas, añadiendo una gota de agua para que se dispersen. Se tapó los frascos rápidamente para evitar que se contamine.

3.9.7. Cuidado de las plántulas

3.9.7.1. Las semillas en los frascos

- Los frascos desinfectados con alcohol, se llevaron al cuarto de crecimiento, los que constaban de tubos fluorescentes de 20 watts.
- La temperatura se reguló mediante evaporación, colocando una olla de agua en una cocineta eléctrica; al mismo tiempo se controló la humedad relativa. La temperatura fue de 18°C y 90% de humedad relativa.
- El tiempo de luminosidad fue de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.
- Los frascos fueron colocados en bandejas con agua para evitar que la temperatura reseque, especialmente al medio de cultivo.
- Se colocaba agua en la olla pasando un día.
- Al salir y entrar al cuarto de crecimiento se desinfectó con alcohol.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados, análisis estadístico y discusión

4.1.1. Viabilidad de la semilla

El cuadro 3, muestra la viabilidad de la semilla, efectuado en semillas con cápsulas verdes y semillas con cápsulas maduras, en el laboratorio, utilizando el método de Tetrazolio al 2%, registrando los resultados mediante la pigmentación de las semillas. De la evaluación de las semillas con cápsulas verdes, se estableció un alto porcentaje de semillas viables, siendo del 100% en dos repeticiones y del 98,20% en una repetición; mientras que al observarse las semillas con cápsulas maduras, los porcentajes de viabilidad fueron más bajos con 75,00% en dos repeticiones y 69,10% en una repetición; lo que permite inferir que las semilla con cápsulas verdes de las especies de orquídeas, son mucho más viables, al compara con las semillas de cápsulas maduras; sin embargo, en general, las semillas presentan una aceptable viabilidad, lo que asegura el desarrollo posterior de la investigación.

CUADRO 3. VIABILIDAD DE LA SEMILLA

Semillas con cápsulas verdes			
Repeticiones	Total de semillas	Semillas buenas (viables)	Porcentaje de semillas viables
1	65	65	100
2	56	55	98,20
3	58	58	100
Semillas con cápsulas maduras			
Repeticiones	Total de semillas	Semillas buenas (viables)	Porcentaje de semillas viables
1	48	36	75,00
2	60	45	75,00
3	55	38	69,10

4.1.2. Días a la germinación

Los datos registrados de la presente variable se aprecian en el anexo 1, cuyo promedio general fue de 96,83 días a la germinación. Realizando el análisis de variancia que se observa en el cuadro 4, se aprecia que existieron diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, así como para el factor

especies de orquídeas. Los tratamientos de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1) fueron significativos a nivel del 1% y dentro de éstos, los factores madurez de la cápsula (C), medios de cultivo (M) y la interacción C x M, a este mismo nivel. La misma respuesta se obtuvo dentro de los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2). El coeficiente de variación fue de 6,18%.

CUADRO 4. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F
Repeticiones	2	163,583	81,792	2,28 ns
Tratamientos	23	95 354,000	4 145,826	115,69 **
Especies (E)	1	2520,500	2520,500	70,34 **
Tratamientos E1	11	50542,750	4594,795	128,22 **
Madurez cápsula (C)	1	4334,028	4334,028	120,94 **
Medios de cultivo (M)	5	25045,250	5009,050	139,78 **
C x M	5	21163,472	4232,694	118,12 **
Tratamientos E2	11	42290,750	3844,614	107,29 **
Madurez cápsula (C)	1	1834,694	1834,694	51,20 **
Medios de cultivo (M)	5	12442,250	2488,450	69,44 **
C x M	5	28013,806	5602,761	156,35 **
Error exp.	46	1 648,417	35,835	
Total	71	97 166,000		

Coef. de var. 6,18%

ns = no significativo

** = significativo al 1%

Sometiendo los promedios de tratamientos a la prueba de significación de Tukey al 5%, en la evaluación de los días a la germinación, se obtuvieron cuatro rangos de significación (cuadro 5). El tratamiento más precoz a la germinación fue E2C2M3, con promedio de 67,67 días, ubicado en el primer rango; seguido de varios tratamientos que compartieron el primer rango con promedios que van desde 82,33 días hasta 84,00 días. El tratamiento más tardío a la germinación fue E1C2M4, con promedio de 130,33 días, que compartió el segundo y tercer rango, entre otros, por cuanto los tratamientos E1C1M4 y E2C2M4, no germinaron, los que se ubicaron en el último rango.

La prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para especies, en los días a la germinación, estableció dos rangos de significación bien definidos (cuadro 6). Los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), fueron más precoces a la germinación, produciendo a los 90,92 días de promedio, ubicado en el

primer rango; mientras que, los tratamientos de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), fueron más tardíos, con promedio de 102,75 días, ubicado en el segundo rango.

CUADRO 5. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Tratamientos		Promedio	Rango
No.	Símbolo		
21	E2C2M3	67,67	a
11	E1C2M5	82,33	a
12	E1C2M6	82,67	a
13	E2C1M1	82,67	a
6	E1C1M6	83,00	a
14	E2C1M2	83,00	a
15	E2C1M3	83,33	a
17	E2C1M5	83,33	a
5	E1C1M5	84,00	a
23	E2C2M5	84,00	a
24	E2C2M6	110,33	b
20	E2C2M2	112,00	b
7	E1C2M1	127,33	b
3	E1C1M3	127,67	bc
1	E1C1M1	128,00	bc
2	E1C1M2	128,00	bc
16	E2C1M4	128,00	bc
18	E2C1M6	128,00	bc
19	E2C2M1	128,67	bc
8	E1C2M2	129,67	bc
9	E1C2M3	130,00	bc
10	E1C2M4	130,33	bc
4	E1C1M4	0,00	d
22	E2C2M4	0,00	d

CUADRO 6. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Especies de orquídeas		Promedio	Rango
<i>Epidendrum jameisonic</i>	(E2)	90,92	a
<i>Cyrtochilum macranthum</i>	(E1)	102,75	b

Aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), en los días a la germinación, registró dos rangos de significación bien definidos (cuadro 7).

Los tratamientos de cápsulas verdes (C1), fueron más precoces a la germinación, con promedio de 91,78 días, ubicado en el primer rango; en tanto que, los tratamientos de capsulas maduras (C2), fueron más tardíos, con promedio de 113,72 días, al ubicarse en el segundo rango.

CUADRO 7. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Madurez de las cápsulas (E1)	Promedio	Rangos
Cápsulas verdes (C1)	91,78	a
Cápsulas maduras (C2)	113,72	b

La prueba de significación de Tukey al 5% para el factor medios de cultivo, dentro de la especie *Cyrtocilum macranthum* (E1), en los días a la germinación, reportó tres rangos de significación bien definidos (cuadro 8). La germinación se produjo más precozmente en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 65,17 días; mientras que, la germinación fue más tardía en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook $\frac{1}{2}$ + carbón activado 8 g/l (M2) y Murashigue & Skook $\frac{1}{4}$ + carbón activado 8 g/l (M3), con promedio compartido de 128,83 días,

CUADRO 8. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Medios de cultivo (E1)	Promedio	Rango
M4	65,17	a
M5	83,17	b
M6	82,83	b
M1	127,67	c
M2	128,83	c
M3	128,83	c

Según la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción madurez de las cápsulas por medios de cultivo dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), en la evaluación de los días a la germinación, se detectaron tres rangos de significación (cuadro 9). La interacción más precoz a la germinación fue C2M5, con promedio de 82,33 días, ubicado en el primer rango; seguido de varias interacciones que compartieron el primer rango, con promedios que van desde 82,67 días hasta 84,00 días. La interacción más tardía a la germinación fue C2M4, con promedio de 130,33 días, que compartió el segundo rango, entre otros, debido a que la interacción C1M4, no germinó, el que se ubicó en el tercer rango.

CUADRO 9. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Interacción C x M (E1)	Promedio	Rango
C2M5	82,33	a
C2M6	82,67	a
C1M6	83,00	a
C1M5	84,00	a
C2M1	127,33	b
C1M3	127,67	b
C1M1	128,00	b
C1M2	128,00	b
C2M2	129,67	b
C2M3	130,00	b
C2M4	130,33	b
C1M4	0,00	c

La prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en la evaluación de los días a la germinación, estableció dos rangos de significación bien definidos (cuadro 10). Los tratamientos de capsulas maduras (C2), fueron más precoces a la germinación, con promedio de 83,78 días, ubicado en el primer rango; en tanto que, los tratamientos de cápsulas verdes (C1), fueron más tardíos, con promedio de 98,06 días, al ubicarse en el segundo rango.

CUADRO 10. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Madurez de las cápsulas (E2)	Promedio	Rangos
Cápsulas verdes (C1)	98,06	a
Cápsulas maduras (C2)	83,78	b

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor medios de cultivo, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en los días a la germinación, se obtuvieron cuatro rangos de significación bien definidos (cuadro 11). La germinación se produjo más precozmente en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 64,00 días; ubicado en el primer rango; mientras que, la germinación fue más tardía en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook ¼ + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M6), con promedio de 119,17 días, ubicado en el cuarto rango y último lugar en la prueba.

CUADRO 11. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Medios de cultivo (E2)	Promedio	Rango
M4	64,00	a
M3	75,50	b
M5	83,67	b
M2	97,50	c
M1	105,67	c
M6	119,17	d

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción madurez de las cápsulas por medios de cultivo dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en los días a la germinación, se detectaron cuatro rangos de significación (cuadro 12). La interacción más precoz a la germinación fue C2M3, con promedio de 67,67 días, ubicado en el primer rango; seguido de varias

interacciones que compartieron el primer rango, con promedios que van desde 82,67 días hasta 84,00 días. La interacción más tardía a la germinación fue C2M1, con promedio de 128,67 días, que compartió el tercer rango, entre otros, por cuanto la interacción C2M4, no germinó, el que se ubicó en el cuarto rango.

CUADRO 12. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS A LA GERMINACIÓN

Interacción C x M (E2)	Promedio	Rango
C2M3	67,67	a
C1M1	82,67	a
C1M2	83,00	a
C1M3	83,33	a
C1M5	83,33	a
C2M5	84,00	a
C2M6	110,33	ab
C2M2	112,00	ab
C1M4	128,00	c
C1M6	128,00	c
C2M1	128,67	c
C2M4	0,00	d

Los resultados presentados en la evaluación de los días a la germinación de las semillas, permiten deducir que, existieron diferencias en este tiempo, entre las especies, estados de madurez de las cápsulas y medios de cultivo. Los mejores resultados se obtuvieron con la especie *Epidendrum jameisonic*, que fueron más precoces a la germinación y dentro de estos, se consiguió acelerar la germinación con la utilización de cápsulas maduras y con la utilización del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l, por lo que es el tratamiento que mejora significativamente las condiciones para la germinación de las semillas, acelerando su germinación. Por otro lado, dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum*, con la utilización de cápsulas verdes y el medio de cultivo Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l, se obtuvieron los mejores resultados, en donde se acortaron mayormente los días a la germinación. Hurtado y Merino (1988), señalan que el éxito que se obtenga en un cultivo in vitro depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de material vegetativo viable, incubación, calidad de reactivos, asepsia, etc.

Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, es posible establecer la germinación de las semillas de orquídeas, como lo sucedido con la utilización del medio de cultivo M4.

4.1.3. Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, para cada tratamiento se muestran en los anexos 2, 3 y 4, con promedios de 28,85% a los 90 días, 34,29% a los 120 días y 63,81% a los 150 días. Efectuándose el análisis de variancia para las tres lecturas (cuadro 13), se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, así como para la comparación entre especies de orquídeas. Los tratamientos de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1) fueron significativos a nivel del 1% y dentro de éstos, los factores madurez de la cápsula (C), medios de cultivo (M) y la interacción C x M, a este mismo nivel. La misma respuesta se obtuvo dentro de los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2). Los coeficientes de variación fueron de 5,06%, 3,42% y 3,61%.

CUADRO 13. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Fuente de Variación	Grados de libertad	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
		Cuadrados medios	Valor de F	Cuadrados medios	Valor de F	Cuadrados medios	Valor de F
Repeticiones	2	3,724	1,75 ns	1,985	1,44 ns	8,763	1,65 ns
Tratamientos	23	5 073,707	2379,4 **	5129,977	3726,8 **	4088,131	769,83 **
Especies (E)	1	7391,659	3466,37 **	13535,883	9833,48 **	1008,903	189,99 **
Tratam. E1	11	3817,985	1790,80 **	4109,749	2984,57 **	5281,858	994,70 **
Mad. Cap. (C)	1	5579,343	2616,95 **	4850,891	3522,80 **	13810,950	2600,93 **
Med. Cult. (M)	5	5045,695	2366,65 **	6114,887	4440,73 **	6790,927	1278,89 **
C x M	5	2238,003	1049,72 **	1956,383	1420,76 **	2066,970	389,26 **
Tratam. E2	11	6118,706	2869,94 **	5386,030	3911,42 **	3174,334	597,80 **
Mad. Cap. (C)	1	23328,999	10942,31 **	11441,154	8308,75 **	27975,908	5268,53 **
Med. Cult. (M)	5	5953,314	2792,36 **	5282,086	3835,94 **	804,005	151,41 **
C x M	5	2842,040	1333,04 **	4278,950	3107,44 **	584,347	110,05 **
Error exp.	46	2,132		1,377		5,310	
Total	71						
Coef. de var. =		5.06%		3.42 %		3.61%	

ns = no significativo
** = significativo al 1%

Según la prueba de significación de Tukey al 5%, para tratamientos, en la evaluación del porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, se observaron cinco rangos de significación a los 90 días, seis rangos a los 120 días y diez rangos a los 150 días (cuadro 14). Mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento E2C1M1, con promedio de 98,53% a los 90 días, 99,38% a los 120 días y 100% a los 150 días, ubicados en el primer rango; seguidos de varios tratamientos que compartieron el primer rango; mientras que, a los 90 y 120 días, varios tratamientos no reportaron germinación, no así a los 150 días en donde el tratamiento E1C2M4, reportó el menor porcentaje de germinación con promedio de 3,19%, al ubicarse en el tercer rango, a pesar que los tratamientos E1C1M4 y E2C2M4, no germinaron, los que compartieron el último rango.

CUADRO 14. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Tratamientos		Promedios y rangos					
No.	Símbolo	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
13	E2C1M1	98,53	a	99,38	a	100,00	a
15	E2C1M3	96,73	a	98,96	a	99,51	a
14	E2C1M2	95,33	ab	98,57	a	99,40	ab
17	E2C1M5	96,03	a	98,08	a	99,18	ab
5	E1C1M5	95,86	a	96,67	a	98,54	ab
6	E1C1M6	91,14	b	96,47	a	97,97	ab
3	E1C1M3	0,00	e	0,00	f	95,31	abc
1	E1C1M1	0,00	e	0,00	f	94,10	abc
2	E1C1M2	0,00	e	0,00	f	92,02	bcd
16	E2C1M4	0,00	e	0,00	f	90,22	cde
11	E1C2M5	17,93	d	21,85	e	90,06	cde
12	E1C2M6	19,67	d	31,99	d	86,09	de
18	E2C1M6	0,00	e	0,00	f	84,28	e
21	E2C2M3	41,53	c	49,21	bc	53,79	f
23	E2C2M5	39,61	c	46,91	c	52,99	f
24	E2C2M6	0,00	e	51,62	b	51,62	f
19	E2C2M1	0,00	e	0,00	f	40,81	g
20	E2C2M2	0,00	e	33,34	d	38,87	g
9	E1C2M3	0,00	e	0,00	f	28,11	h
8	E1C2M2	0,00	e	0,00	f	18,43	i
7	E1C2M1	0,00	e	0,00	f	17,01	i
10	E1C2M4	0,00	e	0,00	f	3,19	j
4	E1C1M4	0,00	e	0,00	f	0,00	j
22	E2C2M4	0,00	e	0,00	f	0,00	j

Mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para especies de orquídeas, en el porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, se

observaron dos rangos de significación bien definidos (cuadro 15). Los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), reportaron mayor porcentaje de germinación, con promedios de 38,98%, 48,00% y 67,56%, respectivamente, ubicados en el primer rango; mientras que, los tratamientos de la especie *Cyrtorchilum macranthum* (E1), registraron menor porcentaje de germinación, con promedios de 18,72%, 20,58% y 60,07%, para cada lectura, en su orden, ubicados en el segundo rango.

CUADRO 15. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Especies de orquídeas		Promedios y rangos					
		A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
<i>Epidendrum jameisonic</i>	(E2)	38,98	a	48,00	a	67,56	a
<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	(E1)	18,72	b	20,58	b	60,07	b

La prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para el factor madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Cyrtorchilum macranthum* (E1), en el porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, registró dos rangos de significación bien definidos (cuadro 16). Los tratamientos que se utilizó cápsulas verdes (C1), reportaron mayor porcentaje de germinación, con promedios de 31,17%, 32,19% y 79,66%, ubicados en el primer rango;

CUADRO 16. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Madurez de las cápsulas (E1)		Promedios y rangos					
		A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
Cápsulas verdes	(C1)	31,17	a	32,19	a	79,66	a
Cápsulas maduras	(C2)	6,27	b	8,97	b	40,48	b

Mediante la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor medios de cultivo, dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E), en el porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, existieron dos rangos de significación a los 90 días, tres rangos a los 120 días y cuatro rangos a los 150 días (cuadro 17). El mayor porcentaje de germinación a los 90 y 150 días se obtuvo en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skook $\frac{1}{2}$ + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M5), con promedios de 56,89% y 94,30%, respectivamente, ubicados en el primer rango; a los 120 días, el mayor porcentaje de germinación se alcanzó en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook $\frac{1}{4}$ + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M6), con promedio de 64,23%; mientras que, a los 90 y 120 días, varios tratamientos aún no germinaron y a los 150 días, la germinación fue menor en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 1,60%, ubicado en el cuarto rango.

CUADRO 17. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Medios de cultivo (E1)	Promedios y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
M5	56,89	a	59,26	b	94,30	a
M6	55,41	a	64,23	a	92,03	a
M3	0,00	b	0,00	c	61,71	b
M1	0,00	b	0,00	c	55,56	c
M2	0,00	b	0,00	c	55,22	c
M4	0,00	b	0,00	c	1,60	d

La prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción madurez de las cápsulas por medios de cultivo dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1) en el porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, separó los promedios en cuatro rangos de significación a los 90 y 120 días y seis rangos a los 150 días (cuadro 18). Mayor porcentaje de semillas germinadas se observó en la interacción C1M5, con promedios de 95,86%, 96,67% y 98,54%, para cada lectura, respectivamente, ubicados en el primer rango, seguidos de varias interacciones que compartieron el primer rango. En relación al menor porcentaje de germinación, a los 90 y 120 días varias interacciones aún no germinaron, en tanto que a los 150 días, el

menor porcentaje se observó en la interacción C2M4, con promedio de 3,19%, que compartió el último rango con la interacción C1M4 que no germinó.

CUADRO 18. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Interacción C x M (E1)	Promedios y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
C1M5	95,86	a	96,67	a	98,54	a
C1M6	91,14	b	96,47	a	97,97	a
C1M3	0,00	d	0,00	d	95,31	ab
C1M1	0,00	d	0,00	d	94,10	ab
C1M2	0,00	d	0,00	d	92,02	abc
C2M5	17,93	c	21,85	c	90,06	bc
C2M6	19,67	c	31,99	b	86,09	c
C2M3	0,00	d	0,00	d	28,11	d
C2M2	0,00	d	0,00	d	18,43	e
C2M1	0,00	d	0,00	d	17,01	e
C2M4	0,00	d	0,00	d	3,19	f
C1M4	0,00	d	0,00	d	0,00	f

Mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para el factor madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en el porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, registró dos rangos de significación bien definidos (cuadro 19). Los tratamientos en los que se utilizó cápsulas verdes (C1), reportaron mayor porcentaje de germinación, con promedios de 64,44%, 65,83% y 95,43%, ubicados en el primer rango; mientras que, los tratamientos que se usaron cápsulas maduras (C2), experimentaron menor porcentaje de germinación, con promedios de 13,52%, 30,18% y 39,68%, ubicados todos ellos en el segundo rango.

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en el porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, existieron tres rangos de significación a los 90 días y 150 días y cinco rangos a los 120 días (cuadro 20). El mayor porcentaje de germinación en las tres lecturas se obtuvo en los tratamientos del medio de cultivo

CUADRO 19. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Madurez de las cápsulas (E2)	Promedios y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
Cápsulas verdes (C1)	64,44	a	65,83	a	95,43	a
Cápsulas maduras (C2)	13,52	b	30,18	b	39,68	b

conformado por Murashigue & Skook $\frac{1}{4}$ + carbón activado 8 g/l (M3), con promedios de 69,13%, 74,08% y 76,65%, respectivamente, ubicados en el primer rango; en tanto que, a los 90 y 120 días, varios tratamientos aún no germinaron y a los 150 días, la germinación fue menor en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 45,11%, ubicado en el tercer rango.

CUADRO 20. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Medios de cultivo (E2)	Promedios y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
M3	69,13	a	74,08	a	76,65	a
M5	67,82	a	72,50	a	76,08	a
M1	49,27	b	49,69	c	70,41	b
M2	47,67	b	65,95	b	69,14	b
M6	0,00	c	25,81	d	67,95	b
M4	0,00	c	0,00	e	45,11	c

La prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción madurez de las cápsulas por medios de cultivo dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en el porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, separó los promedios en tres rangos de significación a los 90 días y cinco rangos a los 120 y 150 días (cuadro 21). El mayor porcentaje de semillas germinadas se registró en la interacción C1M1, con promedios de 98,53%, 99,38% y 100%, para cada lectura, respectivamente, ubicados en el primer rango; seguidos de varias interacciones que

compartieron el primer rango. En relación al menor porcentaje de germinación, a los 90 y 120 días varias interacciones aún no germinaron, en tanto que a los 150 días, el menor porcentaje se observó en la interacción C2M2, con promedio de 38,87%, al ubicarse en el penúltimo rango, por cuanto la interacción C1M4 que no germinó, se ubicó en el último rango.

CUADRO 21. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Interacción C x M (E2)	Promedios y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
C1M1	98,53	a	99,38	a	100,00	a
C1M3	96,73	a	98,96	a	99,51	a
C1M2	95,33	a	98,57	a	99,40	a
C1M5	96,03	a	98,08	a	99,18	a
C1M4	0,00	c	0,00	e	90,22	b
C1M6	0,00	c	0,00	e	84,28	b
C2M3	41,53	b	49,21	bc	53,79	c
C2M5	39,61	b	46,91	c	52,99	c
C2M6	0,00	c	51,62	b	51,62	c
C2M1	0,00	c	0,00	e	40,81	d
C2M2	0,00	c	33,34	d	38,87	d
C2M4	0,00	c	0,00	e	0,00	e

Evaluando los resultados del porcentaje de germinación a los 90, 120 y 150 días, es posible informar que, existieron diferencias en estos porcentajes, tanto entre las especies, como estados de madurez de las cápsulas y medios de cultivo. Los mayores porcentajes de semillas germinadas en las tres lecturas, se obtuvieron con la especie *Epidendrum jameisonic* (E2) y dentro de estos, se consiguieron mayores porcentajes de germinación con la utilización de cápsulas verdes y con la utilización del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook $\frac{1}{4}$ + carbón activado 8 g/l, seguido del medio de cultivo Murashigue & Skook $\frac{1}{2}$ + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l, por lo que son los tratamientos que favorecieron mayormente la germinación de las semillas, mejorando sus porcentajes de germinación. Según Lamolina (2010), las semillas de orquídea son muy pequeñas y contienen poco o nada de reserva alimenticia, por lo que la germinación y el subsiguiente desarrollo de la plántula, dependen de un medio nutritivo adecuado que permita la germinación

4.1.4. Altura de planta

Mediante los anexos 5, 6 y 7, se presentan los valores del crecimiento en altura de planta a los 90, 120 y 150 días, para cada tratamiento, con promedios generales de 0,12 cm a los 90 días, 0,33 cm a los 120 días y 0,65 cm a los 150 días. Efectuándose el análisis de variancia para las tres lecturas (cuadro 22), se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, así como para la comparación entre especies de orquídeas. Los tratamientos de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1) fueron significativos a nivel del 1% y dentro de éstos, el factor medios de cultivo (M), a este mismo nivel. Los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2) fueron significativos a nivel de 1%, y dentro de éstos, los factores madurez de las cápsulas (C), medios de cultivo (M) y la interacción CxM. Los coeficientes de variación fueron de 37,03%, 31,07% y 18,96%, para cada lectura, en su orden.

CUADRO 22. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Fuente de Variación	Grados de libertad	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
		Cuadrados medios	Valor de F	Cuadrados medios	Valor de F	Cuadrados medios	Valor de F
Repeticiones	2	0,000	0,22 ns	0,023	2,28 ns	0,016	1,03 ns
Tratamientos	23	0,119	63,69 **	0,866	84,22 **	1,899	125,58 **
Especies (E)	1	0,376	201,27 **	3,873	376,66 **	9,461	625,71 **
Tratam. E1	11	0,015	7,50 **	0,069	6,90 **	0,081	5,40 **
Mad. cap. (C)	1	0,001	0,50 ns	0,028	2,80 ns	0,023	1,53 ns
Med. cult. (M)	5	0,031	15,50 **	0,134	13,40 **	0,142	9,47 **
C x M	5	0,001	0,50 ns	0,012	1,20 ns	0,031	2,07 ns
Tratam. E2	11	0,200	100,00 **	1,390	139,00 **	3,029	201,93 **
Mad. cap. (C)	1	0,588	294,00 **	3,422	342,20 **	9,818	654,53 **
Med. cult. (M)	5	0,216	108,00 **	1,176	117,60 **	2,537	169,13 **
C x M	5	0,105	52,50 **	1,196	119,60 **	2,164	144,27 **
Error exp.	46	0,002		0,010		0,015	
Total	71						
Coef. de var. =		37,03%		31,07%		18,96%	
ns = no significativo							
** = significativo al 1%							

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5%, para tratamientos, en la evaluación del crecimiento en altura de planta a los 90, 120 y 150 días, se establecieron seis rangos de significación a los 90 días y ocho rangos a los 120 y 150 días (cuadro 23). A los 90 días, las plántulas con mayor crecimiento se

obtuvo en el tratamiento E2C1M3, con promedio de 0,80 cm; y, a los 120 y 150 días, el mayor crecimiento en altura reportaron las plántulas del tratamiento E2C1M1, con promedios de 2,10 cm y 3,03 cm, respectivamente, todos ellos ubicados en el primer rango; mientras que, a los 90 y 120 días, varios tratamientos no reportaron germinación, no así a los 150 días en donde las plántulas del tratamiento E1C2M4, fueron las del menor crecimiento con promedio de 0,13 cm, al compartir los últimos rangos, a pesar que los tratamientos E1C1M4 y E2C2M4, no germinaron, los que compartieron el último rango.

CUADRO 23. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Tratamientos		Promedios (cm) y rangos					
No.	Símbolo	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
13	E2C1M1	0,53	b	2,10	a	3,03	a
15	E2C1M3	0,80	a	1,63	b	2,57	b
14	E2C1M2	0,37	c	0,93	c	2,10	c
21	E2C2M3	0,23	cd	0,50	de	0,97	d
17	E2C1M5	0,17	de	0,47	de	0,93	d
23	E2C2M5	0,13	def	0,57	d	0,87	de
5	E1C1M5	0,20	d	0,40	def	0,53	ef
11	E1C2M5	0,13	def	0,27	defgh	0,53	ef
24	E2C2M6	0,00	f	0,23	efgh	0,53	ef
6	E1C1M6	0,10	def	0,33	defg	0,50	efg
20	E2C2M2	0,00	f	0,20	efgh	0,37	fgh
1	E1C1M1	0,00	f	0,00	h	0,30	fgh
16	E2C1M4	0,00	f	0,00	h	0,30	fgh
2	E1C1M2	0,00	f	0,00	h	0,27	fgh
3	E1C1M3	0,00	f	0,00	h	0,27	fgh
7	E1C2M1	0,00	f	0,00	h	0,27	fgh
8	E1C2M2	0,00	f	0,00	h	0,27	fgh
18	E2C1M6	0,03	ef	0,07	gh	0,27	fgh
12	E1C2M6	0,10	def	0,13	fgh	0,20	fgh
19	E2C2M1	0,00	f	0,00	h	0,20	fgh
9	E1C2M3	0,00	f	0,00	h	0,17	fgh
10	E1C2M4	0,00	f	0,00	h	0,13	gh
4	E1C1M4	0,00	f	0,00	h	0,00	h
22	E2C2M4	0,00	f	0,00	h	0,00	h

La prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para especies de orquídeas, en la altura de planta a los 90, 120 y 150 días, separó los promedios en dos rangos de significación bien definidos (cuadro 24). Los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), reportaron plántulas con mayor altura, con promedios de 0,19 cm, 0,56 cm y 1,01 cm, respectivamente, ubicados en el primer

rango; en tanto que, los tratamientos de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), registraron plántulas con menor altura, con promedios de 0,04 cm, 0,09 cm y 0,29 cm, para cada lectura, en su orden, ubicados en el segundo rango.

CUADRO 24. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Especies de orquídeas		Promedios (cm) y rangos					
		A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
<i>Epidendrum jameisonic</i>	(E2)	0,19	a	0,56	a	1,01	a
<i>Cyrtochilum macranthum</i>	(E1)	0,04	b	0,09	b	0,29	b

Según la prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo, dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), en la altura de planta a los 90, 120 y 150 días, se detectaron dos rangos de significación a los 90 y 120 días y tres rangos a los 150 días (cuadro 25). La mayor altura de planta en las tres lecturas se observó en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skook $\frac{1}{2}$ + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M5), con promedios de 0,17 cm, 0,33 cm y 0,53 cm, respectivamente, ubicados en el primer rango; en tanto que, a los 90 y 120 días, varios tratamientos aún no germinaron y a los 150 días, la menor altura de planta se registró en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 0,07 cm, ubicado en el tercer rango y último lugar en la prueba.

Según la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para el factor madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en la altura d planta a los 90, 120 y 150 días, registró dos rangos de significación bien definidos (cuadro 26). Los tratamientos en los que se utilizaron cápsulas verdes (C1), reportaron plántulas con mayor altura, con promedios de 0,32 cm, 0,87 cm y 1,53 cm, ubicados en el primer rango; en tanto que, los tratamientos en los que se usaron cápsulas maduras (C2), experimentaron menor crecimiento en altura de plántula.

CUADRO 25. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Medios de cultivo (E1)	Promedios (cm) y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
M5	0,17	a	0,33	a	0,53	a
M6	0,10	a	0,23	a	0,35	ab
M1	0,00	b	0,00	b	0,28	b
M2	0,00	b	0,00	b	0,27	bc
M3	0,00	b	0,00	b	0,22	bc
M4	0,00	b	0,00	b	0,07	c

CUADRO 26. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Madurez de las cápsulas (E2)	Promedios (cm) y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
Cápsulas verdes (C1)	0,32	a	0,87	a	1,53	a
Cápsulas maduras (C2)	0,06	b	0,25	b	0,49	b

La prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en la altura de planta a los 90, 120 y 150 días, registró cuatro rangos de significación a los 90 días, tres rangos a los 120 días y cinco rangos a los 150 días (cuadro 27). Las plantas experimentaron mayor crecimiento, en las tres lecturas, en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skoock $\frac{1}{4}$ + carbón activado 8 g/l (M3), con promedios de 0,52 cm, 1,07 cm y 1,77 cm, respectivamente, ubicados en el primer rango; en tanto que, a los 90 y 120 días, varios tratamientos aún no registraron germinación y a los 150 días, la menor altura de planta reportaron los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skoock 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 0,15 cm, ubicado en el último rango y lugar en la prueba.

CUADRO 27. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Medios de cultivo (E2)	Promedios (cm) y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
M3	0,52	a	1,07	a	1,77	a
M1	0,27	b	1,05	a	1,62	a
M2	0,18	c	0,57	b	1,23	b
M5	0,15	c	0,52	b	0,90	c
M6	0,02	d	0,15	c	0,40	d
M4	0,00	d	0,00	c	0,15	e

Mediante la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción madurez de las cápsulas por medios de cultivo dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en la altura de planta a los 90, 120 y 150 días, se registraron seis rangos de significación a los 90 días y siete rangos a los 120 y 150 días (cuadro 28). A los 90 días, la mayor altura de planta reportaron los tratamientos de la interacción C1M3, con promedio de 0,80 cm y a los 120 y 150 días, la mayor altura de planta reportó la interacción C1M1, con promedios de 2,10 cm y 3,03 cm, para cada lectura, respectivamente, todos ellos ubicados en el primer rango. En relación al menor crecimiento en altura de planta, a los 90 y 120 días varias interacciones aún no germinaron, en tanto que a los 150 días, el menor valor registró la interacción C2M1, con promedio de 0,20 cm al compartir los dos últimos rangos, por cuanto la interacción C2M4 que no germinó, se ubicó en el último rango.

Analizando los resultados del crecimiento en altura de planta a los 90, 120 y 150 días, es posible apreciar que, existieron diferencias en estos porcentajes, tanto entre las especies de orquídeas, como entre estados de madurez de las cápsulas y medios de cultivo. Los mejores resultados en las tres lecturas, se alcanzaron con la especie *Epidendrum jameisonic*, al reportar plántulas de mayor altura y dentro de estos, se consiguió incrementar el crecimiento de las plántulas con la utilización de cápsulas verdes y con la utilización del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skoog $\frac{1}{4}$ + carbón activado 8 g/l, por lo que es el tratamiento que permitió el mejor crecimiento y desarrollo de las plántulas, lo que mejorará las condiciones para

el trasplante. Según el Grupo CRO (Cultivadores Rosarinos de Orquídeas) (2007), la germinación asimbiótica es usada para la propagación de orquídeas, las mismas que

CUADRO 28. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Interacción C x M (E2)	Promedios (cm) y rangos					
	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
C1M1	0,53	b	2,10	a	3,03	a
C1M3	0,80	a	1,63	b	2,57	b
C1M2	0,37	c	0,93	c	2,10	c
C2M3	0,23	d	0,50	de	0,97	d
C1M5	0,17	d	0,47	def	0,93	d
C2M5	0,13	de	0,57	d	0,87	de
C2M6	0,00	f	0,23	efg	0,53	ef
C2M2	0,00	f	0,20	fg	0,37	f
C1M4	0,00	f	0,00	g	0,30	fg
C1M6	0,03	ef	0,07	g	0,27	fg
C2M1	0,00	f	0,00	g	0,20	fg
C2M4	0,00	f	0,00	g	0,00	g

tienden a crecer fácilmente. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada para asegurar el posterior crecimiento y desarrollo de las plántulas, como lo observado con la utilización de los medios M3 y M5.

4.1.5. Número de hojas

Los anexos 8, 9 y 10, detallan los valores del número de hojas por plántula, a los 90, 120 y 150 días, para cada tratamiento, cuyos promedios fueron de 0,42 hojas a los 90 días, 0,69 hojas a los 120 días y 1,74 hojas a los 150 días. Aplicando el análisis de variancia para las tres lecturas (cuadro 29), se observó que en la lectura a los 90 días, no existieron mayores diferencias entre tratamientos y el resto de fuentes de variación. A los 120 y 150 días, se establecieron diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, así como para la comparación entre especies de orquídeas. Los tratamientos de la especie *Cyrtorchilum macranthum* (E1) fueron significativos a nivel del 1% y dentro de éstos, el factor medios de

cultivo (M), a este mismo nivel. Los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2) fueron significativos a nivel de 1%, y dentro de éstos, los factores madurez de las cápsulas (C), medios de cultivo (M) y la interacción CxM. Los coeficientes de variación fueron de 0,00%, 45,32% y 25,67%, para cada lectura, en su orden.

CUADRO 29. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 90, 120 Y 150 DÍAS

Fuente de Variación	Grados de libertad	A los 90 días		A los 120 días		A los 150 días	
		Cuadrados medios	Valor de F	Cuadrados medios	Valor de F	Cuadrados medios	Valor de F
Repeticiones	2	0,000	0,00 ns	0,056	0,56 ns	0,431	2,47 ns
Tratamientos	23	0,761	0,00 ns	1,766	17,83 **	4,173	21,01 **
Especies (E)	1	0,500	0,00 ns	8,000	80,78 **	19,014	95,71 **
Tratam. E1	11	0,727	0,00 ns	0,876	8,95 **	1,232	6,19 **
Mad. cap. (C)	1	0,000	0,00 ns	0,028	0,28 ns	0,444	2,23 ns
Med. cult. (M)	5	1,600	0,00 ns	1,894	19,13 **	1,711	8,60 **
C x M	5	0,000	0,00 ns	0,028	0,28 ns	0,911	3,38 ns
Tratam. E2	11	0,818	0,00 ns	2,088	21,09 **	5,765	28,97 **
Mad. cap. (C)	1	1,000	0,00 ns	0,694	7,01 *	8,028	40,34 **
Med. cult. (M)	5	1,200	0,00 ns	3,161	31,93 **	8,0850	40,63 **
C x M	5	0,400	0,00 ns	1,294	13,07 **	2,228	11,20 **
Error exp.	46	0,000		0,099	, ns	0,199	
Total	71				, ns		
Coef. de var. =		0,00%		45,32%		25,67%	

ns = no significativo

* = significativo al 5%

** = significativo al 1%

La prueba de significación de Tukey al 5%, para tratamientos, en la evaluación del número de hojas por plántula a los 120 y 150 días, se establecieron tres rangos de significación a los 120 días y seis rangos a los 150 días (cuadro 30). Las plántulas con mayor número de hojas se alcanzaron en el tratamiento E2C1M3, con promedios de 2,33 hojas a los 120 días y 5,00 hojas a los 150 días, ubicados en el primer rango. Con respecto al menor número de hojas, a los 90 y 120 días, varios tratamientos no reportaron germinación, no así a los 150 días en donde las plántulas de varios tratamientos reportaron una hoja por plántula, por lo que compartieron los dos últimos rangos, a pesar que los tratamientos E1C1M4 y E2C2M4, no germinaron, los que compartieron el último rango.

Aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para especies de orquídeas, en el número de hojas a los 120 y 150 días, se establecieron dos rangos de significación bien definidos (cuadro 31). Mayor número de hojas reportaron las plántulas de los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic*

CUADRO 30. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS

Tratamientos		Promedios y rangos			
No.	Símbolo	A los 120 días		A los 150 días	
15	E2C1M3	2,33	a	5,00	a
14	E2C1M2	1,67	ab	3,66	ab
13	E2C1M1	1,67	ab	3,00	bc
23	E2C2M5	1,67	ab	3,00	bc
17	E2C1M5	1,33	ab	2,66	bcd
21	E2C2M3	1,67	ab	2,66	bcd
5	E1C1M5	1,00	bc	2,33	bcde
6	E1C1M6	1,00	bc	2,33	bcde
20	E2C2M2	1,00	bc	2,33	bcde
11	E1C2M5	1,33	ab	1,66	cde
24	E2C2M6	1,00	bc	1,66	cde
3	E1C1M3	0,00	c	1,33	def
1	E1C1M1	0,00	c	1,00	ef
2	E1C1M2	0,00	c	1,00	ef
7	E1C2M1	0,00	c	1,00	ef
8	E1C2M2	0,00	c	1,00	ef
9	E1C2M3	0,00	c	1,00	ef
10	E1C2M4	0,00	c	1,00	ef
12	E1C2M6	1,00	bc	1,00	ef
16	E2C1M4	0,00	c	1,00	ef
18	E2C1M6	0,00	c	1,00	ef
19	E2C2M1	0,00	c	1,00	ef
4	E1C1M4	0,00	c	0,00	f
22	E2C2M4	0,00	c	0,00	f

(E2), con promedios de 1,03 hojas y 2,25 hojas, respectivamente, ubicados en el primer rango; en tanto que, los tratamientos de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), registraron plántulas con menor número de hojas,

CUADRO 31. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS

Especies de orquídeas		Promedios y rangos			
		A los 120 días		A los 150 días	
<i>Epidendrum jameisonic</i>	(E2)	1,03	a	2,25	a
<i>Cyrtochilum macranthum</i>	(E1)	0,36	b	1,22	b

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo, dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), en el número de hojas a los 120 y 150 días, se apreciaron dos rangos de significación a los 120 días y tres rangos a los 150 días (cuadro 32). El mayor número de hojas en las dos lecturas se observó en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skoock ½ + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M5), con promedios de 1,17 y 2,00 hojas, respectivamente, ubicados en el primer rango; mientras que, a los 90 días, varios tratamientos aún no germinaron y a los 150 días, el menor número de hojas se registró en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skoock 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 0,50 hojas, ubicado en el tercer rango y último lugar en la prueba.

CUADRO 32. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS

Medios de cultivo (E1)	Promedios y rangos			
	A los 120 días		A los 150 días	
M5	1,17	a	2,00	a
M6	1,00	a	1,67	ab
M3	0,00	b	1,17	bc
M1	0,00	b	1,00	bc
M2	0,00	b	1,00	bc
M4	0,00	b	0,50	c

Aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para el factor madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en la evaluación del número de hojas a los 120 y 150 días, se establecieron dos rangos de significación bien definidos (cuadro 33). Los tratamientos en los que se utilizaron cápsulas verdes (C1), reportaron plántulas que desarrollaron mayor número de hojas, con promedios de 1,17 hojas y 2,72 hojas, ubicados en el primer rango; en tanto que, los tratamientos en los que se usaron cápsulas maduras (C2), presentaron plántulas con menor número de hojas, con promedios de 0,89 hojas y 1,78 hojas, ubicados en el segundo rango.

CUADRO 33. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS

Madurez de las cápsulas (E2)	Promedios y rangos			
	A los 120 días		A los 150 días	
Cápsulas verdes (C1)	1,17	a	2,72	A
Cápsulas maduras (C2)	0,89	b	1,78	b

Mediante la prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en la evaluación del número de hojas a los 120 y 150 días, se establecieron cinco rangos de significación a los 120 días y cuatro rangos a los 150 días (cuadro 34). El mayor número de hojas por planta se observó en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skoog $\frac{1}{4}$ + carbón activado 8 g/l (M3), con promedios de 2,00 hojas y 3,83 hojas, respectivamente, ubicados en el primer rango; en tanto que, a los 90 existió un tratamiento que aún no registró germinación y a los 150 días, el menor número de hojas reportaron los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skoog 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 0,50 hojas, ubicado en el último rango y lugar en la prueba.

CUADRO 34. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS

Medios de cultivo (E2)	Promedios y rangos			
	A los 120 días		A los 150 días	
M3	2,00	a	3,83	a
M2	1,33	bc	3,00	b
M5	1,560	ab	2,83	b
M1	0,83	cd	2,00	c
M6	0,50	de	1,33	c
M4	0,00	e	0,50	d

Según la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción madurez de las cápsulas por medios de cultivo dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en el número de hojas a los 120 y 150 días, se establecieron tres rangos de significación a los 120 días y seis rangos a los 150 días (cuadro 35). El mayor número de hojas se obtuvo en los tratamientos de la interacción C1M3, con promedios de 2,33 hojas a los 120 días y 5,00 hojas a los 150 días, ubicados en el primer rango. En relación al menor número de hojas, a los 90 y 120 días varias interacciones aún no germinaron, en tanto que a los 150 días, el menor número se observó en las interacciones C1M4, C1M6 y C2M1, con promedio compartido de 1,00 hojas, se ubicaron en los dos últimos rangos, por cuanto la interacción C2M4 que no germinó, se ubicó en el último rango.

CUADRO 35. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 Y 150 DÍAS

Interacción C x M (E2)	Promedios y rangos			
	A los 120 días		A los 150 días	
C1M3	2,33	a	5,00	a
C1M2	1,67	ab	3,66	b
C1M1	1,67	ab	3,00	bc
C2M5	1,67	ab	3,00	bc
C1M5	1,33	b	2,66	bcd
C2M3	1,67	ab	2,66	bcd
C2M2	1,00	b	2,33	cd
C2M6	1,000	b	1,66	de
C1M4	0,00	c	1,00	ef
C1M6	0,00	c	1,00	ef
C2M1	0,00	c	1,00	ef
C2M4	0,00	c	0,00	f

Examinando la evaluación estadística del número de hojas por plántula a los 90, 120 y 150 días de la siembra, es posible inferir que, existieron diferencias en estos porcentajes, tanto entre las especies de orquídeas, como entre estados de madurez de las cápsulas y medios de cultivo. Los mejores resultados se obtuvieron con la especie *Epidendrum jameisonic*, al reportar plántulas con mayor número de hojas y dentro de estos, se consiguió incrementar el crecimiento de las plántulas con la utilización de cápsulas verdes y con la utilización del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skoog ¼ + carbón activado 8 g/l, por lo que es

el tratamiento que permitió el mejor crecimiento y desarrollo de las plántulas, con mayor número de hojas, lo que mejorará consecuentemente las condiciones para el trasplante. Para Invitrorquideas (2010), mediante el cultivo in vitro de orquídeas y la aplicación de técnicas de biotecnología, se proporciona al mercado material sano y vigoroso a partir de plantas seleccionadas por sus características de excepción. Las técnicas deben ser adaptables a las condiciones y requerimientos del mercado, conformándose en una alternativa a los métodos de propagación tradicional.

4.1.6. Días al trasplante

Los días al trasplante para cada tratamiento, se indican en el anexo 11, cuyo promedio general fue de 106,04 días. Mediante el análisis de variancia que se presenta en el cuadro 36, se detectó diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, así como para el factor especies de orquídeas. Los tratamientos de la especie *Cyrtorchilum macranthum* (E1) fueron significativos a nivel del 1% y dentro de éstos, los factores madurez de la cápsula (C), medios de cultivo (M) y la interacción C x M, a este mismo nivel. Las mismas respuestas se obtuvieron dentro de los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2). El coeficiente de variación fue de 1,60%.

CUADRO 36. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F
Repeticiones	2	0,583	0,292	0,11 ns
Tratamientos	23	120372,208	5233,574	1822,67 **
Especies (E)	1	3267,014	3267,014	1137,79 **
Tratamientos E1	11	65341,556	5940,141	2069,01 **
Madurez cápsula (C)	1	5184,000	5184,000	1805,64 **
Medios de cultivo (M)	5	34942,889	6988,578	2434,20 **
C x M	5	25214,667	5042,933	1756,51 **
Tratamientos E2	11	51763,639	4705,785	1639,08 **
Madurez cápsula (C)	1	1921,361	1921,361	669,23 **
Medios de cultivo (M)	5	13298,472	2659,694	926,40 **
C x M	5	36543,806	7308,761	2545,72 **
Error exp.	46	132,083	2,871	
Total	71	120504,875		

Coef. de var. 1,60%

ns = no significativo

** = significativo al 1%

Mediante la prueba de significación de Tukey al 5% para tratamientos, en la evaluación de los días al trasplante, se detectaron cuatro rangos de significación (cuadro 37). El tratamiento más precoz al trasplante fue E2C1M2, con promedio de 87,00 días, ubicado en el primer rango; seguido de varios tratamientos que compartieron el primer con promedios que van desde 87,33 días hasta 88,33 días. El tratamiento más tardío al trasplante fue E2C1M6, con promedio de 145,00 días, que compartió el tercer rango, entre otros, debido a que los tratamientos E1C1M4 y E2C2M4, no germinaron, los que se ubicaron en el último rango.

CUADRO 37. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Tratamientos		Promedio	Rango
No.	Símbolo		
14	E2C1M2	87,00	a
6	E1C1M6	87,33	a
11	E1C2M5	87,33	a
12	E1C2M6	87,33	a
13	E2C1M1	87,33	a
17	E2C1M5	87,67	a
23	E2C2M5	87,67	a
21	E2C2M3	88,00	a
5	E1C1M5	88,33	a
15	E2C1M3	88,33	a
24	E2C2M6	116,00	b
20	E2C2M2	118,33	b
3	E1C1M3	141,67	c
19	E2C2M1	142,00	c
10	E1C2M4	142,33	c
1	E1C1M1	143,00	c
9	E1C2M3	143,33	c
8	E1C2M2	143,67	c
2	E1C1M2	144,33	c
16	E2C1M4	144,33	c
7	E1C2M1	144,67	c
18	E2C1M6	145,00	c
4	E1C1M4	0,00	d
22	E2C2M4	0,00	d

Mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para especies, en los días al trasplante, se registraron dos rangos de significación bien definidos (cuadro 38). Los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), fueron más precoces al trasplante, produciendo a los 99,31 días de promedio, ubicado

en el primer rango; mientras que, los tratamientos de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), fueron más tardíos, con promedio de 112,78 días, ubicado en el segundo rango.

CUADRO 38. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA ESPECIES DE ORQUÍDEAS, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Especies de orquídeas		Promedio	Rango
<i>Epidendrum jameisonic</i>	(E2)	99,31	a
<i>Cyrtochilum macranthum</i>	(E1)	112,78	b

Aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para el factor madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), en los días al trasplante, se registraron dos rangos de significación bien definidos (cuadro 39). Los tratamientos de cápsulas verdes (C1), fueron más precoces al trasplante, con promedio de 100,78 días, ubicado en el primer rango; mientras que, los tratamientos de cápsulas maduras (C2), fueron más tardíos, con promedio de 124,78 días, al ubicarse en el segundo rango.

CUADRO 39. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Madurez de las cápsulas (E1)	Promedio	Rangos
Cápsulas verdes (C1)	100,78	a
Cápsulas maduras (C2)	124,78	b

La prueba de significación de Tukey al 5% para el factor medios de cultivo, dentro de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), en los días al trasplante,

reportó tres rangos de significación bien definidos (cuadro 40). El trasplante se produjo más precozmente en los tratamientos que se desarrollaron en el medio de cultivo conformado por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 71,17 días; mientras que, el trasplante fue más tardío en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook ½ + carbón activado 8 g/l (M2), con promedio de 144,00 días, ubicados en el tercer rango y último lugar en la prueba.

CUADRO 40. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Medios de cultivo (E1)	Promedio	Rango
M4	71,17	a
M6	87,33	b
M5	87,83	b
M3	142,50	c
M1	143,83	c
M2	144,00	c

Según la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción de la especie *Cyrtochilum macranthum* (E1), en la evaluación de los días al trasplante, se detectaron tres rangos de significación (cuadro 41). Las interacciones más precoces al trasplante fueron C1M6, C2M5 y C2M6,

CUADRO 41. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E1, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Interacción C x M (E1)	Promedio	Rango
C1M6	87,33	a
C2M5	87,33	a
C2M6	87,33	a
C1M5	88,33	a
C1M3	141,67	b
C2M4	142,33	b
C1M1	143,00	b
C2M3	143,33	b
C2M2	143,67	b
C1M2	144,33	b
C2M1	144,67	b
C1M4	0,00	c

La prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para madurez de las cápsulas, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en la evaluación de los días al trasplante, estableció dos rangos de significación bien definidos (cuadro 42). Los tratamientos de capsulas maduras (C2), fueron más precoces al trasplante, con promedio de 92,00 días, ubicado en el primer rango; en tanto que, los tratamientos de cápsulas verdes (C1), fueron más tardíos, con promedio de 106,61 días, ubicado en el segundo rango.

CUADRO 42. PRUEBA DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA MADUREZ DE LAS CÁPSULAS, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Madurez de las cápsulas (E2)	Promedio	Rangos
Cápsulas maduras (C2)	92,00	a
Cápsulas verdes (C1)	106,61	b

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor medios de cultivo, dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en los días al trasplante, se obtuvieron cinco rangos de significación bien definidos (cuadro 43). El trasplante se produjo más precozmente en los tratamientos del medio de cultivo conformado por Murashigue & Skook 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M4), con promedio de 72,17 días; ubicado en el primer rango; en tanto que, el trasplante fue más tardío en los tratamientos del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook ¼ + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l (M6), con promedio de 130,50 días, ubicado en el quinto rango y último lugar en la prueba.

Según la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción madurez de las cápsulas por medios de cultivo dentro de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), en los días al trasplante, se detectaron cuatro rangos de significación (cuadro 44). La interacción más precoz al trasplante fue C1M2, con promedio de 87,00 días, ubicado en el primer rango; seguido de varias interacciones que compartieron el primer rango, con promedios que van desde 87,33 días hasta 88,33 días. La interacción más tardía al trasplante fue C1M6, con promedio de 145,00 días,

que compartió el tercer rango, entre otros, por cuanto la interacción C2M4, no germinó, el que se ubicó en el cuarto rango.

CUADRO 43. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Medios de cultivo (E2)	Promedio	Rango
M4	72,17	a
M5	87,67	b
M3	88,17	b
M2	102,67	c
M1	114,67	d
M6	130,50	e

CUADRO 44. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN MADUREZ DE LAS SEMILLAS POR MEDIOS DE CULTIVO, ESPECIE E2, EN LA VARIABLE DÍAS AL TRASPLANTE

Interacción C x M (E2)	Promedio	Rango
C1M2	87,00	a
C1M1	87,33	a
C1M5	87,67	a
C2M5	87,67	a
C2M3	88,00	a
C1M3	88,33	a
C2M6	116,00	b
C2M2	118,33	b
C2M1	142,00	c
C1M4	144,33	c
C1M6	145,00	c
C2M4	0,00	d

Los resultados obtenidos en la evaluación de los días al trasplante, permiten establecer que, existieron diferencias en este lapso de tiempo, entre las especies, estados de madurez de las cápsulas y medios de cultivo. Los mejores resultados reportaron los tratamientos de la especie *Epidendrum jameisonic*, que fueron más precoces al trasplante y dentro de estos, se consiguió acelerar el tiempo al trasplante con la utilización de cápsulas maduras y con el medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skoog 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l, por lo que es el tratamiento que mejora significativamente las condiciones para el

crecimiento y desarrollo de las plántulas, acortándose el tiempo al trasplante. Por otro lado, dentro de la especie *Cyrtorchilum macranthum*, con la utilización de cápsulas verdes y el medio de cultivo Murashigue & Skoog 1 + carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l, se obtuvieron los mejores resultados, en donde se acortaron mayormente los días al trasplante. Según Cañas (1991), el cultivo *in vitro* permite el mejoramiento genético de las especies produciendo nuevas plantas más productivas o más vistosas como son las plantas ornamentales. Además, permite la domesticación de las orquídeas a un hábitat controlado y así realizar su producción y comercialización.

4.2. Resultados, análisis de costos y discusión

Para evaluar los costos de la propagación *in vitro* de dos especies de orquídeas, con semillas en dos estados de madurez y con seis medios de cultivo, se determinaron los costos de producción del ensayo (cuadro 45), considerando entre otros los siguientes valores: \$ 160,00 para mano de obra, \$ 128,00 para costos de materiales, dando el total de \$ 288,00.

CUADRO 45. COSTOS DE INVERSIÓN DEL ENSAYO

Labores	Mano de obra			Materiales					Costo total \$
	No.	Costo unit. \$	Sub total \$	Nombre	Unid.	Cant.	Costo unit. \$	Sub total \$	
Arriendo del labor,				Laboratorio	unid,	1	50	50	50
Recolección y almac. de semil.	0,5	10	5	Frascos	unid,	5	0,2		5
Preparación del medio	1	20	20	Medios de cultivo	unid,	1	32	32	52
Traspaso del medio	1	20	20	Materiales de laborat,	unid,	1	5	5	25
Esterilización de la cámara	0,5	20	10	Alcohol	l	4	6	24	34
Uso de la cámara de flujo laminar	0,5	20	10	Cámara flujo lamin.	unid,	1	10	10	20
Siembra de las semillas	1	20	20	Materiales de laborat,	unid,	1	5	5	25
Cuidado de las plántulas	15	5	75	Agua	m ³	10	0,2	2	77
Total			160,00					128,00	288,00

El cuadro 46 indica los costos de inversión del ensayo desglosados por tratamiento. La variación de los costos está dada básicamente por el diferente precio de cada medio de cultivo, dependiendo de las cantidades de los componentes. Los costos de producción se detallan en tres rubros que son: costos de mano de obra, costos de materiales y costos de los medios de cultivo en cada tratamiento.

CUADRO 46. COSTOS VARIABLES DEL ENSAYO POR TRATAMIENTO

Tratamiento	Mano de obra \$	Materiales \$	Medios de cultivo \$	Costo total \$
E1C1M1	6,67	4,00	1,57	12,24
E1C1M2	6,67	4,00	0,79	11,45
E1C1M3	6,67	4,00	0,39	11,06
E1C1M4	6,67	4,00	2,40	13,07
E1C1M5	6,67	4,00	1,62	12,29
E1C1M6	6,67	4,00	1,23	11,89
E1C2M1	6,67	4,00	1,57	12,24
E1C2M2	6,67	4,00	0,79	11,45
E1C2M3	6,67	4,00	0,39	11,06
E1C2M4	6,67	4,00	2,40	13,07
E1C2M5	6,67	4,00	1,62	12,29
E1C2M6	6,67	4,00	1,23	11,89
E2C1M1	6,67	4,00	1,57	12,24
E2C1M2	6,67	4,00	0,79	11,45
E2C1M3	6,67	4,00	0,39	11,06
E2C1M4	6,67	4,00	2,40	13,07
E2C1M5	6,67	4,00	1,62	12,29
E2C1M6	6,67	4,00	1,23	11,89
E2C2M1	6,67	4,00	1,57	12,24
E2C2M2	6,67	4,00	0,79	11,45
E2C2M3	6,67	4,00	0,39	11,06
E2C2M4	6,67	4,00	2,40	13,07
E2C2M5	6,67	4,00	1,62	12,29
E2C2M6	6,67	4,00	1,23	11,89
Total	160,00	96,00	32,00	288,00

4.3. Verificación de hipótesis

Los resultados obtenidos de la propagación in vitro de dos especies de orquídeas (*Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic*, con utilización de semillas en dos estados de madurez (cápsulas verdes y cápsulas maduras) y con seis medios de cultivo, permiten aceptar la hipótesis, por cuanto, las semillas germinaron en los medios de cultivo in vitro, especialmente si se usan semillas en estado de madurez de cápsulas verdes.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las semillas con cápsulas verdes, reportaron un alto porcentaje de semillas viables, siendo del 100% en dos repeticiones y del 98,20% en una repetición; mientras que al observarse las semillas con cápsulas maduras, los porcentajes de viabilidad fueron más bajos con 75,00% en dos repeticiones y 69,10% en una repetición.

Al comparar entre especies, la orquídea de la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), reportó los mejores resultados, con menor tiempo a la germinación (90,92 días), mayor porcentaje de germinación a los 90 días (38,98%), como a los 120 días (48,00%) y a los 150 días (67,56%), mayor crecimiento en altura de planta a los 90 días (0,19 cm), a los 120 días (0,56 cm) y a los 150 días (1,01 cm), mejor número de hojas a los 120 días (1,03 hojas) y a los 150 días (2,25 hojas) y menor tiempo al trasplante (99,31 días).

La especie *Cyrtorchilum macranthum* (E1), los tratamientos de cápsulas verdes (C1) reportaron mejores resultados, germinando en menor tiempo (91,78 días), alcanzando mayor porcentaje de germinación a los 90 días (31,17%), a los 120 días (32,19%) y a los 150 días (79,66%), por lo que redujeron el tiempo al trasplante (100,78 días). Con respecto a medios de cultivo, los tratamientos que se desarrollaron en el medio M4 (Murashigue & Skook 1+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l), fueron más precoces a la germinación (65,17 días) y al trasplante (71,17 días); los tratamientos del medio de cultivo M5 (Murashigue & Skook 1/2+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l) reportaron mayor porcentaje de germinación a los 90 días (56,89%) y a los 150 días (94,30%), como mayor altura de planta a los 90 días (0,17 cm), a los 120 días (0,33 cm) y a los 150 días (0,53 cm), con mejor número de hojas a los 120 días (1,17 hojas) y a los 150 días (2,00 hojas); mientras que, los tratamientos del medio de cultivo M6 (Murashigue & Skook 1/4+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l), registraron mayor porcentaje de germinación a los 120 días (64,23%) y el segundo mejor porcentaje de germinación a los 90 días (55,41%) y a los 150 días (92,03%), como la segunda mejor altura de planta a los 90

días (0,10 cm) y a los 120 días (0,23 cm) y el segundo mayor número de hojas a los 120 días (1,00).

La especie *Epidendrum jameisonic* (E2), los tratamientos de cápsulas verdes (C1), alcanzaron los mejores resultados, reduciendo los días a la germinación (98,06), mejorando el porcentaje de germinación a los 90 días (64,44%), a los 120 días (65,83%) y a los 50 días (95,43%), mayor altura de planta a los 90 días (0,32 cm), a los 120 días (0,87 cm) y a los 150 días (1,53 cm), con mayor número de hojas a los 120 días (1,17 hojas) y a los 150 días (2,72 hojas); mientras que, los tratamientos de cápsulas maduras (C2), reportaron el menor tiempo al trasplante (92,00 días). En relación a medios de cultivo, los tratamientos del medio M4 (Murashigue & Skook 1+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l), fueron más precoces a la germinación (64,00 días) y al trasplante (72,17 días). Los tratamientos que se desarrollaron en el medio M3 (Murashigue & Skook 1/4+ carbón activado 8 g/l), reportaron mayor porcentaje de germinación a los 90 días (69,13%), a los 120 días (74,08%) y a los 150 días (76,65%), con plántulas de mayor altura a los 90 días (0,52 cm), a los 120 días (1,07 cm) y a los 150 días (1,77 cm) y mejor número de hojas a los 120 días (2,00 hojas) y a los 150 días (3,83 hojas). También se obtuvieron buenos resultados en los tratamientos del medio M5 (Murashigue & Skook 1/2+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l) con el segundo mejor porcentaje de germinación a los 90 días (67,82%), a los 120 días (72,50%) y a los 150 días (76,08%) y en los tratamientos del medio M1 (Murashigue & Skook 1+ carbón activado 8 g/l), la segunda mejor altura de planta a los 120 días (1,05 cm) y a los 150 días (1,62 cm).

Del análisis de costos se concluye que, en general, el costo fue menor en los tratamientos cuyos medios de cultivo no incluyeron pulpa de plátano, especialmente aquellos que se conformaron del medio de cultivo M3 (Murashigue & Skook 1/4+ carbón activado 8 g/l), debido a la menor concentración de Murashigue & Skook, respectivamente.

5.2. **Recomendaciones**

Para obtener plántulas con mayor crecimiento en altura, mejor número de hojas y alcanzar mayores porcentajes de germinación, reduciendo los días a la

germinación y al trasplante, en el cultivo in vitro de orquídeas, utilizar la especie *Epidendrum jameisonic* (E2), por cuanto fue la que mejores resultados reportó, tanto en la fase de germinación como en el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Para obtener mayor porcentaje de semillas viables y reducción de los días a la germinación y al trasplante, con mayores porcentajes de germinación y producción de plántulas con mayor altura y número de hojas, es recomendable utilizar cápsulas verdes, por cuanto fue el estado de madurez de las semillas que mejores resultados reportó, en la mayoría de variables analizadas.

Utilizar el medio de cultivo M4 (Murashigue & Skook 1+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l), para obtener mayor precocidad de germinación y reducir los días al trasplante; mientras que, para alcanzar mayor porcentaje de germinación, mejor altura de plántulas, con mayor número de hojas en la especie E1, utilizar el medio de cultivo M5 (Murashigue & Skook 1/2+ carbón activado + pulpa de plátano 150 g/l) y en la especie E2 el medio de cultivo M3 (Murashigue & Skook 1/4+ carbón activado 8 g/l), por cuanto fueron los medios que favorecieron la germinación y el crecimiento y desarrollo de las plántulas, en la mayoría de variables analizadas.

Seguir probando el comportamiento agronómico de nuevas especies en la propagación in vitro de orquídeas, con el objeto de dotar de nuevas alternativas al productor de plántulas ornamentales, tendientes a solucionar problemas como precocidad a la germinación, vigorosidad de las plantas, resistencia a plagas y enfermedades, a heladas, sequías, etc.

Para obtener un microclima parecido a las condiciones de clima del lugar, se recomienda hervir agua en el cuarto de crecimiento, para aumentar la temperatura y humedad relativa hasta las condiciones deseadas.

Para evitar que la solución nutritiva se seque, se recomienda colocar sobre bandejas con agua, con lo cual la solución nutritiva de los frascos no pierde humedad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Caneva, S. 1984. Orquídeas; principales géneros y especies, su cultivo. Buenos Aires, Albatros. 270 p.

Cañas B, M. 1991. Cultivo asimbiótico in vitro en Orchidaceae. Consultado 13 Feb. 2010. Disponible en <http://acad.ucaldas.edu.co/jcg/fitotecnia/boletin/34/PROPAGACION%20IN%20VITRO%20DE%20ORQUIDEAS%20A%20PARTIR%20DE%20SEMILLA%20SEXUAL.pdf>.

CENTRAL ECUATORIANA DE SERVICIOS AGROPECUARIOS. 1992. El deterioro de los bosques naturales de la región andina del Ecuador. Quito. 133 p.

Baines, J.A.; Key, K. 1981. El ABC de las plantas de interior. 4 ed. Madrid, Blume. p. 132-136.

Dimitri, M.J. 1972. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería; orquídeas. 2 ed. Buenos Aires, Acme. p.284-301.

Ecuador. Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos. 1975. Caracterización de los suelos de la zona central del Ecuador. Quito. 3 p.

Ecuador. Instituto de Meteorología e Hidrología. 1999. Registro anual de observaciones meteorológicas del año 2009. Estación Agrometeorológica Querochaca. Cevallos, Ec. 5 p.

Flores, G.; Legaria, J.P.; Gil, I.; Colinas, M.T. 2008. Propagación in vitro de *Uncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo. Serie horticultura, Vol. 14, Núm. 3, septiembre-diciembre, 2008, pp. 347-353. México, Universidad Autónoma Chapingo.

Font Quer, P. 1976. La vida; Botánica. 4 ed. Barcelona, España, Labor. v.3, 978 p.

Franqueza, W. 2011. Orquídeas miniaturas en nuestros hogares. En línea. Consultado 25 de Ene. Del 2011. Disponible en www.orquideas-panama.tripod.com/id16.html.

García, M.A.; Hernandez, R.G. s.f. Estudio de algunos medios de cultivo para la inducción de brotes en callos de orquídea terrestre (*Blettia purpurea*). En línea. Consultado 15 de julio del 2010. Disponible en <http://www.buscagro.com/www.buscagro.com/biblioteca/Rene-Hernandez-Gonzalo/Sustrato-para-orquidea-terrestre.pdf>.

Grupo CRO (Cultivadores rosarinos de orquídeas). (2007). Consultado 21 Mar. 2010. Disponible en <http://www.orquideasrosario.com.ar/proyecto.htm>.

Holdridge, L. 1982. Ecología basada en zonas de vida. Trad. por Humberto Jiménez. San José de Costa Rica, CR., IICA. 216 p.

Hurtado, D.; Merino, M. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.

Invitrorquideas. 2010. Cultivo in vitro de orquídeas. En línea. Consultado 14 de julio del 2010. Disponible en <http://www.invitrorquideas.com.ar/home.html>.

La Molina. 2010. Germinación de semillas de orquídeas. En línea. Consultado 14 de julio del 2010. Disponible en www.lamolina.edu.pe/FACULTAD/agronomia/.../cuya.doc.

Mckendrick, S. 2000. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Consultado 08 Mar 2010. Disponible en [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf).

Miller, A.; Erston, J.V. 2010. Fisiología Vegetal. Consultado 23 Abr. 2010. Disponible en <http://www.aspaperu.org/boletines/bolfeb/tecnologia1.htm>.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol , Plant.* v. 15, p. 437-97.

Parra, R. (2007). Las hormonas vegetales. Consultado 10 de Abr. 2010. Disponible en http://www.wikilearning.com/curso_gratis/las_hormonas_vegetales-funcion_principal/2422-3.

Pierik R.L.M. 1989. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Consultado 28 Abr. 2010. Disponible en www.lamolina.edu.pe/facultad/agronomia/horticultura1/pro-pagacion/biotecnologia/cuya.doc.

Sánchez, O. 2009. Que son las orquídeas. Consultado 11 de Ene. 2010. Disponible en <http://www.ecosur.mx/ecofronteras/ecofrontera/ecofront22/quesonlasorquideas.pdf>.

Sociedad Colombiana de Orquideología. 1993. Orquídeas nativas de Colombia. 2 vol. Medellín, Compañía Ortográfica Nacional. 68 p.

Thompson, P. 1980. Orchids from seed. Londres. HMSO. 175 p.

Tiscornia, J.R.; Tiscornia, A.N. 1963. Cultivo de las flores y plantas de adorno; orquídeas. Buenos Aires, Hachette. p. 187-195.

VII. APÉNDICE

ANEXO 1. DÍAS A LA GERMINACIÓN

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	127,00	128,00	129,00	384,00	128,00
2	E1C1M2	128,00	126,00	130,00	384,00	128,00
3	E1C1M3	127,00	128,00	128,00	383,00	127,67
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	82,00	84,00	86,00	252,00	84,00
6	E1C1M6	84,00	83,00	82,00	249,00	83,00
7	E1C2M1	125,00	128,00	129,00	382,00	127,33
8	E1C2M2	130,00	130,00	129,00	389,00	129,67
9	E1C2M3	129,00	131,00	130,00	390,00	130,00
10	E1C2M4	131,00	130,00	130,00	391,00	130,33
11	E1C2M5	80,00	84,00	83,00	247,00	82,33
12	E1C2M6	81,00	84,00	83,00	248,00	82,67
13	E2C1M1	82,00	83,00	83,00	248,00	82,67
14	E2C1M2	81,00	84,00	84,00	249,00	83,00
15	E2C1M3	82,00	84,00	84,00	250,00	83,33
16	E2C1M4	127,00	126,00	131,00	384,00	128,00
17	E2C1M5	82,00	84,00	84,00	250,00	83,33
18	E2C1M6	125,00	129,00	130,00	384,00	128,00
19	E2C2M1	128,00	129,00	129,00	386,00	128,67
20	E2C2M2	115,00	111,00	110,00	336,00	112,00
21	E2C2M3	34,00	85,00	84,00	203,00	67,67
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	85,00	83,00	84,00	252,00	84,00
24	E2C2M6	108,00	112,00	111,00	331,00	110,33

ANEXO 2. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 90 DÍAS

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	E1C1M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	E1C1M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	96,43	95,04	96,10	287,57	95,86
6	E1C1M6	85,00	91,92	96,49	273,41	91,14
7	E1C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	E1C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	E1C2M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	E1C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	E1C2M5	20,77	15,37	17,65	53,79	17,93
12	E1C2M6	19,54	18,64	20,84	59,02	19,67
13	E2C1M1	98,46	97,14	100,00	295,60	98,53
14	E2C1M2	94,03	95,24	96,72	285,99	95,33
15	E2C1M3	95,07	96,30	98,83	290,20	96,73
16	E2C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	E2C1M5	97,21	96,46	94,41	288,08	96,03
18	E2C1M6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	E2C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	E2C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	E2C2M3	41,07	41,53	42,00	124,60	41,53
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	39,53	39,07	40,24	118,84	39,61
24	E2C2M6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ANEXO 3. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 120 DÍAS

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	E1C1M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	E1C1M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	97,10	96,43	96,48	290,01	96,67
6	E1C1M6	97,87	93,33	98,21	289,41	96,47
7	E1C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	E1C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	E1C2M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	E1C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	E1C2M5	21,43	21,05	23,08	5,56	21,85
12	E1C2M6	30,21	32,50	33,26	95,97	31,99
13	E2C1M1	100,00	98,15	100,00	298,15	99,38
14	E2C1M2	97,92	97,78	100,00	295,70	98,57
15	E2C1M3	96,92	99,96	100,00	296,88	98,96
16	E2C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	E2C1M5	98,46	97,53	98,25	294,24	98,08
18	E2C1M6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	E2C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	E2C2M2	35,09	29,51	35,42	100,02	33,34
21	E2C2M3	49,15	50,75	47,69	147,59	49,21
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	47,76	46,00	46,97	140,73	46,91
24	E2C2M6	50,77	53,33	50,75	154,85	51,62

ANEXO 4. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN A LOS 150 DÍAS

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	92,16	96,49	93,65	282,30	94,10
2	E1C1M2	93,88	88,24	93,94	276,06	92,02
3	E1C1M3	95,77	91,94	98,21	285,92	95,31
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	98,53	98,25	98,83	295,61	98,54
6	E1C1M6	98,10	97,33	98,48	293,91	97,97
7	E1C2M1	15,25	16,67	19,12	51,04	17,01
8	E1C2M2	17,02	19,74	18,52	55,28	18,43
9	E1C2M3	24,14	30,77	29,41	84,32	28,11
10	E1C2M4	4,44	1,56	3,57	9,57	3,19
11	E1C2M5	93,44	84,14	92,61	270,19	90,06
12	E1C2M6	91,16	80,34	86,78	258,28	86,09
13	E2C1M1	100,00	100,00	100,00	300,00	100,00
14	E2C1M2	100,00	98,21	100,00	298,21	99,40
15	E2C1M3	98,53	100,00	100,00	298,53	99,51
16	E2C1M4	89,13	91,53	90,00	270,66	90,22
17	E2C1M5	100,00	99,07	98,46	297,53	99,18
18	E2C1M6	86,44	83,33	83,08	252,85	84,28
19	E2C2M1	40,00	42,11	40,32	122,43	40,81
20	E2C2M2	37,50	36,51	42,59	116,60	38,87
21	E2C2M3	52,05	55,47	53,85	161,37	53,79
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	55,17	51,07	52,73	158,97	52,99
24	E2C2M6	50,77	53,33	50,75	154,85	51,62

ANEXO 5. ALTURA DE PLANTA A LOS 90 DÍAS (cm)

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	E1C1M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	E1C1M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	0,20	0,20	0,20	0,60	0,20
6	E1C1M6	0,10	0,10	0,10	0,30	0,10
7	E1C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	E1C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	E1C2M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	E1C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	E1C2M5	0,10	0,10	0,20	0,40	0,13
12	E1C2M6	0,10	0,10	0,10	0,30	0,10
13	E2C1M1	0,50	0,60	0,50	1,60	0,53
14	E2C1M2	0,40	0,30	0,40	1,10	0,37
15	E2C1M3	0,80	0,70	0,90	2,40	0,80
16	E2C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	E2C1M5	0,10	0,30	0,10	0,50	0,17
18	E2C1M6	0,10	0,00	0,00	0,10	0,03
19	E2C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	E2C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	E2C2M3	0,20	0,20	0,30	0,70	0,23
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	0,10	0,20	0,10	0,40	0,13
24	E2C2M6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ANEXO 6. ALTURA DE PLANTA A LOS 120 DÍAS (cm)

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	E1C1M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	E1C1M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	0,40	0,30	0,50	1,20	0,40
6	E1C1M6	0,30	0,30	0,40	1,00	0,33
7	E1C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	E1C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	E1C2M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	E1C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	E1C2M5	0,20	0,30	0,30	0,80	0,27
12	E1C2M6	0,10	0,10	0,20	0,40	0,13
13	E2C1M1	1,80	2,10	2,40	6,30	2,10
14	E2C1M2	0,90	1,10	0,80	2,80	0,93
15	E2C1M3	1,60	1,40	1,90	4,90	1,63
16	E2C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	E2C1M5	0,50	0,40	0,50	1,40	0,47
18	E2C1M6	0,20	0,00	0,00	0,20	0,07
19	E2C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	E2C2M2	0,30	0,10	0,20	0,60	0,20
21	E2C2M3	0,60	0,40	0,50	1,50	0,50
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	0,70	0,40	0,60	1,70	0,57
24	E2C2M6	0,20	0,20	0,30	0,70	0,23

ANEXO 7. ALTURA DE PLANTA A LOS 150 DÍAS (cm)

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	0,40	0,20	0,30	0,90	0,30
2	E1C1M2	0,20	0,30	0,30	0,80	0,27
3	E1C1M3	0,30	0,30	0,20	0,80	0,27
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	0,60	0,40	0,60	1,60	0,53
6	E1C1M6	0,60	0,40	0,50	1,50	0,50
7	E1C2M1	0,20	0,30	0,30	0,80	0,27
8	E1C2M2	0,20	0,30	0,30	0,80	0,27
9	E1C2M3	0,20	0,10	0,20	0,50	0,17
10	E1C2M4	0,10	0,10	0,20	0,40	0,13
11	E1C2M5	0,60	0,50	0,50	1,60	0,53
12	E1C2M6	0,20	0,10	0,30	0,60	0,20
13	E2C1M1	2,90	3,40	2,80	9,10	3,03
14	E2C1M2	2,10	1,90	2,30	6,30	2,10
15	E2C1M3	2,60	2,70	2,40	7,70	2,57
16	E2C1M4	0,40	0,20	0,30	0,90	0,30
17	E2C1M5	1,10	0,80	0,90	2,80	0,93
18	E2C1M6	0,50	0,10	0,20	0,80	0,27
19	E2C2M1	0,10	0,30	0,20	0,60	0,20
20	E2C2M2	0,40	0,40	0,30	1,10	0,37
21	E2C2M3	0,90	0,90	1,10	2,90	0,97
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	0,90	0,70	1,00	2,60	0,87
24	E2C2M6	0,60	0,50	0,50	1,60	0,53

ANEXO 8. NÚMERO DE HOJAS A LOS 90 DÍAS

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	E1C1M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	E1C1M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
6	E1C1M6	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
7	E1C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	E1C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	E1C2M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	E1C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	E1C2M5	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
12	E1C2M6	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
13	E2C1M1	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
14	E2C1M2	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
15	E2C1M3	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
16	E2C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	E2C1M5	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
18	E2C1M6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	E2C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	E2C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	E2C2M3	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
24	E2C2M6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ANEXO 9. NÚMERO DE HOJAS A LOS 120 DÍAS

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	E1C1M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	E1C1M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
6	E1C1M6	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
7	E1C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	E1C2M2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	E1C2M3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	E1C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	E1C2M5	1,00	2,00	1,00	4,00	1,33
12	E1C2M6	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
13	E2C1M1	2,00	1,00	2,00	5,00	1,67
14	E2C1M2	1,00	2,00	2,00	5,00	1,67
15	E2C1M3	2,00	2,00	3,00	7,00	2,33
16	E2C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	E2C1M5	2,00	1,00	1,00	4,00	1,33
18	E2C1M6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	E2C2M1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	E2C2M2	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
21	E2C2M3	1,00	2,00	2,00	5,00	1,67
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	2,00	1,00	2,00	5,00	1,67
24	E2C2M6	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00

ANEXO 10. NÚMERO DE HOJAS A LOS 150 DÍAS

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
2	E1C1M2	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
3	E1C1M3	1,00	1,00	2,00	4,00	1,33
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	2,00	3,00	2,00	7,00	2,33
6	E1C1M6	2,00	2,00	3,00	7,00	2,33
7	E1C2M1	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
8	E1C2M2	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
9	E1C2M3	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
10	E1C2M4	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
11	E1C2M5	1,00	2,00	2,00	5,00	1,66
12	E1C2M6	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
13	E2C1M1	2,00	4,00	3,00	9,00	3,00
14	E2C1M2	4,00	3,00	4,00	11,00	3,66
15	E2C1M3	5,00	5,00	5,00	15,00	5,00
16	E2C1M4	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
17	E2C1M5	2,00	3,00	3,00	8,00	2,66
18	E2C1M6	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
19	E2C2M1	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
20	E2C2M2	3,00	2,00	2,00	7,00	2,33
21	E2C2M3	3,00	3,00	2,00	8,00	2,66
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	2,00	4,00	3,00	9,00	3,00
24	E2C2M6	1,00	2,00	2,00	5,00	1,66

ANEXO 11. DÍAS AL TRASPLANTE

Tratamientos		Repeticiones			Total	Promedio
No.	Símbolo	I	II	III		
1	E1C1M1	141,00	144,00	144,00	429,00	143,00
2	E1C1M2	145,00	143,00	145,00	433,00	144,33
3	E1C1M3	137,00	145,00	143,00	425,00	141,67
4	E1C1M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	E1C1M5	89,00	87,00	89,00	265,00	88,33
6	E1C1M6	87,00	88,00	87,00	262,00	87,33
7	E1C2M1	143,00	147,00	144,00	434,00	144,67
8	E1C2M2	144,00	142,00	145,00	431,00	143,67
9	E1C2M3	142,00	143,00	145,00	430,00	143,33
10	E1C2M4	141,00	143,00	143,00	427,00	142,33
11	E1C2M5	88,00	87,00	87,00	262,00	87,33
12	E1C2M6	87,00	88,00	87,00	262,00	87,33
13	E2C1M1	88,00	88,00	86,00	262,00	87,33
14	E2C1M2	87,00	87,00	87,00	261,00	87,00
15	E2C1M3	88,00	89,00	88,00	265,00	88,33
16	E2C1M4	145,00	145,00	143,00	433,00	144,33
17	E2C1M5	88,00	88,00	87,00	263,00	87,67
18	E2C1M6	146,00	144,00	145,00	435,00	145,00
19	E2C2M1	143,00	142,00	141,00	426,00	142,00
20	E2C2M2	124,00	115,00	116,00	355,00	118,33
21	E2C2M3	87,00	89,00	88,00	264,00	88,00
22	E2C2M4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	E2C2M5	88,00	87,00	88,00	263,00	87,67
24	E2C2M6	116,00	117,00	115,00	348,00	116,00