

**UNIVERSIDAD ESTATAL DE CUENCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Escuela de Bioquímica y Farmacia**



**“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE PLANTULAS DE ORQUÍDEA  
*Dacyglossum edwardii* EN MEDIOS DE CULTIVO SIMPLES CON  
SUPLEMENTOS ORGÁNICOS FRENTE A MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y  
SKOOG MODIFICADO COMO TESTIGO”**

**Tesis previa a la obtención del Título  
de Bioquímico Farmacéutico**

**DIRECTORA:**

Dra. Raffaella Ansaloni

**AUTORAS:**

Patricia Elizabeth Supliguicha Guillén

Sandra Elisa Vera Castro

**Cuenca- Ecuador**

**2015**



## RESUMEN

Las orquídeas son especies vegetales amenazadas o en peligro de extinción por una explotación irracional debida a su valor ornamental. Es de gran importancia optimizar sistemas de micropropagación para conseguir la reproducción de orquídeas en forma masiva.

El objetivo del estudio fue evaluar el crecimiento in vitro de orquídeas de la especie *Dacyglossum edwardii* en medios de cultivo simples con suplementos orgánicos, banano, harina de plátano verde y puré de papa, frente al medio de cultivo testigo Murashige y Skoog (MS) modificado demostrando que estos medios simples pueden reemplazar fácilmente al medio convencional.

Demuestra mejor resultado el medio de cultivo de harina de plátano con sacarosa tanto en el crecimiento con 3,3 cm de crecimiento, como en la sobrevivencia con 98,75%; seguido del medio de cultivo de puré de papa con sacarosa con valores de 3 cm y 97,5% para el crecimiento y sobrevivencia respectivamente al compararlos con el medio testigo MS modificado que en crecimiento obtuvo 2,8 cm y sobrevivencia de 91,25%.

El pH inicial, de 5,6 considerado el ideal, en el transcurso de la investigación sufre modificaciones; los medios con pH más ácidos que el ideal demuestran mejor efectividad que los medios con pH más básicos.

Palabras claves: Micropropagación, cultivo in vitro, medios de cultivo, orquídeas, puré de papas, harina de plátano.

**Palabras claves:** Micropropagación, cultivo in vitro, medios de cultivo, orquídeas, puré de papas, harina de plátano.



## ABSTRACT

Orchids are plant species threatened due to an irrational exploitation for its ornamental value. Micro propagation methods must be optimized to improve massive reproduction of these species.

The aim of the present study was to assess the “in vitro” growth of orchids from the specie *Dacyglossum edwardii* in simple culture media enriched with organic supplements: banana, green banana flour and potato puree. Murashige & Skoog modified medium was used as a control, to demonstrate the feasibility to replace simple media for the conventional medium.

Green banana flour enriched with sacarose presented better results increasing plant growth up to 3,3 cm and survival percentage to 98.74%. Potato puree and conventional medium yielded plant growth of 3 and 2,8 cm and survival percentage of 97,5 and 91,25%, respectively.

Media were formulated with an initial pH of 5.6. This value, considered optimum, experiment variations during the plant growth. Media with acidic pH, compared with 5.6 were more effective compared with basic pH media.

**Key words:** Micro-propagation, in vitro cultivation, culture media, orchid cultivation



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INDICE GENERAL	4
CLAUSULAS	12
DEDICATORIA	16
DEDICATORIA	17
AGRADECIMIENTO	18
INTRODUCCIÓN	19
CAPÍTULO 1	
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1 ORQUIDEAS	21
1.1.1. DACYGLOSSUM	21
1.1.2. DACYGLOSSUM EDWARDII	22
1.2 PROPAGACION VEGETATIVA	24
1.2.1 CULTIVO IN VITRO	24
1.2.1.1 MICROPROPAGACIÓN	25
1.2.1.1.1 ETAPAS DE LA MICROPROPAGACION	26
1.2.1.1.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN	28
1.2.1.1.3 PROBLEMAS EN LA MACROOPERACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN	28
1.3 MEDIOS DE CULTIVO	29
1.3.1 COMPONENTES DEL MEDIO	29
1.3.1.1 FUENTE DE CARBONO	30
1.3.1.2 NUTRIMENTOS MINERALES	30
1.3.1.3 MACROELEMENTOS	30
1.3.1.4 MICROELEMENTOS	31
1.3.1.5 AGENTES GELIFICANTES	33
1.3.1.6 REGULADORES DE CRECIMIENTO	33
1.4 MEDIOS DE CULTIVO ORGÁNICOS COMPLEJOS	34
1.5 COMPOSICION QUIMICA DE LOS COMPONENTES ORGÁNICOS COMPLEJOS	34
1.5.1 GUINEO	34
1.5.2 HARINA DE PLÁTANO VERDE	36
1.5.3 PURÉ DE PAPA DESHIDRATADO	37
CAPÍTULO 2	
2. MATERIALES Y MÉTODOS	39



2.1 TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	39
2.2 DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	39
2.3 MUESTREO	39
2.4 MATERIALES Y REACTIVOS	39
2.5 MÉTODOS	40
2.5.1 MEDIO MURASHIGUE Y SKOOG MODIFICADO	40
2.5.1.1 PRINCIPIO	40
2.5.1.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRE	40
2.5.1.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO	41
2.5.1.4 DISOLUCION DEL BACTO AGAR Y DISTRIBUCIÓN DEL MEDIO	41
2.5.1.5 ESTERILIZACION DEL MEDIO	41
2.6 PROCEDIMIENTOS	42
2.6.1 MEDIO MS MODIFICADO	42
2.6.2 MEDIO MS MODIFICADO SIN SACAROSA	42
2.6.3 MEDIO GUINEO CON SACAROSA	42
2.6.4 MEDIO GUINEO SIN SACAROSA	42
2.6.5 MEDIO PURÉ DE PAPA CON SACAROSA	43
2.6.6 MEDIO PURÉ DE PAPA SIN SACAROSA	43
2.6.7 MEDIO HARINA DE PLATANO CON SACAROSA	43
2.6.8 MEDIO HARINA DE PLATANO SIN SACAROSA	43
2.6.9 LIMPIEZA DE CÁMARA, SELECCIÓN Y SIEMBRA DE LAS PLÁNTULAS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	43
2.6.10 REVISIÓN Y CONTROL DE CONTAMINACIÓN DE LOS MEDIOS Y POSTERIORMENTE LA MEDICIÓN DE LAS PLÁNTULAS	44
CAPÍTULO 3	
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
3.1 INCREMENTOS DEL CRECIMIENTO MENSUAL	45
3.2 INCREMENTO TOTAL DE CRECIMIENTO EN CADA MEDIO	47
3.3 SOBREVIVENCIA	49
3.4 PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN FINAL	50
3.5 INCREMENTO MENSUAL FRENTE pH	51
3.6 INCREMENTOS TOTALES Y SOBREVIVENCIA A pH FINAL	52
3.7 ANALISIS DE LA ESTADÍSTICA	53
3.7.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	53
3.7.1.1 INCREMENTOS	54



3.7.1.2 Ph	55
3.7.2 ANÁLISIS DE VARIANZA: TEST ANOVA	55
3.7.2.1 TEST DE SCHEFFE	56
3.7.2.1.1 PRIMER MES	56
3.7.2.1.2 SEGUNDO MES	57
3.7.2.1.3 TERCER MES	58
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	67



UNIVERSIDAD DE CUENCA

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Dacyglossum edwardii</i>	23
FIGURA 2. Cultivo in vitro de explantos	26



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Composición química del guineo	34
TABLA 2. Composición química de la harina de plátano	36
TABLA 3. Composición química del puré de papa	37
TABLA 4. Codificación de los medios de cultivo evaluados en el estudio	45
TABLA 5. Porcentaje de contaminación de los medios de cultivo durante el estudio	51
TABLA 6. Variación de pH en los medios de cultivo medidos cada mes	51
TABLA 7. Comparación de la variación del incremento, porcentaje de sobrevivencia y variaciones de pH al finalizar el estudio	52
TABLA 8. Estadística descriptiva de los incrementos, tomados cada mes	54
TABLA 9. Estadística descriptiva del pH de los medios	55
TABLA 10. Test ANOVA de los incrementos de crecimiento en los medios de cultivo	56
TABLA 11. Subconjuntos homogéneos de los medios de cultivo en el primer mes (mayo)	56
TABLA 12. Subconjuntos homogéneos de los medios de cultivo en el segundo mes (junio)	57
TABLA 13. Subconjuntos homogéneos de los medios de cultivo en el tercer mes (julio)	58





## INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Variación de incrementos en el crecimiento en los medios de cultivo, tomados cada mes	45
GRÁFICA 2. Incrementos totales de crecimiento en cada medio durante los tres meses de estudio	47
GRÁFICA 3. Porcentaje de sobrevivencia en las plántulas en los medios de cultivo al finalizar el estudio	49



## INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca-Balzay	67
ANEXO 2. Materiales y reactivos	67
ANEXO 3. Soluciones madre	68
ANEXO 4. Preparación del medio MS modificado	70
ANEXO 5. Preparación del medio Guineo	72
ANEXO 6. Preparación del medio Puré de papa deshidratado	73
ANEXO 7. Preparación del medio de Harina de plátano verde	74
ANEXO 8. Selección y siembra de las plántulas en los medios de cultivo.	76
ANEXO 9. Limpieza de la cámara de flujo	77
ANEXO 10. Aseo de manos para trabajar en la cámara de flujo	77
ANEXO 11. Revisión y control de la contaminación microbiológica De los medios, posterior medición de plántulas y pH de los medios	78
ANEXO 12. Medición del pH en los medios de cultivo	79
ANEXO 13. Desinfección con sulfato de cobre y sellado con papel film de las tapas	80
ANEXO 14. Manejo de la autoclave	80
ANEXO 15. Cámara de flujo	81
ANEXO 16. Siembra de las plántulas en los diferentes medios	82
ANEXO 17. Medios de cultivo en cámara de flujo laminar	82
ANEXO 18. Invernadero del Orquideario de la Universidad de Cuenca-Balzay	83
ANEXO 19. Medición de las plántulas de cada medio	84
ANEXO 20. Resultados de contaminación y sobrevivencia semanales de cada medio por los tres meses de evaluación.	88
ANEXO 21. Datos de las mediciones de las plántulas y pH de los diferentes medios durante los tres meses de evaluación.	92



ANEXO 22. Resultados de los incrementos de cada plántula en los diferentes y el incremento del tercer mes	97
ANEXO 23. Promedio de los incrementos y la suma de los diferentes medios.	101
ANEXO 24. Prueba de Sheffé de comparaciones múltiples con los incrementos de todas las plántulas durante los tres meses de estudio.	101



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca  
Clausula de propiedad intelectual

---

*Patricia Elizabeth Supliguicha Guillén*, autora de la tesis “EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE PLANTULAS DE ORQUÍDEA *Dacyglossum edwardii* EN MEDIOS DE CULTIVO SIMPLES CON SUPLEMENTOS ORGÁNICOS FRENTE A MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG MODIFICADO COMO TESTIGO”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 18 de noviembre de 2015

---

Patricia Elizabeth Supliguicha Guillén

C.I: 0104968912



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca  
Clausula de propiedad intelectual

---

*Sandra Elisa Vera Castro* autora de la tesis "EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE PLANTULAS DE ORQUÍDEA *Dacyglossum edwardii* EN MEDIOS DE CULTIVO SIMPLES CON SUPLEMENTOS ORGÁNICOS FRENTE A MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG MODIFICADO COMO TESTIGO", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 18 de noviembre de 2015

Sandra Elisa Vera Castro

C.I.:1400737787



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca  
Clausula de derechos de autor

---

*Patricia Elizabeth Supliguicha Guillén*, autora de la tesis "EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE PLANTULAS DE ORQUÍDEA *Dacyglossum edwardii* EN MEDIOS DE CULTIVO SIMPLES CON SUPLEMENTOS ORGÁNICOS FRENTE A MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG MODIFICADO COMO TESTIGO", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 18 de noviembre de 2015

---

Patricia Elizabeth Supliguicha Guillén

C.I: 0104968912



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca  
Clausula de derechos de autor

---

*Sandra Elisa Vera Castro*, autora de la tesis "EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE PLANTULAS DE ORQUÍDEA *Dacyglossum edwardii* EN MEDIOS DE CULTIVO SIMPLES CON SUPLEMENTOS ORGÁNICOS FRENTE A MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG MODIFICADO COMO TESTIGO", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 18 de noviembre de 2015

Sandra Elisa Vera Castro

C.I.:1400737787



UNIVERSIDAD DE CUENCA

### **DEDICATORIA**

Esta tesis la dedico a mis padres Marco Supliguicha y Patricia Guillén que me apoyaron incondicionalmente en la parte moral y económica para poder llegar a ser un profesional.

A toda mi familia por su confianza y apoyo durante el transcurso de mi vida universitaria.

**Patricia Elizabeth**





UNIVERSIDAD DE CUENCA

## **DEDICATORIA**

A dos seres maravillosos, mis padres, Luis y Teresa, por demostrarme su amor infinito apoyándome incondicionalmente, su entrega y lucha día a día para que salga adelante fueron la mejor motivación para cumplir con esta etapa en mi vida; a mis hermanos, Iván y Diego, y a toda mi familia por no permitir que me dé por vencida nunca.

**Sandra Elisa**



UNIVERSIDAD DE CUENCA

### **AGRADECIMIENTO**

Una gratitud infinita a la Dra. Raffaella por su apoyo, confianza, tiempo dedicado y conocimientos compartidos para llevar a cabo el desarrollo de esta tesis.

A todas las personas que de una u otra forma han colaborado para finalizar este proyecto.

**Patricia Elizabeth y Sandra Elisa**



## INTRODUCCIÓN

La propagación de orquídeas de manera natural se ve dificultada debido a que no en todo ambiente natural existe la simbiosis asistida por el hongo micorrizógeno, necesario para su germinación y desarrollo (Paredes Sandoval, 2012) .

Es por esto que en el Orquideario de la Universidad de Cuenca se desarrolla el cultivo de orquídeas por técnicas de micropropagación in vitro, cuando las plantas alcancen un tamaño y características adecuadas serán implantadas en un hábitat natural garantizando su supervivencia y desarrollo.

La propagación “in vitro” utiliza medios de cultivos especiales, el medio utilizado en el Laboratorio del Orquideario de Balzay es el MURASHIGE Y SKOOG modificado (MS) que presenta los nutrientes específicos para la germinación y desarrollo de la plántula; lo que este estudio propone es la utilización de medios de cultivo simples orgánicos que pueden sustituir las sales minerales, compuestos orgánicos y suplementos del MS modificado.

Las orquídeas tienen facilidad de germinación y crecimiento in vitro cuando se le suministra los nutrientes necesarios, el medio de cultivo MURASHIGE Y SKOOG modificado (MS) ofrece estos requerimientos, está compuesto por: agua, agar, sales minerales, hormonas, azúcares, vitaminas, suplementos orgánicos complejos, carbón activado; una vez que se presenta la germinación de la semilla es necesario que esta plántula sea implantada en otro medio de cultivo para que continúe con su desarrollo normal (Peña Pontón, 2009).

Las preparaciones de estos medios de cultivo conllevan a un gasto de dinero elevado al igual que del tiempo. La Universidad no siempre cuenta con los recursos económicos necesarios para la adquisición de estas sustancias y esto hace que se dificulte el trabajo en el laboratorio para el cultivo de orquídeas.

Este estudio permitirá conocer el porcentaje de sobrevivencia y crecimiento de las plántulas inoculadas, pH y contaminación en los medios simples orgánicos frente al medio de cultivo testigo durante un período de tiempo de 3 meses, de igual manera al conocer si las plántulas sobreviven y crecen en mayor proporción en los medios



orgánicos que en los controles podremos reemplazar el medio testigo por aquellos que son fuente de estudio.

Al usar sacarosa en la preparación de tres medios simples orgánicos y otros tres sin este sustrato podremos conocer los porcentajes de contaminación, ya que la sacarosa aparte de brindar energía para que las plántulas crezcan, también es aprovechada por los diferentes microorganismos en especial hongos para su desarrollo (Sardi Barzallo & Guzmán Cárdenas, 2007).

Por lo tanto, con la realización de este estudio se garantiza una sobrevivencia y crecimiento de las plántulas en los medios de cultivo facilitando la propagación de orquídeas.

De igual manera el éxito en el estudio nos permite abaratar costos en cuanto a la adquisición de las sustancias para la preparación de medios de cultivo eficaces para la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Los suplementos orgánicos que se utilizarán en el estudio son: puré de papa, harina de plátano y guineo. Para el medio de cultivo testigo se usará el medio de cultivo MS modificado. Todos los medios de cultivo presentan un pH de 5.6, indispensable para el crecimiento de la plántula.



## CAPÍTULO 1

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. ORQUIDEAS

Las orquídeas son plantas cautivadoras y seductoras por sus flores en formas atractivas y extrañas con una alta gama de colores; estas se encuentran a lo largo y ancho de todo el planeta por eso se consideran plantas cosmopolitas. Su existencia es de 40-80 millones de años ya que su evolución ocurrió después de que los continentes se separaron (Freuler, 2006).

Las orquídeas del Ecuador fueron exploradas desde el tiempo de la colonia, sin embargo la gran mayoría de la flora Orchidaceae del Ecuador fue descubierta después de la Segunda Guerra Mundial, cuando investigadores principalmente de los Estados Unidos y Suecia realizaron expediciones botánicas (Hirtz, 2013).

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

##### 1.1.1. *DACYGLOSSUM (Rchb. f) Königer y Schildh*

Este género abarca alrededor de 60 especies, pero si se incluye a todas las orquídeas que se pueden hibridar con *Odontoglossum* son alrededor de 300 especies, las más populares incluyen *Colmanara*, *Odontioda* y *Odontocidium*; son originarias de las altas selvas de América central y los Andes sudamericanos. La mayor parte viven en zonas montañosas a una altitud de 1500 - 4000 m sobre el nivel del mar, en zonas húmedas y sombreadas, no requieren mucha aireación y luz solar directa.

La mayoría tienen flores llamativas de color amarillo y marrón con pequeñas pigmentaciones pero las plantas ornamentales más populares han sido las especies con



flores blancas y rosadas y segmentos más amplios combinadas con múltiples colores, mezclados entre sí (Bockemuhl, 1989) (Home, 2000).

### **Etimología:**

Proviene del griego odonto (diente) y glossos (lengua), el labelo presenta en el centro una callosidad similar a un diente. (Home, 2000)

### **Descripción:**

Son plantas epifitas es decir, que no echan raíces en el suelo, sino que lo hacen en las ramas de árboles o arbustos, o en estratos rocosos, de desarrollo simpodial, provista de un fuste rizomatoso caracterizado por la presencia de pseudobulbos unifoliadas o bifoliadas ya sea aplastada u ovalada, de estos pseudobulbos se originan las hojas, generalmente racemosa, las hojas son lineales y largas, si crecen en climas templados las hojas se desarrollan en forma de acordeón y muchos tallos estériles. (Bockemuhl, 1989)(Home, 2000).

La inflorescencia es producida a partir de las axilas de las vainas o los tallos florales que surgen de la base de los pseudobulbos o del fuste rizomatoso; es multifloral, es decir, pueden tener de 5 hasta 30 flores; la floración se produce dos veces al año. Las flores de *Odontoglossum* son grandes y llamativas, inestablemente pintadas y jaspeadas. El labelo tiene una forma muy variable, según la especie, normalmente más pequeño que los pétalos y siempre abrupto u ondulado, incidido o con nervaduras (Bockemuhl, 1989) (Gordon Cheers, 2005).

La polinización ha sido por abejorros y se supone que la mayoría de las orquídeas se realizaron por estos insectos (Bockemuhl, 1989)

### **Cultivo:**

Los miembros del género *Odontoglossum* deben ser cultivadas en un ambiente fresco, con abundante agua durante todo el año, con temperaturas no mayores a 25°C, con una humedad de 60-80%, el riego deben realizarse cada dos o cuatro días ya que son



sensibles. La exposición a la luz solar directa provocara un retraso en la floración, las hojas se tornaran rojizas. La vida media de esta especie es alrededor de 8 a 10 años. (Bockemuhl, 1989)

### **1.1.2. *DACYGLOSSUM EDWARDII* (Rchb. f) Königer y Schildh**

**Nombre común:** Odontoglossum de Edward

**Sinónimos:** Odontoglossum edwardii Rchb. F y Cyrtorchilum eduardii (Rchb. F.)



**Dacyglossum edwardii**

**(Home, 2000)**



## 1.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA

Se define como la reproducción de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano, siendo así que cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de iguales características según sean las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, nutrientes, sanidad, etc.)

La propagación vegetativa tiene tres variantes la primera la propagación por partes vegetativas, la segunda es la propagación por injertos y la tercera es la propagación *in vitro* en la cual células o pequeñas partes de tejidos u órganos son cultivados en condiciones controladas de laboratorio (Suárez Haro, 2011).

### 1.2.1. Cultivo *in vitro*

Las orquídeas son consideradas una de las especies más diversas, pero también una de las más vulnerables, por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta, por el gran interés comercial que ha despertado desde hace muchos años, lo que ha favorecido un extenso mercado, en el que tanto las plantas como las flores de corte se cotizan en precios elevados. Por lo que es de vital importancia tomar acciones que conlleven a un manejo sostenible de las orquídeas, como lo es el establecer sistemas de micropropagación, para conseguir la reproducción de orquídeas en forma masiva a partir de semillas o tejidos vegetativos. Con esto, se reduce de cierta manera la pérdida de especies de sus poblaciones naturales (Avila Diaz & Salgado Garciglia, 2006)

Los principales usos de un cultivo *in vitro* son: mejoramiento genético, obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, conservación de germoplasma y micropropagación. La micropropagación es la técnica con mayor eficacia en los experimentos aplicados a la práctica (Villalobos A. & Thorpe, 1991).

El cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio con medio de cultivo, generalmente semisólido, en un ambiente artificial. Tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. (Castillo, 2008) (Suarez de Castro, 1993).





Reproducir, en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza, es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa el cultivo (Castillo, 2008).

Con el cultivo *in vitro* se facilita el estudio de cientos de células vegetales en un laboratorio pequeño, evitando tener un número equivalente de plantas y cuyo cultivo exigiría hectáreas de invernaderos o campos de cultivo (Suarez de Castro, 1993) (Alarcón, Ferrera, González Chávez, & Villegas Monter, 2001).

Además, al compararla con la propagación convencional presenta los siguientes beneficios:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo
- Reducción del tiempo de multiplicación
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en superficies reducidas
- Control de sanidad del material que se propaga
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un lugar a otro
- Multiplicación amplia de variedades de las cuales existían pocas (Villalobos A. & Thorpe, 1991) (Sosa Rodríguez, Soto Ortiz, Machado Armas, & Hernández Pérez, 2008) (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996).

#### **1.2.1.1. Micropropagación**

Originalmente, la micropropagación se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprende la manipulación de plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permiten el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996).



La micropropagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones (Castillo, 2008) (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996) (Paliwal, 2001).

Además, la utilidad de este método depende de la posibilidad de hacer crecer dichas células hasta plantas completas. Esto se logra cuando los cultivos son expuestos a condiciones de luz, temperatura y nutrientes, conjuntamente con reguladores de crecimiento apropiados (Suarez de Castro, 1993).

Una de las mayores ventajas de los cultivos *in vitro* o micropropagación es la disminución de costos en el momento de su aplicación práctica, es decir disminución en costos de operación (Colmenares & Giménez, 2003) (Sosa Rodríguez, Soto Ortiz, Machado Armas, & Hernández Pérez, 2008). El obtener grandes cantidades de una especie en una sola siembra sin duda permite la disminución de gastos para el cultivo de la especie, se usa menor cantidad de material, el espacio disminuye de cientos de hectáreas a unos cuantos metros cuando se realiza micropropagación, de la misma manera el tiempo que lleva realizar el control en los cultivos, los factores físicos y químicos son factibles y modificables, de esta manera se garantiza una producción segura y abundante.

Los puntos críticos en el cultivo *in vitro* son, principalmente, el establecimiento del cultivo estéril, la vitrificación durante la fase de multiplicación y las pérdidas durante la fase de aclimatación *in vivo* de las plantas (Estopa, 2005).

**1.2.1.1.1. Etapas de la micropropagación** (Villalobos A. & Thorpe, 1991) (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996) (Olmos, Luciani, & Galdeano)

Para realizar con éxito una técnica se llevan a cabo las siguientes fases o etapas:

1. Elección de la planta original donante de explantos
2. Obtención y desinfección de los explantos
3. Adaptación de explantos al medio de cultivo



4. Formación de raíces con el fin de convertir los brotes en plántulas completas
5. Aclimatación de las plántulas obtenidas in vitro a las condiciones medioambientales ex vitro

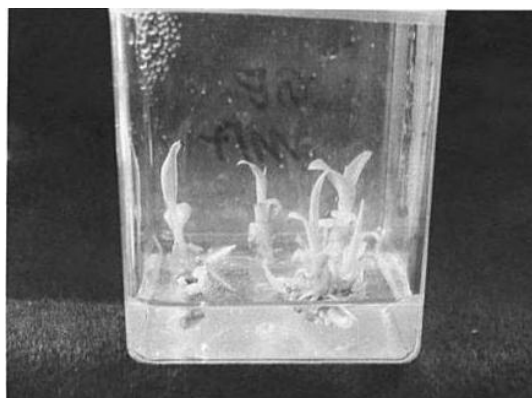
En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento.

#### *Adaptación de explantes al medio de cultivo*

El desarrollo de semillas y su sobrepoblación en el frasco inicial obliga a que se realice un trasplante de las plántulas para una facilidad de crecimiento y formación de raíces.

Son transferidas a cajas petri esterilizadas, en las que son separadas unos de otros antes de ser plantadas en los nuevos tubos de vidrio. Para este procedimiento se pueden usar varillas de vidrio esterilizadas para llevar los brotes o plántulas desde la caja petri a su nueva posición, presionando suavemente en la superficie del agar. Pueden transplantarse de 4 a 12 plántulas en cada frasco, dejándolos crecer hasta un nuevo trasplante (Morán Luques, 1996).

Los cultivos se mantienen en habitaciones con ambiente controlado, con 16 horas de luz y con una intensidad lumínica de 3000lux. (Sandoval, 1991).



**Figura 2.** Cultivo in vitro de explantos

**Fuente:** Micropropagación de Plátano y Banano musa Aab, Aaa en El Catie; 1991.



**1.2.1.1.2. Factores que influyen en la micropropagación** (Villalobos A. & Thorpe, 1991) (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996)

- a) Planta que dona el explante. - para evitar diferencias de requerimientos hormonales y nutricionales en los tejidos cultivados se debe evitar tomar plantas madres de diferentes edades fisiológicas. De la misma manera cuando las plantas madres son demasiado jóvenes se dificulta el cultivo in vitro.
- b) El explante. - se debe tomar en cuenta el sistema de propagación de la planta; si la planta tiene reproducción por semilla se toman las partes embrionales o de las plántulas. El tamaño no tiene mayor importancia en la micropropagación.
- c) Factores físicos. - de mayor importancia la luz y la temperatura, la luz es esencial en la morfogénesis e involucra varios componentes como la intensidad, el fotoperiodo y la calidad, en el caso de la temperatura es ésta la que controla la incubación para la propagación.
- d) Medio de cultivo. - El éxito del cultivo depende en gran medida de la selección del medio del cultivo por lo que su composición química y forma física.

**1.2.1.1.3. Problemas en la Macrooperación de la Micropropagación** (Sardi Barzallo & Guzmán Cárdenas, 2007) (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996)

- a) La contaminación microbiana. - factor a tomarse en cuenta debido a que este problema es uno de los más severos y principales en los laboratorios de micropropagación. El control de la incidencia de contaminantes microbianos se ve favorecido si se realizan buenas técnicas de siembra, limpieza y acondicionamiento de los laboratorios.

Los hongos, bacterias y levaduras son los contaminantes frecuentes de nuestros cultivos; los hongos se diferencian fácilmente por ser algodonosos y filamentosos mientras que las bacterias y levaduras presentan un aspecto gelatinoso y brillante.

Muchas veces la contaminación se da por el explante inicial, los métodos de desinfección no siempre eliminan las poblaciones microbianas en su totalidad.



- b) Plántulas amarillentas. - ciertas plántulas con crecimiento aparentemente normal, después de semanas o meses cambian su color a amarillo y posteriormente mueren. El exceso de luz, hormonas o sales también hace que se presente este color no normal en las plántulas.

### 1.3. MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo *in vitro* de orquídeas está compuesto básicamente por: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas y en algunos casos reguladores de crecimiento. Es importante un elemento para que aporte consistencia, se utiliza agar o gelatina simple. Normalmente en los laboratorios se utilizan medios de cultivo, formulaciones ya preparadas industrialmente, cada una de ellas contienen entre 15-35 compuestos químicos (Mendieta Teller, 2002) (Molina, 2012).

La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Castillo, 2008).

Generalmente, se utiliza el medio de Murashige y Skoog (MS) o modificaciones de éste (Esquivel & Jean, 1994). Las plantas crecen en un ambiente aséptico y su desarrollo requiere una fuente de energía exógena (azúcar), es decir, son plantas heterótrofas con escaso desarrollo fotosintético; además, se desarrollan en presencia de una alta humedad relativa (Sandoval, 1991).

Esta fórmula ha sido utilizada con éxito para una gran variedad de especies así como para diferentes partes de la planta (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996).

#### 1.3.1. Componentes del medio

Los principales son (Morán Luques, Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, 1996) (Molina, 2012):



- 1.3.1.1. Fuente de Carbono.** - muy pocos cultivos son autótrofos y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono, la sacarosa en concentraciones de 2-5% actúa como una fuente de energía hasta que las plántulas produzcan clorofila y sean independientes, este componente es el que más se utiliza y en algunos medios se la reemplaza por glucosa, maltosa o galactosa.
- 1.3.1.2. Nutrimientos minerales.** - son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras de las cuales destaca las concentraciones elevadas de nitrógeno y potasio, el nitrógeno es suministrado en forma de amonio o nitrato, el hierro debe ser agregado con un agente quelante, es decir la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ).
- 1.3.1.3. Macroelementos.** - hace referencia a que estas sustancias se requieren en grandes cantidades, ellas incluyen calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre.
- *Nitrógeno:* compuesto específico de las proteínas es necesario en la síntesis de tejidos, se encuentra en moléculas importantes como las purinas, pirimidinas, vitaminas, alcaloides y enzimas.
  - *Fósforo:* forma parte de los elementos plásticos de la planta, constituyente esencial de numerosas coenzimas, forma parte de la biosíntesis de glucósidos, fotosíntesis, síntesis de clorofila.
  - *Potasio:* aumenta la actividad fotosintética asegurando una mejor utilización de la energía luminosa, disminuye la transpiración y contribuye a mantener la turgencia celular.
  - *Calcio:* su acción en las plantas es de actuar como un agente cementante que ayuda a mantener las células unidas, también es importante para el desarrollo de las raíces en la cual actúa como multiplicador de células, crecimiento y neutralización de los hidrogeniones.



- *Magnesio*: cumple una de las funciones más importantes en la planta ya que forma parte de los pigmentos verdes, permite el uso de la energía solar para la fotosíntesis y los constituyentes orgánicos.
- *Azufre*: se le administra como sulfato y en la planta se reduce en compuestos sulfhídricos de esta manera ayuda a la planta en la regulación osmótica.

**1.3.1.4. Microelementos.** - estos elementos pueden variar en su uso y contenido ya que su ausencia o presencia no parece ser crítico para el desarrollo de las orquídeas. Los microelementos son: hierro, manganeso, cobre, cobalto, yodo, boro, sodio, cloro, vitaminas del complejo B, aminoácidos y amidas.

- *Hierro*: participa en la síntesis de clorofila y en el sistema respiratorio. Los iones de hierro precipitan en el medio, especialmente en la presencia del calcio, las plantas no pueden aprovecharlo. Para evitar este inconveniente es necesario agregarlo al medio en forma de quelato, el agente quelante lo mantiene en solución.
- *Manganeso*: es parte integral de la membrana que recubre los cloroplastos. Se agrega al medio como sulfato de manganeso monohidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).
- *Cobre*: es necesario en la conversión de energía, en la síntesis de la clorofila, y se encuentra como compuesto de algunas enzimas. Para agregar la cantidad de cobre necesaria se utiliza el sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).
- *Cobalto*: es parte integral de la vitamina B12 y ayuda en la fijación de nitrógeno; se agrega como cloruro de cobalto dihidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).
- *Yodo*: componente de algunos aminoácidos, pero no se le considera verdaderamente un elemento esencial. En algunos cultivos puede llegar a tener un efecto adverso. Se agrega al medio como yoduro de potasio (KI).
- *Boro*: está involucrado en el movimiento de azúcares, agua y hormonas, así mismo con el metabolismo de nitrógeno y en la división celular. Es tóxico a niveles muy altos, causando daños severos o incluso muerte de la planta. Se añade al medio como ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).



- *Cloro*: ayuda a estimular la fotosíntesis y estimula el crecimiento de las plantas. Se requiere en cantidades muy mínimas y es agregado en el compuesto cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).
- *Vitaminas*: las vitaminas del complejo B son importantes en el metabolismo y el crecimiento de las plantas, pero también encontramos otras; entre las vitaminas que se utilizan tenemos:
  - ✓ Tiamina (B1): utilizado en el proceso de respiración de la planta, por lo general se utiliza en una concentración de 0,4mg/L. es una vitamina esencial que se requiere en casi todos los cultivos.
  - ✓ Riboflavina (B2): ayuda en la metabolización de carbohidratos y en la respiración celular.
  - ✓ Niacina (B3): estimula el crecimiento de las plantas a través de su participación como componente de coenzimas que actúan en las reacciones de energía. Por lo general se agrega al medio entre 0,1 a 10 mg/L.
  - ✓ Adenina (B4): es parte integral del ADN y ARN en el núcleo de la célula. También actúa como citoquinina pero de una manera muy débil; se utiliza como sulfato de adenina para la promoción y formación de brotes.
  - ✓ Ácido pantoténico (B5): actúa como coenzima en el metabolismo de grasas. Se agrega al medio en forma de pantotenato de calcio.
  - ✓ Piridoxina (B6): al igual que el ácido nicotínico estimula el crecimiento de las plantas actuando en las reacciones de energía.
  - ✓ Ácido ascórbico (C): se utiliza como antioxidante para prevenir la oxidación de compuestos fenólicos.
  - ✓ Tocoferol (E): para mejorar y promover la dispersión en cultivos de suspensión.
  - ✓ Biotina (H): utilizada en el metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos.
- *Aminoácidos y amidas*: los requerimientos de estos se pueden determinar rápidamente por la adición de un hidrolizado proteico. Los que han demostrado tener





efecto benéfico son la arginina, ácido aspártico, asparraguina, ácido glutámico y la glutamina.

- 1.3.1.5. Agentes Gelificantes.** - se adiciona entre 0,6-1% considerando la pureza del agar, esta es una gelatina vegetal de origen marino que se obtiene a partir de diversas especies de algas rojas.
- 1.3.1.6. Reguladores del crecimiento.** - en muchos casos es necesario agregar al medio de cultivo sustancias reguladoras de crecimiento generalmente del tipo auxinas o citoquininas. Las concentraciones varían de especie a especie, pero generalmente, las auxinas se usan en una concentración de 0,1 a 10 mg/L y las citoquininas de 0,03 a 30 mg/L.
- 1.3.1.7. pH.** - es importante porque afecta la biodisponibilidad de los nutrientes para las plantas en crecimiento o semillas. El pH debe estar en 5,6 caso contrario si se encuentra muy alcalino debe ser ajustado con unas gotas de ácido clorhídrico, ácido nítrico, o sulfúrico; si el medio está muy ácido debe ser ajustado con una base tal como el hidróxido de amonio, hidróxido de potasio.
- 1.3.1.8. Otros componentes.** - se les ha introducido como fuentes de micro y macroelementos, entre ellos tenemos al jugo de coco, banano, plátano, patatas, jugos de tomate, extracto de levadura, carbón activado (0,1-5%) introducido por la capacidad de absorber metabolitos tóxicos

### **Reguladores del crecimiento**

a. *Las auxinas* (Suárez Haro, 2011) (Esquivel & Jean, 1994)

Algunas son naturales y otras sintéticas; se conocen, el ácido indolacético (AIA), ácido naftalacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), 2, 4,-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y 2, 4,5-T (ácido 2,4 triclorofenoxiacético). La función o modo de acción de las auxinas, se sitúa principalmente a nivel de las membranas celulares, donde se modifican la permeabilidad de ésta, llevando consigo también una modificación del funcionamiento celular y activando su metabolismo, esto tiene efecto sobre la división y crecimiento



celular, la atracción de nutrientes y de otras sustancias al sitio de aplicación, además de las relaciones hídricas y fotosintéticas de las estacas, entre otros aspectos.

b. *Las citoquininas* (Suárez Haro, 2011) (Esquivel & Jean, 1994)

Se encuentran en forma natural y sintética, las más conocidas son: zeatina, kinetina y benzilaminopurina (BAP). Su presencia es positiva porque actúan en interacción con las auxinas en el papel que ellas ejercen sobre la desdiferenciación y sobre la división celular, es importante realizar un justo equilibrio auxinas/citoquininas. Los efectos de la auxina son evidentes sobre la rizogénesis, por lo que es probable que las citoquininas en interacción con otras sustancias causen el mismo efecto.

#### **1.4. MEDIOS DE CULTIVO ORGÁNICOS COMPLEJOS**

En la actualidad es posible preparar medios de cultivo sustituyendo las sales minerales y los reguladores de crecimiento por suplementos orgánicos que fácilmente encontramos en nuestro alrededor, como el guineo, puré de papa o extracto de papa, el plátano o harina de plátano verde, agua de coco, etc., que aportan los nutrientes principales para la germinación del embrión y el desarrollo de la planta de orquídea.

Al medio se debe agregar agar, para que mantenga sólido al medio aun a temperaturas del ambiente. Generalmente estos medios presentan un pH de 5,6; sin embargo, si no se encuentra en este pH es fácil regularlo, ya sea con un ácido o con una base (sal) e incluso con gotas de limón o sal de mesa, según sea el caso (Morales Benavent, 2011).

#### **1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS COMPONENTES ORGÁNICOS COMPLEJOS**

##### *1.5.1. Guineo:*

Tienen un valor nutritivo que radica fundamentalmente en su contenido de carbohidratos. Además, son alimentos extremadamente acuosos, y, por lo tanto, voluminosos: cerca de las dos terceras partes de las mismas son agua.



La presencia de taninos en guineos y plátanos parece ser el principal factor antinutricional presente en estas frutas. Los taninos inhiben la acción de las enzimas proteolíticas entre otras acciones indeseables. (Instituciones de Investigaciones Porcinas, 2004).

Esta es la composición nutricional del guineo por cada 100 gramos de producto comestible (Pérez, 2013) (Instituciones de Investigaciones Porcinas, 2004):

<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GUINEO</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD POR CADA 100g (g)</b>
Energía	17,11 Kcal
Agua	74,91
Proteínas	1,09
Lípidos	0,33
Hidratos de carbono	22,84
Fibra cruda	3,6
Calcio	0,04 a 0,05
Fósforo	0,13 a 0,22
Hierro	0,026
Magnesio	0,27
Potasio	35,8
Sodio	0,1
Zinc	0,015
Cobre	0,0078
Manganeso	0,027
Vitamina C	0,87
Vit. B1	0,0031
Vit. B2	0,0073
Vit. B3	0,066
Vit. B5	0,033



Vit. B6	0,036
Aminoácidos	0,220

**Tabla 1.** Composición química del guineo

**Fuente:** (Pérez, 2013), (Instituciones de Investigaciones Porcinas, 2004)

#### 1.5.2. Harina de Plátano verde

La harina de Plátano es un producto 100% natural, elaborado a base de plátano verde. Es un polvo de color blanco parduzco, de fácil digestión y susceptible a la humedad. Tiene fácil cocción (90° C en 8 minutos). Es muy rica en hidratos de carbono y sales minerales, como: calcio orgánico, potasio, fósforo, hierro, cobre, flúor, yodo y magnesio. También posee muchas vitaminas, como la Vitamina A, del complejo B, como la tiamina, riboflavina, pirodoxina y ciancobalamina y, vitamina C. Su gran riqueza en vitamina C, combinada con la del fósforo, resulta ideal para el fortalecimiento de la mente. Es decir, es remineralizante y energético (Orozo Colloguazo & Picón Moreno, 2011).

La composición química del plátano caracterizada por la presencia de almidones y escasez de ácidos, lo hace un producto extremadamente sensible al oxígeno al igual que al calor (Robles Dávila, 2007).

En la siguiente tabla se muestra el valor nutricional del plátano fresco por 100 gramos de sustancia comestible (Orozo Colloguazo & Picón Moreno, 2011) (Robles Dávila, 2007) (Bolívar, 2009):

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE PLÁTANO VERDE		
COMPONENTE		CANTIDAD (g)
Humedad		14%
Proteínas		1,1 a 1,3
Lípidos		0,2 a 0,37
Carbohidratos	Total	22,2 a 31,89
	Fibras	6 a 11,27



Vitaminas	Vit. A (UI)	0,6
	Vit. B1 (mg)	0,050 a 0,052
	Vit. B2 (mg)	0,054 a 0,06
	Vit. B6 (mg)	0,32 a 0,68
	Ácido nicotínico (mg)	0,6
	Ácido pantoténico (mg)	0,2
	Vit. C (mg)	10 a 18,4
Otros componentes orgánicos	Ácido málico (mg)	10
	Ácido cítrico (mg)	150
Sales minerales	Sodio (mg)	1 a 4
	Potasio (mg)	420 a 499
	Calcio (mg)	3 a 8
	Hierro (mg)	0,6 a 0,7
	Magnesio (mg)	31
	Manganeso (mg)	0,64
	Cobre (mg)	0,2
	Fósforo (mg)	28
	Azufre (mg)	12
	Cloro (mg)	125

**Tabla 2:** Composición química de la harina de plátano verde

**Fuente:** (Orozo Colloguazo & Picón Moreno, 2011), (Robles Dávila, 2007), (Bolívar, 2009).

### 1.5.3. Puré de Papa deshidratado

Es una forma procesada de la papa, mantiene la mayoría de las características del producto fresco; además en esta presentación permite una mayor capacidad de conservación, preparación rápida y no genera desperdicios domésticos. Se puede encontrar puré de papa deshidratado blanco (papa común) y amarillo (papa amarilla peruana), la textura es como la de escamas; por cada 100 g de puré de papa tenemos (Egúsquiza, 2010):



COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PURÉ DE PAPA DESHIDRATADO	
COMPONENTE	CANTIDAD (G)
Calorías	80-96Kcal
Agua	77
Proteínas	2 a 2,1
Grasas	0,1 a 0,2
Hidratos de carbono	20
Sodio	0,08
Calcio	0,17
Hierro	0,08
Magnesio	0,30
Manganeso	0,02
Fósforo	0,58
Azufre	0,29
Cloro	0,35
Cobre	0,02
Vit. A	40 (UI)
Vit. B6	0,02
Vit. C	0,30

**Tabla 3.** Composición química del puré de papa

**Fuente:** (Egúsquiza, 2010)



## CAPÍTULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Investigación es de tipo experimental y probabilístico.

#### 2.2. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó con plántulas de orquídeas *Dacyglossum edwardii* obtenidas de semillas germinadas *in vitro* en el Laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca, ubicado en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay. ANEXO 1.

Los análisis físicos y procesos químicos se llevaron a cabo en el Laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca y en el Laboratorio de Análisis de Suelos.

640 plántulas de la orquídea *Dacyglossum edwardii* provenientes del Laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca; se inocularon 10 de éstas en cada medio de cultivo MS modificados con suplementos orgánicos (puré de papa, harina de plátano y guineo) con sacarosa y sin sacarosa, y en medio testigo MS modificado con sacarosa y sin sacarosa.

#### 2.3. MUESTREO

Tomar los frascos de orquídea *Dacyglossum edwardii* (número 25) del tercer replante, seleccionar y medir las plántulas que tengan de 3 a 5 cm, excluyendo las raíces en la medición.

#### 2.4. MATERIALES Y REACTIVOS. ANEXO 2.



## 2.5. MÉTODOS

Los métodos utilizados para el desarrollo del estudio fueron los empleados en el Laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca.

### 2.5.1. *Medio Murashige y Skoog Modificado*

#### 2.5.1.1. Principio

El medio Murashige y Skoog (MS) es comúnmente usado para cultivos de tejidos vegetales y han probado ser efectivas para el crecimiento y propagación de monocotiledoneas y dicotiledoneas. La fórmula original fue desarrollada por medio de estudios nutricionales que requieren de muestras de tabaco y contienen una alta concentración de sal que la planta tradicional de la formula Knop o White. MS está caracterizada por una gran concentración de nitrato ( $\text{NO}^{-3}$ ) y amonio ( $\text{NH}^{+4}$ ), el incremento de crecimiento es de 5 a 7 veces más al compararlo con los medios tradicionales.

Muchas modificaciones del medio MS han sido desarrolladas desde la fórmula original de 1962.

Aunque el medio MS fue originalmente desarrollado para el callo del tabaco, cuando el MS es propiamente suplementado a base de sales, puede soportar el crecimiento y la iniciación del callo, el crecimiento de las células en suspensión y la regeneración de brotes y plántulas de muchas especies de plantas. Para las orquídeas es común emplear una versión del MS desarrollada por la casa Sigma, que se llama Phytamax®.

En el Laboratorio del Orquideario de Balzay se busca imitar el medio Phytamax® adaptado en MS modificado.

#### 2.5.1.2. Preparación de las soluciones madre

Las soluciones madre de sales inorgánicas se deben preparar combinándolas de modo que no precipiten. ANEXO 3.

Las sustancias que se agregan en grandes cantidades como la sacarosa, carbón activado y agar no requieren de una disolución previa.





### **2.5.1.3. Preparación del medio**

Pesar la sacarosa, agar-agar y el carbón activado, disolver en 500 mL de agua destilada y mezclar por unos minutos.

Con 200 mL de agua licuar 200g de guineo maduro, agregar a la mezcla anterior y realizar tres lavados con los 300 mL de agua restantes, homogenizar y agregar una gota de un tensoactivo (jabón líquido).

Para el ajuste del pH se emplea soluciones de 1.0 N de NaOH y 1.0 N de HCl. Este proceso debe realizarse antes de agregar las soluciones madre.

### **2.5.1.4. Disolución del Bacto™ agar y distribución del medio**

El agar debe ser disuelto con calentamiento usando un magneto o una varilla de vidrio; incorporar las soluciones madre, vitaminas y hormonas de crecimiento.

Para la distribución se requiere de un embudo y una bureta dependiendo de la precisión de la cantidad de medio que se agrega al frasco. (Sigma, 1998).

### **2.5.1.5. Esterilización y vida útil del medio**

El medio se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 120°C a 1atm, el tiempo óptimo varía según la cantidad de frascos y volumen de medio por recipiente.

A temperatura ambiente el medio tiene una vida media de 2-3 semanas; el tiempo aumenta si se almacena en refrigeración 4-8 °C. (Sigma, 1998)

Para garantizar estos aspectos es importante:

- Usar agua destilada.
- Los materiales deben estar bien limpios.
- El carbón activado de ser bien fino y preferentemente prelavado.
- Evitar contaminación de la sacarosa con otros componentes.



## **2.6. PROCEDIMIENTOS**

### **2.6.1. Medio MS modificado. ANEXO 4.**

- Pesar la sacarosa, carbón activado, agar-agar, disolver con agua destilada.
- Pesar el guineo y licuar con unos 100 mL de agua destilada e incorporar a la mezcla anterior, ajustar la solución a 1 L
- Adicionar dos gotas de un tensoactivo (jabón líquido)
- Hervir por 3 minutos para una disolución completa.
- Agregar las soluciones madre y la vitamina (Complejo B)
- Homogenizar y colocar un aproximado de 30 mL de medio en cada frasco y esterilizar.

### **2.6.2. Medio MS modificado sin sacarosa**

Seguir el mismo procedimiento sin la adición de sacarosa.

### **2.6.3. Medio guineo con sacarosa. ANEXO 5.**

- Pesar la sacarosa, carbón activado, agar-agar, disolver con agua destilada.
- Pesar el guineo y licuar con unos 100 mL de agua destilada e incorporar a la mezcla anterior, ajustar a 1 L.
- Adicionar dos gotas de un tensoactivo (jabón líquido)
- Hervir por 3 minutos para una disolución completa.
- Homogenizar y colocar un aproximado de 30 mL de medio en cada frasco y esterilizar.

### **2.6.4. Medio guineo sin sacarosa**

Seguir el mismo procedimiento sin la adición de sacarosa.



#### **2.6.5. Medio puré de papa con sacarosa. ANEXO 6.**

- Pesar la sacarosa, carbón activado, agar-agar, puré de papa y disolver con agua destilada.
- Adicionar dos gotas de un tensoactivo (jabón líquido)
- Hervir por 3 minutos para una disolución completa.
- Homogenizar y colocar un aproximado de 30 mL de medio en cada frasco y esterilizar.

#### **2.6.6. Medio puré de papa sin sacarosa**

Seguir el mismo procedimiento sin la adición de sacarosa.

#### **2.6.7. Medio de harina de plátano con sacarosa. ANEXO 7.**

- Pesar la sacarosa, carbón activado, agar-agar, harina de plátano y disolver en agua destilada.
- Adicionar dos gotas de un tensoactivo (jabón líquido)
- Hervir por 3 minutos para una disolución completa.
- Homogenizar y colocar un aproximado de 30 mL de medio en cada frasco y esterilizar.

#### **2.6.8. Medio de harina de plátano sin sacarosa**

Seguir el mismo procedimiento sin la adición de sacarosa.

#### **2.6.9. Limpieza de la cámara, selección y siembra de las plántulas en los medios de cultivo. ANEXO 8.**

- Limpiar la cámara de acuerdo al procedimiento. ANEXO 9.
- Seleccionar los frascos de la orquídea del 3er replante
- Escoger las plántulas de 3 a 5 cm y separarlos



- Colocar las cajas estériles en la cámara, preparar las lámparas y pinzas
- Lavado de manos. ANEXO 10.
- Sacar las plántulas en las cajas petri
- Limpiar las plántulas con ayuda de las pinzas y separar
- Abrir los medios esterilizando con alcohol
- Sembrar 10 plántulas en cada frasco cuidadosamente con ayuda de las pinzas
- Cerrar los frascos y etiquetar
- Sacar los frascos y proteger con sulfato de cobre
- Sellar con plástico film cubriendo toda la tapa
- Llevar a los estantes en el cuarto de crecimiento de orquídeas

#### **2.6.10. Revisión y control de contaminación microbiológica de los medios y posteriormente la medición de las plántulas y el pH del medio. ANEXO 11**

- Revisar los frascos una vez por semana durante los tres meses
- Observar si existe desarrollo microbiológico de bacterias u hongos
- Si existiera contaminación retirar del anaquel y esterilizar para evitar contaminación cruzada
- De la misma manera observar la sobrevivencia de cada plántula en cada frasco
- Cada mes elegir un frasco de cada medio para realizar las mediciones de las plantas
- De los frascos que se midieron las plántulas cada mes se realiza también la medición del pH del medio. ANEXO 12.
- Sacar las plántulas en cajas petri y proceder a medir una por una
- Anotar las medidas para los cálculos posteriores

NOTA: El tercer mes elegir dos frascos de cada medio para realizar las mediciones.



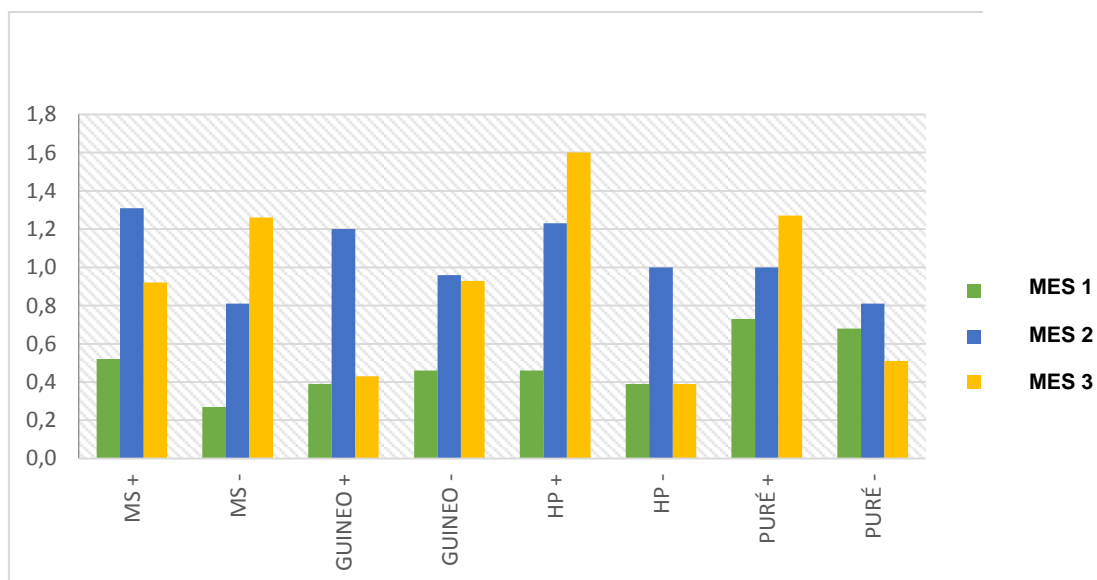
### CAPÍTULO 3

#### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MEDIOS DE CULTIVO		
NÚMERO	CÓDIGO	NOMBRE DEL MEDIO
1	MS+	Murashige y Skoog Modificado con sacarosa
2	MS-	Murashige y Skoog Modificado sin sacarosa
3	GUINEO+	Guineo con sacarosa
4	GUINEO-	Guineo sin sacarosa
5	HP+	Harina de plátano verde con sacarosa
6	HP-	Harina de plátano verde sin sacarosa
7	PP+	Puré de papa con sacarosa
8	PP-	Puré de papa sin sacarosa

**Tabla 4.** Codificación de los medios de cultivo evaluados en el estudio

##### 3.1. INCREMENTOS DEL CRECIMIENTO MENSUAL



**Grafica 1.** Variación de incrementos en el crecimiento en los medios de cultivo, tomados cada mes



En la gráfica se observa el incremento del crecimiento de las plántulas en los diferentes medios durante los tres meses; las barras de color verde corresponden al mes de mayo que es el primer mes de evaluación de los cultivos, se observa que en los medios de puré de papa con y sin sacarosa se obtuvo mayor crecimiento, con un incremento de 0,7cm; el medio con un menor incremento es el medio control MS sin azúcar con un valor de 0,3 cm.

Las barras azules corresponden a la segunda evaluación de los cultivos, en el mes de junio, notándose que el crecimiento de las plántulas fue mayor en el medio MS control con azúcar con un incremento de 1,3 cm, seguido de los medios de guineo y harina de plátano verde con sacarosa en un incremento de 1,2 cm; en el medio MS control y puré de papa sin sacarosa el crecimiento fue menor, de 0,8 cm.

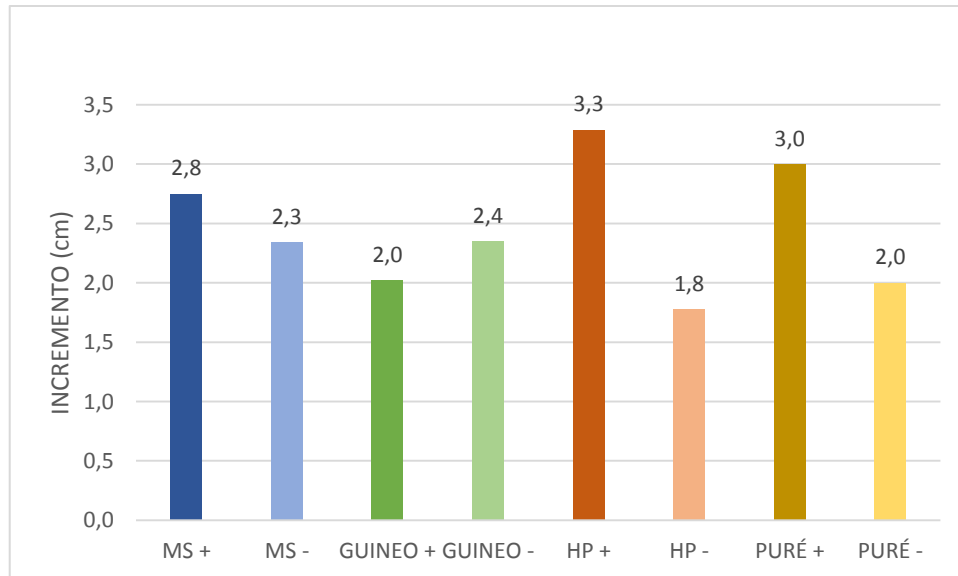
Finalmente, en el tercer mes, barras naranjas, observamos que el medio con mayor incremento de crecimiento de plántulas es el de harina de plátano verde con sacarosa, con 3cm un valor de 1,6cm; seguido de los medios MS control sin sacarosa y puré de papa con sacarosa, con un incremento de 1,3cm; los medios con menor crecimiento son el de guineo con sacarosa y el de harina de plátano sin sacarosa, con un valor de 0,4cm.

Según Villena y Lala (2002) la variabilidad en el crecimiento de una plántula está determinada por la dosis de composición, relacionada con el contenido total de las sales, macro y micronutrientes absorbidos y las necesidades específicas de cada especie. Por esta razón se puede asumir que el comportamiento de las plántulas de esta especie varía en cada uno de los medios de cultivo, debido a que las composiciones no son iguales en ningún de ellos.

Ansaloni (Con. Pers. 2015), menciona que las plantas de orquídeas tienen un ciclo en su desarrollo, cuando estas llegan a su etapa juvenil, presentan tallo y alrededor de 4-6 hojas, luego de ser plántulas sufren un estado de reposo en su crecimiento, lo hacen para iniciar su fase de enraizamiento y en esta fase desarrollan las raíces y no crecen; por tal razón en nuestro estudio se evidencia que en el tercer mes los incrementos son menores con respecto al primer y segundo mes de medición, donde existe una proporcionalidad con el tiempo, los incrementos son menores porque las plántulas medidas en el tercer mes son de 4-5 cm y estas pueden estar iniciando la etapa de enraizamiento; esto ocurre en los medios MS con sacarosa, guineo con sacarosa, guineo sin sacarosa, puré de papa sin sacarosa



### 3.2. INCREMENTO TOTAL DE CRECIMIENTO EN CADA MEDIO



**Gráfica 2.** Incrementos totales de crecimiento en cada medio de cultivo, durante los tres meses de estudio

La gráfica representa el sumatorio total de los incrementos en cada uno de los medios durante los tres meses de evaluación de los cultivos, notándose así que el medio con mayor crecimiento es el de harina de plátano verde con sacarosa, con un valor de 3,3 cm; seguido del medio de puré de papa con sacarosa, con un valor de 3 cm; los medios de control MS con sacarosa y sin sacarosa con valores de 2,8 cm y 2,3 cm respectivamente. En el medio de guineo sin sacarosa se observa un incremento de 2,4 cm seguido de los medios de puré de papa sin sacarosa y guineo con sacarosa con medidas de 2 cm. El medio de cultivo donde se observa el mínimo crecimiento durante el estudio es el de harina de plátano verde sin sacarosa con un incremento de 1,8 cm.

Investigaciones realizadas por Flachslund y colaboradores (1996) ensayando diversos medios de cultivo para incluir el crecimiento in vitro de 41 especies de orquídeas ha indicado, según estos ensayos que agregar plátano y carbón activado a los medios de cultivo sólidos es beneficioso para la mayoría de las especies, en nuestro estudio el medio de harina de plátano verde con sacarosa es el que mejor resultado ofrece para el crecimiento de plántulas, corroborándose así lo dicho por Flachslund y colaboradores.



La cantidad de azúcares en los medios de cultivo es de extrema importancia como fuente de energía para el desarrollo de las plántulas, la harina de plátano verde y el puré de papa presentan mayor porcentaje de carbohidratos en comparación con el guineo y el medio MS modificado; y si a esto se le adiciona una cantidad extra de sacarosa, como ocurre en el estudio, se potencializa el efecto de los azúcares como fuente de energía, permitiendo un desarrollo más intenso de las plántulas; esto se evidencia en los medios de harina de plátano verde y puré de papa con sacarosa, donde las plántulas demuestran mayor incremento en su crecimiento; lo que no ocurre con los otros medios a los que se le adicionó sacarosa.

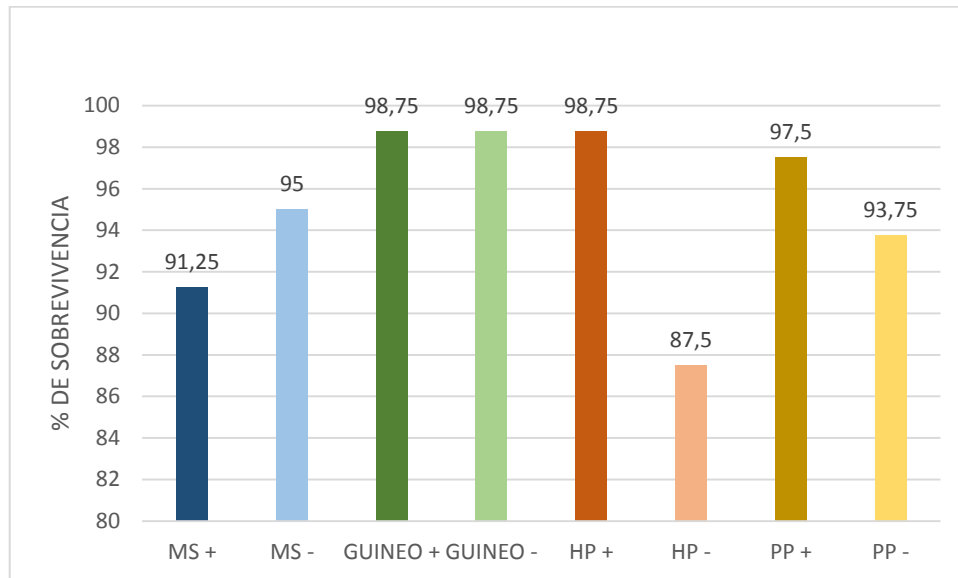
El medio MS modificado con sacarosa y el medio de guineo con sacarosa presenta la misma concentración de azúcares, puesto que el medio MS modificado lleva este nombre por la adición de guineo; pero, en cuanto a la concentración de sales y vitaminas, el medio MS presenta una elevada concentración de las mismas con respecto al medio de guineo que es orgánico y es quizá por esto que el crecimiento es mayor en el medio MS, al comparar los dos medios.

El estudio realizado por Sardi L. y Guzmán S. (2007) con medios convencionales en el cual usan el medio de puré de plátano verde en dos especies de orquídeas para evaluar el crecimiento, realizándose dos mediciones, a los 4-5 meses y a los 7-8 meses, revelan que este medio no favorece al crecimiento de las orquídeas durante la primera medición debido a que el promedio de crecimiento es de 0,4cm para una especie y de 0,0cm para la otra; mientras que en nuestro estudio al utilizar la harina de plátano verde el porcentaje de crecimiento es alto a los 3 meses, teniendo un valor de 3,3 cm para el medio con sacarosa y 1,8 cm para el medio sin sacarosa; con estos resultados podemos decir que el inconveniente de utilizar el plátano verde es la presencia de taninos que según las Instituciones de Investigaciones Porcinas (2004), es el principal factor antinutricional puesto que inhibe la acción de enzimas para el crecimiento de las plántulas, mientras que al usar un producto comercial y al pasar por procesos industriales se eliminan taninos y por lo tanto la harina de plátano favorece el crecimiento de las plántulas.





### 3.3. SOBREVIVENCIA DE PLÁNTULAS



**Gráfica 3.** Porcentaje de supervivencia de plántulas en los medios de cultivo al finalizar el estudio

En la gráfica que representa la supervivencia de las plántulas en cada uno de los medios de cultivo indica que, en los medios de guineo con sacarosa, guineo sin sacarosa y el de harina de plátano verde con azúcar existe mayor porcentaje de supervivencia, del 98,75%; seguido por el medio de puré de papa con sacarosa con un porcentaje de 97,6%. Los medios con menor porcentaje de supervivencia son: MS control con sacarosa con un 91,25% y el de harina de plátano verde sin sacarosa con un 87,5%.

El estudio realizado por Vargas (2012) demuestra que en medio MS existe una supervivencia del 70% de las plántulas y en un medio MS con suplementos orgánicos, en este caso agua de coco y plátano la supervivencia es del 75%.

Placencia (2010) cultivó orquídeas en medio MS luego de desinfectarlas con distintos tratamientos y al finalizar el estudio obtiene una supervivencia de plántulas de 90 al 100% variando de acuerdo al tratamiento inicial.

No se han reportado valores exactos de aceptación en cuanto a supervivencia-mortalidad de plántulas en medios de cultivo in vitro. Con los resultados obtenidos en nuestro estudio los porcentajes de supervivencia se consideran aceptados ya que existen valores altos, sin embargo si comparamos los medios evaluados entre sí, observamos que no



existe una diferencia significativa en el porcentaje de sobrevivencia entre los medios con y sin sacarosa y que la mayoría de los medios orgánicos son mejores que los controles; como sucedo con los medios orgánicos de harina de plátano verde con sacarosa y de guineo con y sin sacarosa tienen un porcentaje de 98,75% de sobrevivencia; por lo tanto, los medios orgánicos pueden sustituir al MS modificado.

### 3.4. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN FINAL

MEDIO	% CONTAMINACIÓN
MS +	0
MS -	0
GUINEO +	0
GUINEO -	0
HP +	0
HP -	0
PP +	0
PP -	0

**Tabla 5.** Porcentaje de contaminación de los medios de cultivo durante el estudio

Durante el tiempo de estudio no se observó ningún tipo de contaminación en los medios por lo tanto el porcentaje de contaminación es del 0%; esto se debe a que los tratamientos de esterilización de los frascos y medios se realizaron adecuadamente, de igual manera durante la manipulación de los medios y de las plántulas en la siembra. Para el almacenamiento de los frascos en el invernadero, estos son protegidos con sulfato de cobre en las tapas y posteriormente sellados con papel film. El sulfato de cobre juega un papel importante en la no contaminación de los medios puesto que actúa como antimicrobiano. ANEXO 13.

Valenzuela (1998) señala por ejemplo que la frecuencia u ocurrencia de una fuente de contaminación en los medios de cultivo varía entre laboratorios y cambia con las variaciones de estación, clima, personal, procedimiento y asepsia entre otros; la contaminación hace que disminuya la calidad del material vegetativo; en el caso de nuestro estudio no se observa contaminación en ningún medio de cultivo puesto que los



procedimientos se realizaron en un mismo laboratorio con la adecuada asepsia y el mismo personal.

### 3.5. INCREMENTO MENSUAL FRENTE A pH

MES	MEDIO	pH	CRECIMIENTO
1 MAYO	MS +	5,15	0,52
	GUINEO +	5	0,39
	HP +	5,2	0,46
	PP +	5,46	0,73
	MS -	5,04	0,27
	GUINEO -	5,1	0,46
	HP -	5,6	0,39
	PP -	5,73	0,68
2 JUNIO	MS +	5	1,31
	GUINEO +	4,96	1,2
	HP +	5	1,23
	PP +	5,2	1
	MS -	4,7	0,81
	GUINEO -	4,7	0,96
	HP -	5,5	1
	PP -	6	0,81
3 JULIO	MS +	4,93	0,92
	GUINEO +	4,82	0,43
	HP +	5,06	1,6
	PP +	5,05	1,27
	MS -	4,84	1,26
	GUINEO -	4,88	0,93
	HP -	5,7	0,39
	PP -	5,8	0,51

**Tabla 6.** Variación de pH en los medios de cultivo, medidos cada mes

La tabla indica cómo varía el pH durante los 3 meses de evaluación de los cultivos, el pH inicial es de 5,6; podemos observar que algunos medios se vuelven más ácidos y otros



más básicos, con respecto al pH inicial. Se nota que hay mayor estabilidad en el medio de harina de plátano sin sacarosa. Los medios que se vuelven más ácidos son el MS control con y sin sacarosa, el de guineo con y sin sacarosa y el puré de papa con sacarosa; mientras que el medio que tiende a ser más básico es el de harina de plátano verde con sacarosa

### 3.6. INCREMENTOS TOTALES Y SOBREVIVENCIA A pH FINAL

MEDIO	CRECIMIENTO (cm)	SOBREVIVENCIA (%)	pH FINAL
MS +	2,8	91,25	4,93
MS -	2,3	95	4,84
GUINEO +	2,0	98,75	4,82
GUINEO -	2,4	98,75	4,88
HP +	3,3	98,75	5,06
HP -	1,8	87,5	5,7
PP +	3,0	97,5	5,05
PP -	2,0	93,75	5,8

**Tabla 7.** Comparación de la variación del incremento, porcentaje de sobrevivencia y variaciones de pH al finalizar el estudio

En la tabla se puede observar una relación de los incrementos, sobrevivencia y pH final. Se nota que el pH final influye en el incremento de las plántulas y no así en la sobrevivencia de las mismas, porque, en medios con pH más ácidos con respecto al ideal (5,6) como el MS control con y sin sacarosa con 2,8 cm y 2,3 cm respectivamente, el de guineo con y sin sacarosa con 2,0 cm y 2,4 cm respectivamente, el de harina de plátano verde con sacarosa con un valor de 3,3 cm y el de puré de papa con sacarosa con un valor de 3,0 cm el crecimiento fue mayor comparándolos con el crecimiento de los medios con pH superiores a 5,6 es decir el medio de harina de plátano verde sin sacarosa con un valor de 1,8 cm y puré de papa sin sacarosa con un valor de 2 cm.

Sin embargo, no se encuentra influencia del pH con la sobrevivencia, ya que medios con pH más ácidos o más básicos demuestran menor porcentaje de sobrevivencia con relación al de mayor sobrevivencia que es del 98,75%; el medio de guineo con sacarosa tiene una sobrevivencia de 98,75% pero el pH es de 4,82 (más ácido), así mismo el



medio de puré de papa sin sacarosa con una sobrevivencia del 93,75% tiene un pH de 5,8 (más básico). No se han encontrado estudios que demuestren la influencia del pH con la sobrevivencia de las plántulas en los medios.

El manual para el cultivo in vitro de la orquídea *Cattleya nobilior*, Rchb.f (2011) indica que el pH para la siembra de orquídeas debe estar entre 5 y 5,6.

Según Yoneo (1991), en la práctica el pH inicial se ajusta a valores comprendidos entre 5.2 y 5.8 durante la preparación del medio, durante el proceso el pH frecuentemente disminuye; sin embargo, se sabe muy poco sobre los efectos de esta variación.

Thompson (1980) difiere en el valor del medio y afirma que 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.

En cada uno de los estudios realizados y recomendados sobre un pH ideal no hay un acuerdo donde se conozca el pH exacto en medios de cultivo para la propagación de orquídeas, sin embargo, en todos es notorio que se recomienda un pH ácido. El pH que hemos fijado para la realización de nuestro estudio es de 5,6 porque es el que se recomienda para el medio MS y Phytamax® (Sigma) que son los más utilizados; en base a nuestro criterio y resultado obtenido consideramos que un pH más ácido a todos los recomendados podría ser más favorable para el crecimiento de las plántulas, puesto que a un pH de 5,06 en el medio de harina de plátano con sacarosa hay mayor incremento en crecimiento.

Hay que recalcar que tampoco se han encontrado estudios en donde se evalúe la variación de pH en distintas fases de crecimiento, sólo lo hacen al momento de la preparación de los medios.

### **3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### **3.7.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA**



### 3.7.1.1. Incrementos

Medición	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Varianza
MES 1	76	0,10	1,00	0,4921	0,23875	0,057
MES 2	73	0,20	2,60	1,0425	0,54618	0,298
MES 3	79	0,10	2,50	0,9234	0,51589	0,266

**Tabla 8.** Estadística descriptiva de los incrementos, tomados cada mes

La tabla indica la estadística descriptiva de los incrementos en el crecimiento de las plántulas medidos cada mes durante los tres meses de estudio, se observa que en el primer mes el valor mínimo de incremento de todos los medios analizados es 0,0 cm debido a que se toman todas las plántulas incluidas las que mueren por lo tanto el incremento no existe, de igual manera sucede en el segundo mes, en el tercer mes tenemos un incremento de 0,1 cm; el valor máximo de incremento es de 1,0 cm, 2,60 cm y 2,5 cm para el primer, segundo y tercer mes respectivamente, notándose que hay un mayor crecimiento en el segundo mes; la media de los incrementos es de 0,5 cm, 1,0 cm, 0,9 cm para el primer, segundo y tercer mes respectivamente y como en el segundo mes hubo un mayor incremento en el crecimiento, la media del segundo mes también es la mayor. En cuanto a la desviación estándar es mínima en cada uno de los meses, siendo mayor en el segundo y tercer mes con un valor de 0,5 para los dos. La varianza nos indica la dispersión de los datos respecto a la media, de manera que en nuestro estudio el valor con mayor aceptación es el del primer mes, puesto que el valor es 0,05 con respecto a los del segundo y tercer mes, es decir existe mayor homogeneidad en los datos.

En resumen, con los datos obtenidos se puede decir que en el primer mes existe mayor homogeneidad en el crecimiento de las plántulas, comparándolas con el segundo y tercer mes.



### 3.7.1.2. pH

pH	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
MES 1	8	5,00	5,73	5,2850	0,27485
MES 2	8	4,70	6,00	5,1325	0,43608
MES 3	8	4,82	5,80	5,1350	0,39053

**Tabla 9.** Estadística descriptiva del pH de los medios de cultivos

En el análisis del pH la tabla indica las variaciones del mismo durante los tres meses de estudio, el valor de pH mínimo es de 5,0; 4,7 y 4,82 para el primero, segundo y tercer mes respectivamente, en el segundo y tercer mes hay una variación más notoria referente al pH ideal de 5,6. En los valores máximos de pH tenemos 5,73 en el primer mes, 6,0 en el segundo mes y 5,8 en el tercer mes; todos los valores aumentan respecto al pH inicial pero el del tercer mes es el más alto. Las medias de pH son similares en los 3 meses de análisis, pero difieren del pH ideal. Al analizar la desviación estándar se considera que existe mayor homogeneidad de datos en el primer mes, debido a que el valor es el menor, de 0,27; mientras que para el segundo y tercer mes existe menor homogeneidad porque los valores son de 0,43 y 0,39 respectivamente.

Al igual que en los incrementos, el primer mes presenta mayor homogeneidad en la variación de pH; es decir, existe menos variabilidad en los resultados de los pH entre los medios.

### 3.7.2. ANÁLISIS DE LA VARIANZA: TEST ANOVA

Se utiliza para detectar la existencia de diferencias significativas entre las medias de una determinada variable cuantitativa en tres o más grupos de datos.

	F	Significancia
MES 1	5,792	0,000
MES 2	1,108	0,369



<b>MES 3</b>	18,619	0,000
--------------	--------	-------

**Tabla 10.** Test Anova de los incrementos de crecimiento en los medios de cultivo

Los resultados de la tabla 10 indican cuánto difieren significativamente los incrementos en los 8 medios de cultivo, para que exista una diferencia significativa el valor debe ser menor a 0,05; de tal manera que en el primer y tercer mes existe esta diferencia, no así en el segundo mes.

### 3.7.2.1. PRUEBA DE SCHEFFE

El test de Scheffé pertenece a una de las tantas pruebas a posteriori con las que nos encontramos al realizar un ANOVA de un factor, es decir, comparaciones entre medias para determinar diferencias significativas entre pares de medias. En este sentido, es similar al test de Tukey, pero a diferencia de este se emplea comúnmente cuando las muestras tienen  $n$  distintos (el de Tukey es sólo para  $n$  iguales).

Con esta prueba podremos clasificar los medios de cultivo de menor a mayor efectividad en crecimiento por meses.

#### 3.7.2.1.1. Primer mes

MEDIOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
MS-	9	0,2667	
HP-	8	0,3875	0,3875
Guineo+	10	0,3900	0,3900
Guineo-	10	0,4600	0,4600
HP+	10	0,4600	0,4600
MS+	9	0,5222	0,5222
PP-	10		0,6800
PP+	10		0,7300
Significancia		0,362	0,066





**Tabla 11.** Subconjuntos homogéneos de los medios de cultivo en el primer mes (mayo)

En el test Scheffé del primer mes, se forman dos subconjuntos homogéneos, en donde existe una diferencia significativa entre los medios de puré de papa con y sin sacarosa del segundo grupo frente al medio MS sin sacarosa del primer grupo. Los otros medios no presentan diferencia significativa entre ellos; por lo tanto, el medio de puré de papa con y sin sacarosa tiene mayor crecimiento en el primer mes en relación a los otros.

#### 3.7.2.1.2. Segundo mes

MEDIOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
PP-	9	0,8111
MS-	9	0,8111
Guineo-	9	0,9556
HP-	8	1,0000
PP+	10	1,0000
Guineo+	10	1,2000
HP+	9	1,2333
MS+	9	1,3111
Significancia		0,794

**Tabla 12.** Subconjuntos homogéneos de los medios de cultivo en el primer mes (junio)

La tabla nos demuestra que no existe diferencia significativa entre los medios de cultivo utilizados, el crecimiento es casi igual en todos los medios; por lo tanto, analizando sólo el segundo mes los medios tienen igual efectividad en cuanto a crecimiento.

**3.7.2.1.3. Tercer mes**

MEDIOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HP-	10	0,3900		
Guineo+	10	0,4250		
PP-	10	0,5050		
MS+	10	0,9200	0,9200	
Guineo-	10	0,9300	0,9300	
MS-	10		1,2600	1,2600
PP+	10		1,2700	1,2700
HP+	10			1,5950
Significancia		0,074	0,574	0,630

**Tabla 13.** Subconjuntos homogéneos de los medios de cultivo en el primer mes (julio)

Se observa la formación de tres subconjuntos homogéneos, apreciándose que existe una diferencia significativa del medio de harina de plátano del tercer grupo frente a los medios de harina de plátano sin sacarosa, guineo con sacarosa y puré de papa sin sacarosa, del grupo uno. Finalmente, el medio con mayor crecimiento en el tercer mes es el de harina de plátano con sacarosa y el medio que presenta menor crecimiento es el de harina de plátano sin sacarosa.



## CONCLUSIONES

- Con este estudio se pudo demostrar que los medios controles que se usan en la actualidad en la micropropagación de orquídeas en el Orquideario de la Universidad de Cuenca pueden ser sustituido por un medio simple con suplemento orgánico como el medio de harina de plátano o puré de papa con sacarosa ya que sus incrementos de crecimiento son mayores a los controles.
- Aunque en muchos casos la composición del medio basal Murashige and Skoog da resultados satisfactorios, se debe considerar que no siempre es la mejor opción, lo conveniente es seleccionar una composición en función del conocimiento de la fisiología de la especie con respecto a la nutrición mineral, porque con el test de Sheffé se demuestra que a pesar de que hubo crecimiento existen medios con mayor efectividad.
- No existen estudios que evalúen la variación de pH durante el desarrollo de las plántulas, con este estudio demostramos que las mediciones de pH en los medios de cultivo cada mes y su variación no influye en la sobrevivencia de las plántulas, pero sí en el crecimiento de las mismas, ya que a pH más ácidos que el ideal se obtuvieron mayores incrementos, a pesar de que Murashige y Skoog recomienda usar un pH inicial de 5,6 en los medios de cultivo para el crecimiento de orquídeas para que no afecte la absorción de nutrientes.
- No existió contaminación en los medios de cultivo por lo que la adición de azúcares no influye en la contaminación siempre y cuando se sigan los procesos de adecuados de asepsia.
- El porcentaje de sobrevivencia de las plántulas es alto nuestro estudio tiene valores de 98,75% como máximo y un mínimo de 87,5%; al igual que estudios realizados anteriormente.
- La adquisición de los insumos para la preparación de los medios simples con suplementos orgánicos es fácil y económica con respecto a los medios MS control; en



UNIVERSIDAD DE CUENCA

los medios MS control se requiere la preparación de soluciones madres, hormonas y vitaminas que tienen un costo elevado.



## RECOMENDACIONES

- Realizar otro estudio de la evaluación de los medios con diferentes especies y también considerar el mismo tamaño de plántulas, teniendo como base nuestro estudio.
- Evaluar medios de cultivo simples con suplementos orgánicos en distintas concentraciones para evidenciar su efectividad en el crecimiento de las plántulas.
- Utilizar un buffer para mantener el pH de 5,6 como se lo hace en el medio Phytamax® para mantener el pH y observar si existe efectividad durante el crecimiento de las plántulas.
- Sustituir el medio MS modificado por el medio de harina de plátano con sacarosa y puré de papa con sacarosa porque presenta mayor incremento de crecimiento o también al medio MS combinar con harina de plátano o puré de papa para probar su efectividad.
- Seguir ordenadamente los procedimientos de desinfección en la cámara, lavado de manos y esterilización de los materiales necesarios para la siembra, de igual manera el uso de sulfato de cobre y papel film para proteger los medios durante la invernación.



## BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, A., Ferrera, R., González Chávez, M., & Villegas Monter, A. (2001). HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES EN LA DINAMICA DE APARICION DE ESTOLONES Y NUTRICION DE PLANTAS DE FRESA CV. FERN OBTENIDAS POR CULTIVO IN VITRO. 18(3). Recuperado el 30 de Mayo de 2015, de <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/18/3/art211-218.pdf>
- Avila Diaz, I., & Salgado Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. (8). Recuperado el 1 de Junio de 2015, de <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/viewFile/9/9>
- Barbery, R., & Morales, I. (2011). Generalidades de las Orquídeas. Parte I. *Manual para el cultivo in vitro de la orquidea Cattleya nobilior*, 46. Recuperado el 2 de Octubre de 2015, de <http://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>
- Bockemuhl, L. (1989). *Odontoglossum Monographie and Ikonography*. Alemania: Veroffenticht. Recuperado el 1 de Agosto de 2015
- Bolivar. (Noviembre de 2009). *U.E.B.E MISIONES DEL CARONI*. Obtenido de [http://uebemisionesdelcaroni.blogspot.com/2009\\_11\\_01\\_archive.html](http://uebemisionesdelcaroni.blogspot.com/2009_11_01_archive.html)
- Castillo, A. (2008). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Recuperado el 23 de Mayo de 2015, de [https://scholar.google.com.ec/scholar?q=cultivo+in+vitro+de+plantas&hl=es&as\\_sdt=0&as\\_vis=1&oi=scholar&sa=X&sqi=2&ved=0CBkQgQMwAGoVChMIkuCsvN\\_xxglVxnA-Ch2lqwzP](https://scholar.google.com.ec/scholar?q=cultivo+in+vitro+de+plantas&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar&sa=X&sqi=2&ved=0CBkQgQMwAGoVChMIkuCsvN_xxglVxnA-Ch2lqwzP)
- Colmenares, M., & Giménez, C. (2003). Multiplicación in vitro Musa spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 20(4), 468-469. Recuperado el 28 de Junio de 2015, de <http://200.74.222.178/index.php/agronomia/article/view/12037/12026>
- Departamento de Biología de la Universidad de Oriente. (1996). Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos. En E. Morán Luques, *Apuntes Teóricos*. Departamento de Biología de la Universidad de Oriente.
- Egúsquiza, B. R. (2010). *LA PAPA: Produccion, Transformación y Comercialización*. Lima: CIMAGRAF. Recuperado el 25 de Julio de 2015, de <https://books.google.es/books?id=6ciGbBX0uFwC&pg=PA191&dq=pur%C3%A9+de+papa+descripci%C3%B3n&hl=es&sa=X&ved=0CCcQ6AEwAWoVChMIxsno2sLgxiwVBKQeCh1kVAq0#v=onepage&q=pur%C3%A9+de+papa+descripci%C3%B3n&f=false>
- Esquivel, A., & Jean, E. (1994). *Conceptos Basicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Turrialba: CASTIE.



- Estopa, M. (2005). El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *EXTRA*, 54-58. Recuperado el 30 de Junio de 2015, de [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_hortint/hortint\\_2005\\_E\\_50\\_57.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint/hortint_2005_E_50_57.pdf)
- Flachsland, E., Terada, G., Rey, H., & Mroginski, L. (1996). Medios de cultivo para la germinación in vitro de 41 especies de orquídeas. *FACENA*, 12. Recuperado el 1 de Octubre de 2015
- Freuler, M. J. (2006). *Orquídeas* (Primera ed.). Buenos Aires: Albatros. Recuperado el 8 de Julio de 2015, de [https://books.google.com.ec/books?id=SjFbL4qd9-MC&printsec=frontcover&dq=orquideas&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIgl\\_h3M7UxwIVBnc-Ch365g4C#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=SjFbL4qd9-MC&printsec=frontcover&dq=orquideas&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIgl_h3M7UxwIVBnc-Ch365g4C#v=onepage&q&f=false)
- Gordon, C., & Bank, D. (2005). *FLORA'S ORCHIDS*. Global Book Publishing. Recuperado el 18 de Julio de 2015
- Hirtz. (2013). *Ecuador Pais de las Orquídeas*. Recuperado el 29 de Agosto de 2015, de [http://visit.ecuador.travel/orquideas/index.php?option=com\\_tz\\_portfolio&view=article&id=64&Itemid=118](http://visit.ecuador.travel/orquideas/index.php?option=com_tz_portfolio&view=article&id=64&Itemid=118)
- Home, Y. (Octubre de 2000). *ELICRISO*. Recuperado el 1 de Agosto de 2015, de Nuestras amigas las orquídeas: <http://elicriso.it/es/orquideas/odontoglossum>
- Hunt, E. (2006). *Orchide species*. Recuperado el 5 de Julio de 2015, de [www.orchidspecies.com//odontedwardii.htm](http://www.orchidspecies.com//odontedwardii.htm)
- Instituciones de Investigaciones Porcinas. (2004). BANANAS Y PLATANOS PARA ALIMENTAR CERDOS: ASPECTOS DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LAS FRUTAS Y DE SU PALATABILIDAD. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 11(3). Recuperado el 28 de Julio de 2015, de <http://www.iip.co.cu/RCP/ant/RCP11.3.pdf#page=8>
- MALAVER, L. F. (2011). *EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL BANANO COMÚN*. Obtenido de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis605.pdf>
- Mendieta Teller, M. M. (Diciembre de 2002). *UNIVERSIDAD HEARTH*. Recuperado el 10 de Julio de 2015, de ESTUDIO TÉCNICO PARA LA PLANIFICACIÓN Y EL DISEÑO DE UN LABORATORIO ARTESANAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ORQUÍDEAS IN VITRO: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/98051.pdf>
- Molina, J. C. (2012). *Evaluacion de Cinco medios de cultivo*. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/387/1/TESIS.pdf>
- Morales Benavent, I. (Diciembre de 2011). Preparación de medios de cultivo. *Manual para el cultivo in vitro de la orquídea Cattleya nobilior "Flor símbolo de concepción"*. Recuperado el 2 de Agosto de 2015, de <http://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>



- Morales, G., Vanegas, L., & Ortega, D. (18 de Noviembre de 2009). *PROPAGACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS*. (U. N. Bogota, Ed.) Recuperado el 7 de Octubre de 2015, de <http://propagacioninvitrodeorquideas.blogspot.com/>
- Morán Luques, E. (1996). Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos. En E. Morán Luques, *Apuntes Teóricos*. Departamento de Biología de la Universidad de Oriente.
- Muñoz, M. (2011). Tesis de Ingeniero Agrónomo. *Evaluación de medios de cultivo para la germinación "in vitro" de las orquídeas cyrtorchilum macranthum y epidendrum jameisoni rchb.f.* Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Recuperado el 7 de Octubre de 2015, de [http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/876/1/Tesis\\_t001agr.pdf](http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/876/1/Tesis_t001agr.pdf)
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (s.f.). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Recuperado el 30 de Junio de 2015, de [http://www.argenbio.org/adcp/uploads/Libro\\_INTA\\_II/Parte\\_IV.pdf](http://www.argenbio.org/adcp/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf)
- Orozo Colloguazo, A., & Picón Moreno, J. (2011). *PLAN DE EXPORTACIÓN DE HARINA DE PLATANO DE LA EMPRESA BRITO VACA CIA. LTDA. MOLINO EL FENIX DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA AL MERCADO DE ESTADOS UNIDOS CIUDAD DE MIAMI FL.* Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Facultad de Administración de Empresas, Riobamba. Recuperado el 30 de Julio de 2015, de Repositorio de la Escuela Superior del Chimborazo: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/handle/123456789/1790/52T00199.pdf;jsessionid=1277011F1A0481C7CE2E596ADF72C153?sequence=1>
- Paliwal, R. L. (2001). *EL MAIZ EN LOS TRÓPICOS*. Recuperado el 14 de Mayo de 2015, de Uso de herramientas especiales para el mejoramiento del maíz: <http://www.fao.org/3/a-x7650s/x7650s21.htm>
- Paredes Sandoval, E. F. (Abril de 2012). *INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURALES*. Recuperado el 15 de Marzo de 2015, de Determinación de los protocolos para cultivo in vitro de las especies Epidendrum schistochilum y Oncidium cultratum: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4072/1/UPS-QT02905.pdf>
- Peña Pontón, C. (2009). *INGENIERIA*. Obtenido de Establecer y evaluar protocolos de desinfección, introducción y Multiplicación in vitro de piñón (*Jatropha curcas*) a partir de semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas élite: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/779/14/T-ESPE-026781-1.pdf>
- Pérez, R. (2013). *Copyright © dietaynutricion.NET*. Obtenido de Dieta y Nutricion.net: <http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional-de/banano/>
- Placencia Carrera, M. C. (2010). Tesis de Ingeniero Agrónomo. *EFFECTO DE DOS FITOHORMONAS EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN DE LA ORQUÍDEA Epidendrum sp BAJO CONDICIONES in vitro*. Ibarra, Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE. Recuperado el 4 de Octubre de 2015, de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/144/1/03%20AGP%2097%20ARTICULO%20CIENTIFICO.pdf>





- Robles Dávila, K. (2007). Harina y productos de plátano. Recuperado el 28 de Julio de 2015, de <http://www.ilustrados.com/documentos/harina-producto-platano-240807.pdf>
- Rodriguez. (2005). *Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas*. Recuperado el 30 de Julio de 2015, de <http://www.orquidarioilhadodesterro.com.br/fotos/4da6e5fd78317.pdf>
- Rollke, F. (2008). *Orchideen*. Barcelona: Hispano Europea. Recuperado el 20 de Julio de 2015, de [https://books.google.com.ec/books?id=k2umv5VR8GUC&pg=PA64&lpg=PA64&dq=Orchideen+ISBN:+978-84-255-1670-2&source=bl&ots=wRa5twTQmk&sig=XNyZXAOEdymJfjcTk\\_q\\_Y1o1vWE&hl=es-419&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIqpPxkeqwyAIViNceCh0oQwIP#v=onepage&q=Orchideen%20ISBN%3A%2](https://books.google.com.ec/books?id=k2umv5VR8GUC&pg=PA64&lpg=PA64&dq=Orchideen+ISBN:+978-84-255-1670-2&source=bl&ots=wRa5twTQmk&sig=XNyZXAOEdymJfjcTk_q_Y1o1vWE&hl=es-419&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIqpPxkeqwyAIViNceCh0oQwIP#v=onepage&q=Orchideen%20ISBN%3A%2)
- Sandoval, J. (1991). *Micropropagacion de Platano Y Banano (musa Aab, Aaa) en El Catie*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Recuperado el 3 de Julio de 2015, de <https://books.google.com.ec/books?id=EiEOAQAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Sardi Barzallo, L. C., & Guzmán Cárdenas, S. V. (2007). *Universidad del Azuay*. Recuperado el 3 de Julio de 2015, de Análisis de la variación de la tasa de germinación y crecimiento de las orquídeas Epidendrum secundum y Oncidium excavatum a través de medios de cultivo convencionales combinados con naturales: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/79/1/06583.pdf>
- Sardi Barzallo, L., & Guzmán Cárdena, S. (2007). Tesis de Biólogo. *Análisis de la variación de la tasa de germinación y crecimiento de las orquídeas Epidendrum secundum y Oncidium excavata a través de medios de cultivo convencionales combinados con naturales*. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay. Recuperado el 30 de Septiembre de 2015, de <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/79/1/06583.pdf>
- Sigma. (1998). *Orquideas y Cultivo*.
- Sosa Rodríguez, F. M., Soto Ortiz, R., Machado Armas, P., & Hernández Pérez, R. (Enero-Marzo de 2008). Propagación in vitro de Heliconia standley Macbride. *Biotecnología Vegetal*, 8(1), 43-45. Recuperado el 28 de Junio de 2015, de <http://132.248.9.34/hevila/Biotecnologiavegetal/2008/vol8/no1/6.pdf>
- Suarez de Castro, F. (1993). *AGRICULTURA, BIOTECNOLOGIA Y PROPIEDAD INTELECTUAL*. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Recuperado el 10 de Junio de 2015, de <https://books.google.com.ec/books?id=yQ7cK8ffTpWC&pg=PA31&dq=cultivo+in+vitro+de+plantas&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMI1MGQstfxgIVRo0NCh1kegFH#v=onepage&q=cultivo%20in%20vitro%20de%20plantas&f=false>
- Suárez Haro, F. E. (19 de Octubre de 2011). *"MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE PIÑA (Ananas comosus L. Merrill) HÍBRIDO MD-2, A PARTIR DE CORTES DE YEMAS LATERALES Y*



- APICALES". Recuperado el 5 de Julio de 2015, de  
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4952/1/T-ESPE-IASA%20I-004581.pdf>
- Valenzuela, L. (1998). Tesis de Licenciatura. *Uso de antibióticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagación in vitro de palama datilera (Phoenix dactylifera L)*. México, México: Universidad Autónoma de Chapingo. Recuperado el 25 de Septiembre de 2015, de  
[www.cm.colpos.mx/2010/images/tesis\\_p/.../tesis\\_evaluacion.pdf](http://www.cm.colpos.mx/2010/images/tesis_p/.../tesis_evaluacion.pdf)
- Vargas , D. (2012). *ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO invitro DE SEMILLAS DE Cattleya violacea*. (U. d. Guayaquil, Ed.) Recuperado el 7 de Octubre de 2015, de  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1671/1/Establecimiento%20de%20un%20protocolo%20para%20el%20cultivo%20in%20vitro%20de%20semillas%20de%20Cattleya%20violacea.%20Vargas,%20Daniela.pdf>
- Vargas Peñafiel, D. A. (2012). Tesis de Biólogo. *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de Cattleya violacea*, 37. Guayaquil, Ecuador: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL. Recuperado el 30 de Septiembre de 2015, de  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1671/1/Establecimiento%20de%20un%20protocolo%20para%20el%20cultivo%20in%20vitro%20de%20semillas%20de%20Cattleya%20violacea.%20Vargas,%20Daniela.pdf>
- Villalobos A., V., & Thorpe, T. (1991). *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados*. Argentina. Recuperado el 20 de Julio de 2015, de  
<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo6.pdf>
- Villena Ochoa, P., & Lala Q., M. E. (2002). Tesis de Ingenieria Agropecuaria. *Desarrollo de Protocormos de Cattleyas maxima en 3 clases de crecimiento utilizando los métodos de Cosper y Murashige y Skoog modificados*. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca .
- Yoneo, S. (1991). Clonal propagation of orchids. *Plant tissue cultures manual C1*, 1-7. Recuperado el 3 de Octubre de 2015



## ANEXOS

### Anexo 1



Laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca-Balzay

Fuente: Las autoras

### Anexo 2

#### Materiales y reactivos

<i>Materiales de campo</i>	<i>Materiales de laboratorio</i>	<i>Equipos</i>	<i>Reactivos</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Etiquetas</b></li><li>• <b>Cinta masking</b></li><li>• <b>Marcadores</b></li><li>• <b>Papel empaque</b></li><li>• <b>Papel film</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pipetas serológicas de 10mL.</li><li>• Matracas de 1000mL</li><li>• 80 Frascos estériles</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cámara de flujo laminar</li><li>• Esterilizador</li><li>• Balanza</li><li>• Autoclave</li><li>• Estufa de gas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agua destilada</li><li>• Alcohol Industrial</li><li>• Alcohol Antiséptico</li><li>• Soluciones madre: A, B, C,</li></ul>



- 
- |   |  |   |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Guantes</b></li><li>• <b>Cofias</b></li><li>• <b>Mascarillas</b></li><li>• <b>Estantes de madera</b></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Probeta de 1000 mL</li><li>• Tubos de ensayo</li><li>• Mecheros de alcohol</li></ul> | <p>D y E</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Solución de Sulfato de magnesio (<math>\text{MgSO}_4</math>)</li><li>• Bacto™ Agar BD (agar-agar)</li><li>• Puré de papa instantáneo Supermaxi</li><li>• Carbón Activado</li><li>• Harina de plátano Banavit</li><li>• Guineo maduro</li></ul> |
|---|--|---|
- 

### Anexo 3

#### Soluciones madre:

SOLUCIÓN A (NITRATOS)	
MEDIO PHYTAMAX (X100) SIGMA	
NUTRIENTES	g/100 mL
$\text{KNO}_3$	9,5
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	8,25
NOTA: Disolver en 100 mL. Usar 10 mL para 1L de medio	

SOLUCIÓN B (SULFATOS)	
MEDIO PHYTAMAX (X100) SIGMA	
NUTRIENTES	g/100 mL



MgSO <sub>4</sub>	1,88
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,169
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,086
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01
NOTA: Disolver en 100 mL. Usar 10 mL para 1L de medio	

SOLUCIÓN C (HALÓGENOS)	
MEDIO PHYTAMAX (X100) SIGMA	
NUTRIENTES	g/100 mL
CaCl <sub>2</sub> anhidro	2,2
KI	~ 0,01(0,0083)
CoCl <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	~ 0,01(0,0005)
NOTA: Disolver en 100 mL. Usar 10 mL para 1L de medio	

SOLUCIÓN D	
MEDIO PHYTAMAX (X100) SIGMA	
NUTRIENTES	g/100 mL
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> monobásico	1,7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	~ 0,01(0,0025)
NOTA: Disolver en 100 mL. Usar 10 mL para 1L de medio	

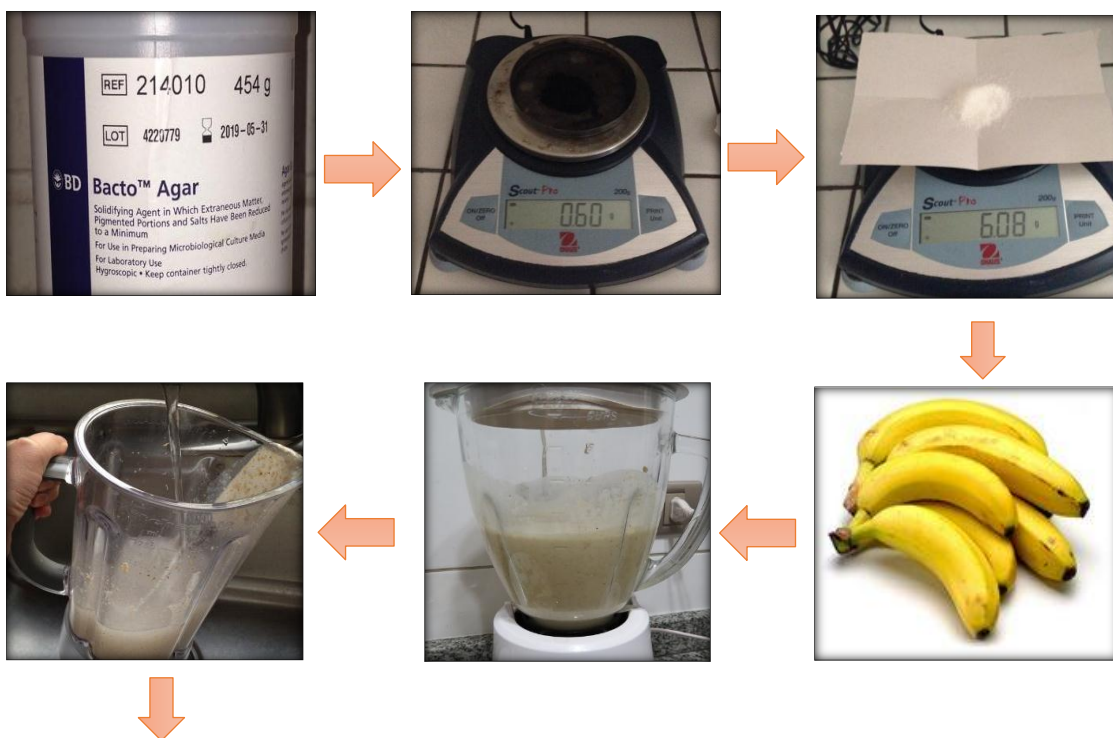
SOLUCIÓN E	
MEDIO PHYTAMAX (X100) SIGMA	
NUTRIENTES	g/100 MI
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,28



$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	~ 0,01(0,0025)
NOTA: Disolver primero el $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ en agua y luego la sal de hierro hasta los 100 mL. Almacenar en un frasco ámbar. Usar 10 mL para 1L de medio	

#### Anexo 4

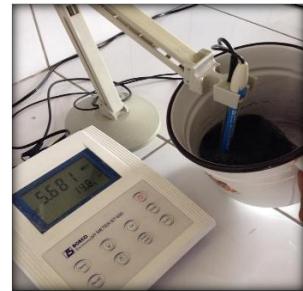
#### Preparación del medio MS modificado







UNIVERSIDAD DE CUENCA

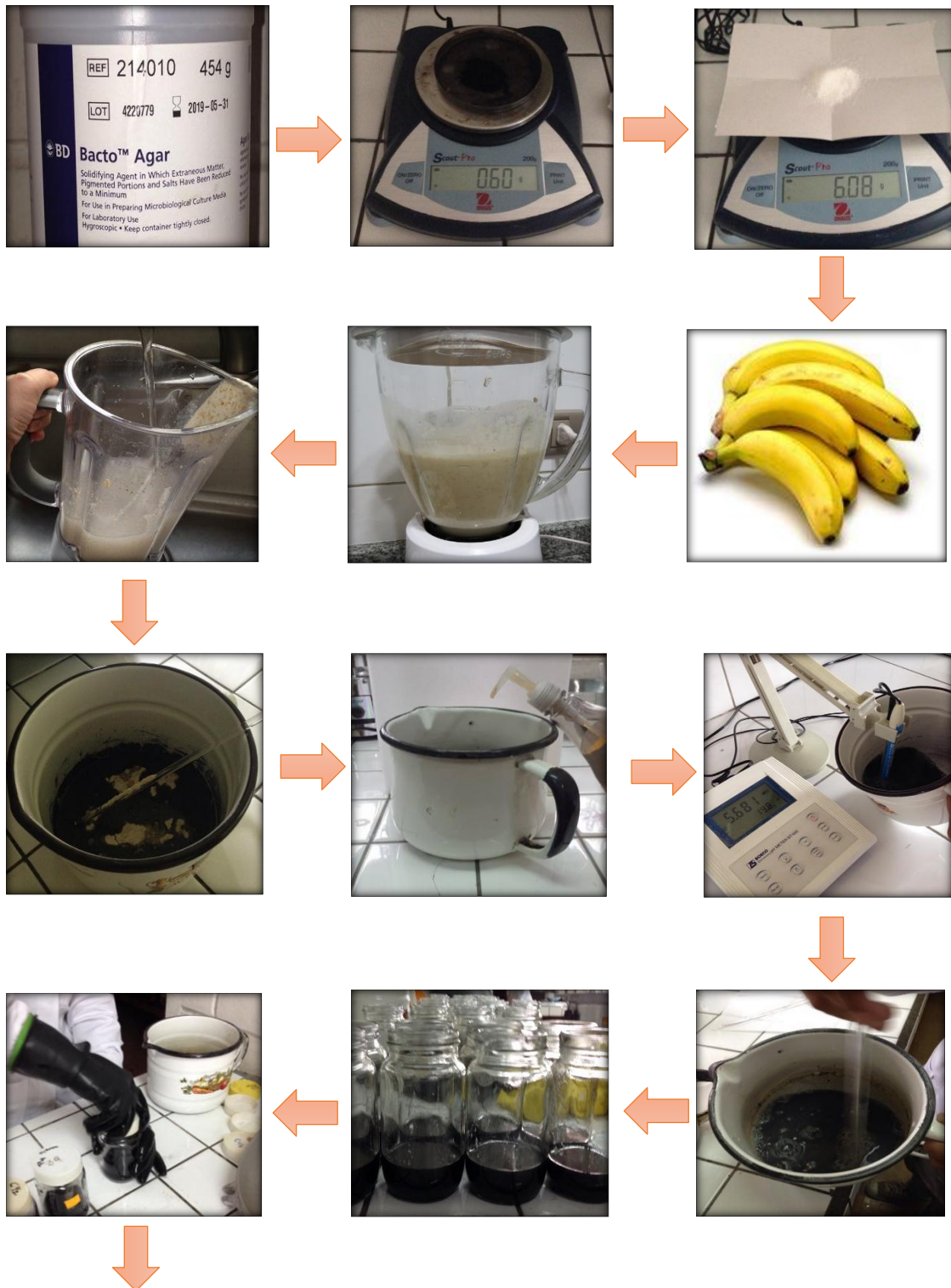


**AUTORAS:** Patricia Supliguicha Guillén  
Sandra Vera Castro



## Anexo 5

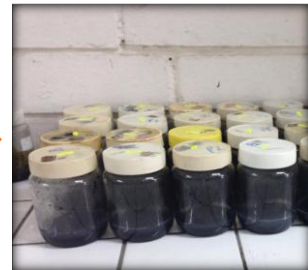
### Preparación del medio de guineo







UNIVERSIDAD DE CUENCA



## Anexo 6

### Preparación del medio de puré de papa



**AUTORAS:** Patricia Supliguicha Guillén  
Sandra Vera Castro



UNIVERSIDAD DE CUENCA



## Anexo 7

### Preparación del medio de harina de plátano verde



**AUTORAS:** Patricia Supliguicha Guillén  
Sandra Vera Castro

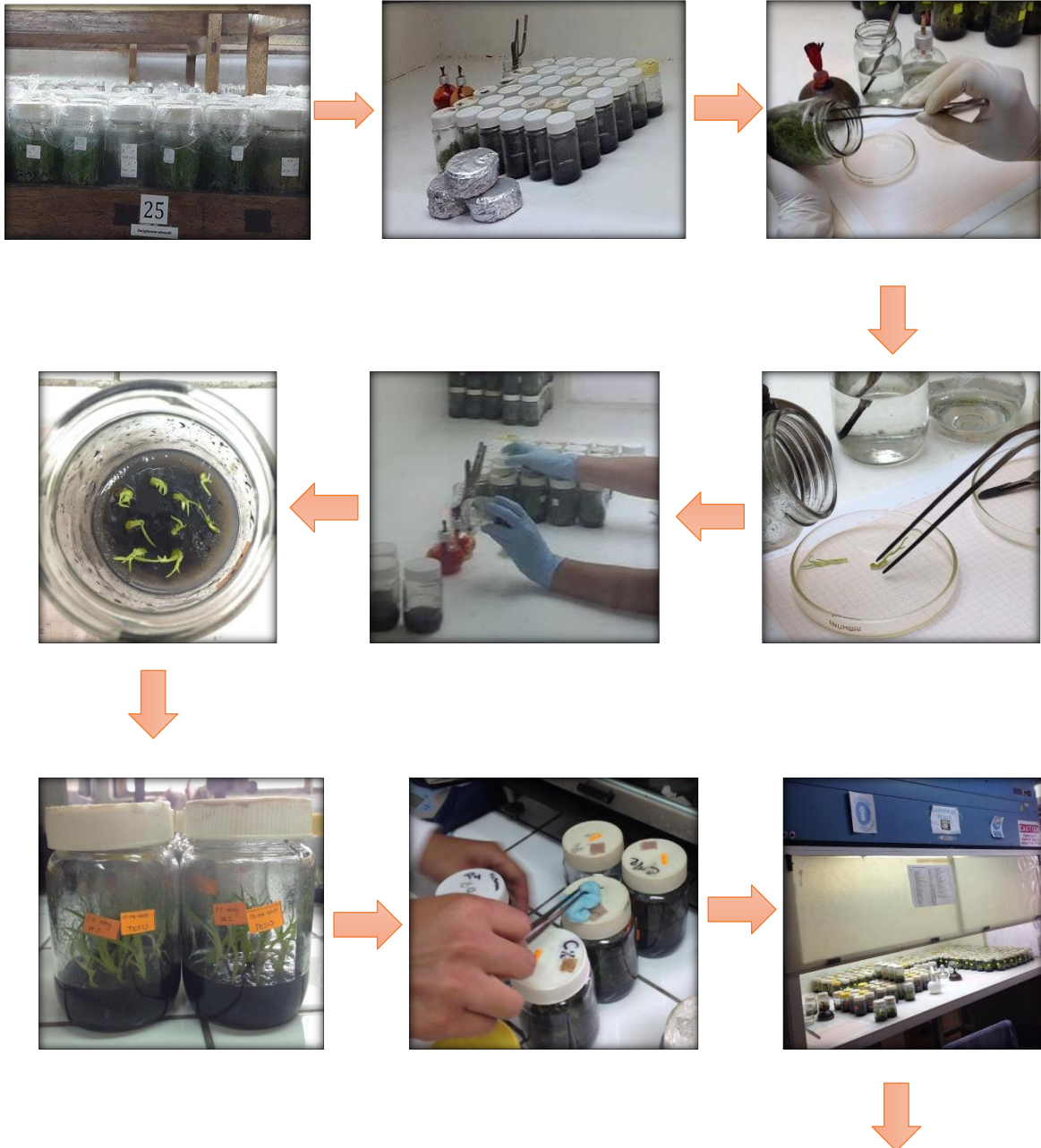






## Anexo 8

### Selección y siembra de las plántulas en los medios de cultivo





## Anexo 9

### Limpieza de la cámara de flujo

- Limpiar todo el interior de la cámara, primero con cloro al 1% seguido de alcohol al 85%.
- Cerrar las puertas de la cámara y prender los UV por 30 minutos; después de transcurrido este tiempo no ingresar al laboratorio por unos minutos.
- Abrir las puertas de la cámara y encender el aire 20 minutos antes de empezar a trabajar.

## Anexo 10

### Aseo de manos para trabajar en la cámara de flujo

- Subir las mangas más arriba de los codos
- Retirar los accesorios o joyas
- Mojar las manos con agua corriente
- Aplicar de 2 a 3 mililitros de jabón líquido
- Friccionar las palmas de las manos, puños, antebrazos.
- Refregar con el cepillo entre los dedos de debajo de las uñas
- Enjuagar con agua corriente de arrastre

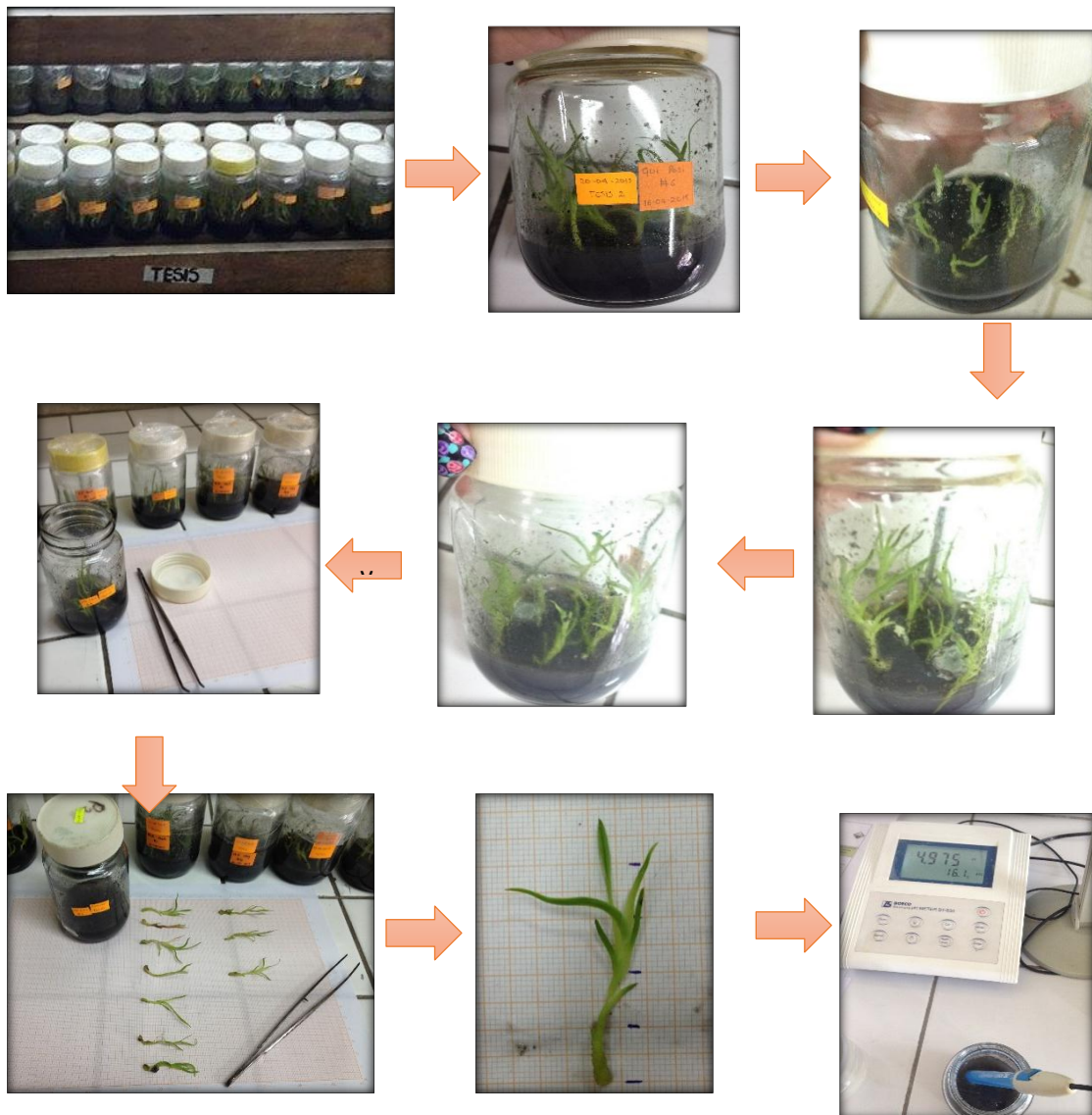


- Aplicar solución de alcohol yodado en las manos y antebrazos
- Aplicar alcohol al 85% y no tener contacto con ninguna superficie

Nota: utilizar guantes en caso de ser necesario

## Anexo 11

Revisión y control de contaminación microbiológica de los medios y posteriormente la medición de las plántulas y el pH del medio





UNIVERSIDAD DE CUENCA

## Anexo 12

### Medición de pH en los medios de cultivo



Fuente: Las Autoras



### Anexo 13

#### Desinfección con sulfato de cobre y sellado con papel film de las tapas



Fuente: Las Autoras

### Anexo 14

#### Manejo del autoclave

1. Se coloca una rejilla volteada
2. Colocar agua hasta cubrir la rejilla
3. Colocar los frascos en la rejilla inferior
4. Colocar otra rejilla y colocar los frascos
5. Tapar la olla tomando en cuenta la flecha en la tapa y en la olla
6. Apretar las mariposas una en frente de la otra
7. Colocar la válvula en 15 PSI
8. Prender la estufa y dejar que suba hasta 5 PSI

**AUTORAS:** Patricia Supliguicha Guillén  
Sandra Vera Castro





9. Destapar la válvula para que salga el aire retenido
10. Volver a poner o bajar la válvula
11. Esperar hasta que llegue a 15 PSI y tomar el tiempo de esterilización.  
Para frascos limpios: 35 minutos y para contaminados 40 min.
12. En este tiempo revisar que la presión no sea mayor a 20 PSI o menor a 15 PSI
13. Apagar y dejar enfriar o hasta que la presión sea cero
14. Abrir la olla y sacar los frascos con guantes de caucho

#### Anexo 15



Cámara de Flujo Laminar

Fuente: Las Autoras



## Anexo 16



Siembra de las plántulas en los diferentes medios

Fuente: Las Autoras

## Anexo 17



Medios de cultivo en cámara de flujo laminar

Fuente: Las Autoras



UNIVERSIDAD DE CUENCA

## Anexo 18



Invernadero del Orquideario de la Universidad de Cuenca

Fuente: Las Autoras



## Anexo 19



Medición de las plántulas de cada medio

Fuente: Las Autoras

## Anexo 20

Resultados de contaminación y sobrevivencia semanales de cada medio, por los tres meses de evaluación.

<b>MEDIO DE MS CON SACAROSA (15/4/15)</b>									
<b>N°</b>	<b>Tamaño de Planta</b>	<b>1ra Semana 21/04/15</b>		<b>2da Semana 27/04/15</b>		<b>3ra Semana 6/05/15</b>		<b>4ta Semana 13/05/15</b>	
	<b>Cm</b>	<b>Cont.</b>	<b>Sobrevi.</b>	<b>Cont.</b>	<b>Sobrevi.</b>	<b>Cont.</b>	<b>Sobrevi.</b>	<b>Cont.</b>	<b>Sobrevi.</b>
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10

**AUTORAS:** Patricia Supliguicha Guillén  
Sandra Vera Castro



4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	9
7	5	X	10	X	10	X	10	X	10
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	
	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	x	10	x	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3,5	X	10	X	10	X	10	X	9
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4								
7	5	X	10	X	10	X	10	X	9
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	
	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3,5								
4	3	X	10	X	10	X	9	X	10
5	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4								
7	5	X	9	X	9	X	9	X	9
8	4	X	10	X	10	X	6	X	6
<b>MEDIO DE MS SIN SACAROSA (15/4/15)</b>									
N°	Tamaño de Planta	1ra Semana 21/04/15		2da Semana 27/04/15		3ra Semana 6/05/15		4ta Semana 13/05/15	
	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	4	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	9	X	9	X	9
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	4	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10



7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	
	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	4	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3								
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	4	X	10	X	10	X	10	X	9
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	
	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	9	X	9
2	4	X	10	X	10	X	9	X	9
3	3								
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	4								
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
<b>MEDIO DE GUINEO CON SACAROSA (13/04/2015)</b>									
N°	Tamaño de Planta	1ra Semana 21/04/15		2da Semana 27/04/15		3ra Semana 6/05/15		4ta Semana 13/05/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	x	10	X	10
2	4	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3	X	10	X	10	X	10	x	10





N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3								
2	4	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3								
2	4								
3	3	X	10	X	10	X	9	X	9
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3	X	10	X	10	X	10	X	10
<b>MEDIO DE GUINEO SIN SACAROSA (Sembrado el 13/04/2015)</b>									
N°	Tamaño de Planta	1ra Semana 21/04/15		2da Semana 27/04/15		3ra Semana 6/05/15		4ta Semana 13/05/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	10	X	10	X	10
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	



Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3								
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	10	X	10	X	9
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4								
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
MEDIO DE HARINA DE PLATANO CON SACAROSA (13/04/2015)									
N°	Tamaño de Planta	1ra Semana 21/04/15		2da Semana 27/04/15		3ra Semana 6/05/15		4ta Semana 13/05/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	5	X	10	X	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	4	X	10	X	10	X	10	X	10
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	
Fr.	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	5								
2	3	X	10	X	10	X	10	X	9





3	4	X	10	X	10	X	10	X	10
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	5								
2	3								
3	4	X	10	X	10	X	10	X	10
4	3	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
7	3	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3,5	X	10	X	10	X	10	X	10
<b>MEDIO DE HARINA DE PLATANO SIN SACAROSA (13/04/2015)</b>									
N°	Tamaño de Planta	1ra Semana 21/04/15		2da Semana 27/04/15		3ra Semana 6/05/15		4ta Semana 13/05/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3	X	10	X	10	X	10	X	8
N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	9	X	9
2	3	X	10	X	10	X	10	X	9
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	8
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10



6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	10	X	10	X	10
8	3								
N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	9	X	6	X	6	X	6
2	3	X	9	X	8	X	8	X	8
3	3	X	10	X	9	X	9	X	8
4	4								
5	3	X	10	X	10	X	10	X	10
6	4	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	9	X	9	X	9
8	3								
<b>MEDIO DE PURÉ DE PAPA CON SACAROSA (15/04/15)</b>									
N°	Tamaño de Planta	1ra Semana 21/04/15		2da Semana 27/04/15		3ra Semana 6/05/15		4ta Semana 13/05/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	4	X	10	X	10	X	10	X	10
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	5	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	4	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	10	X	10	X	10
8	5	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	4								
2	3	X	10	X	10	X	10	X	10
3	5	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	4	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	10	X	10	X	10
8	5	X	10	X	10	X	10	X	10



N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	
Fr.	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	4								
2	3								
3	5	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	9	X	9
5	4	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3	X	10	X	10	X	10	X	10
7	4	X	10	X	10	X	10	X	10
8	5	X	9	X	9	X	9	X	9
<b>MEDIO DE PURÉ DE PAPA SIN SACAROSA (15/04/15)</b>									
N°	Tamaño de Planta	1ra Semana 21/04/15		2da Semana 27/04/15		3ra Semana 6/05/15		4ta Semana 13/05/15	
	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3	X	10	X	10	X	10	X	10
2	5	X	10	X	10	X	10	X	10
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	5	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3	X	10	X	10	X	10	X	10
7	5	X	10	X	10	X	10	X	10
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	5ta Semana 20/05/15		6ta Semana 27/05/15		7ma Semana 03/06/15		8va Semana 10/06/15	
	Cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3								
2	5	X	10	X	10	X	10	X	9
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	10	X	10
5	5	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3	X	10	X	10	X	10	X	10
7	5	X	10	X	10	X	10	X	10
8	4	X	10	X	10	X	10	X	10
N°	Tamaño de Planta	9na Semana 17/06/2015		10ma Semana 24/06/15		11ra Semana 1/07/15		12da Semana 08/07/15	



	cm	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.	Cont.	Sobrevi.
1	3								
2	5								
3	3	X	10	X	10	X	10	X	10
4	4	X	10	X	10	X	9	X	9
5	5	X	10	X	10	X	10	X	10
6	3	X	10	X	10	X	10	X	10
7	5	X	10	X	10	X	8	X	8
8	4	X	10	X	10	X	9	X	9

## ANEXO 21

Datos de las mediciones de las plántulas y pH de los diferentes medios durante los tres meses de evaluación.

MS con Sacarosa				
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (4cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (3,5cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (5cm)
	N° FRASCO: 6	N° FRASCO: 3	N° FRASCO: 1	N° FRASCO: 7
1	4,3	4,5	4,1	6,5
2	4,8	4,6	4,2	6,2
3	4,6	4	4,3	5
4	4,8	6	3,8	6,5
5	4,3	4,7	4,5	5,8
6	4,4	4,5	4,1	5,3
7	4,8	5,3	4	5,2
8	4,5	5,5	3,8	6,2
9	4,2	4,2	3,6	5,9
10	-	-	3,7	-
Ph	5,15	5	5,09	4,78
MS sin Sacarosa				
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)



	N° FRASCO: 3	N° FRASCO: 5	N° FRASCO: 7	N° FRASCO: 4
1	3,1	4,7	3,8	4,1
2	3,1	4,8	3,9	3,6
3	3,5	4,6	4,4	3,7
4	3,4	4,5	5,1	4
5	3,3	4,5	4,4	4,1
6	3,2	5,3	5,5	3,7
7	3	5,4	4	5
8	3,6	5,2	5,5	4,1
9	3,2	4,3	4,4	4,2
10	-	-	3,5	4,2
pH	5,04	4,7	4,85	4,82
Guineo con Sacarosa				
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3 cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)
	N° FRASCO: 1	N° FRASCO: 2	N° FRASCO: 3	N° FRASCO: 4
1	3,3	5,3	4	4,7
2	3,4	5	3,2	4,3
3	3,4	5,2	3,4	4,8
4	3,4	5,1	3,8	4,4
5	3,3	6	3	4,3
6	3,7	5,3	3	4,3
7	3,4	5	3,5	4
8	3,5	4,9	3,7	4,1
9	3,3	5,2	4,2	4,8
10	3,2	5	-	4
pH	5	4,96	4,82	4,82
Guineo sin Sacarosa				
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)
	N° FRASCO: 1	N° FRASCO: 7	N° FRASCO: 2	N° FRASCO: 3
1	3,5	5	3	5,2



2	3,4	5,2	3,2	3,5
3	3,3	5	3,5	4
4	3,3	4	4	4,2
5	3,5	5	4,1	4,1
6	3,4	5,2	4,3	4,5
7	3,3	5,3	3,7	3
8	3,6	5	4,3	3,5
9	3,7	4,9	5	3
10	3,6	-	5,5	3
<b>pH</b>	<b>5,1</b>	<b>4,7</b>	<b>4,9</b>	<b>4,87</b>

**Harina de Plátano con Sacarosa**

PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (5cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)
	N° FRASCO: 1	N° FRASCO: 2	N° FRASCO: 3	N° FRASCO: 4
1	5,4	3,5	5,6	6
2	6	4	5,8	4
3	5,4	5,6	4,9	5
4	5,5	5,5	5,4	4,3
5	5,4	3,6	4,6	5
6	5,2	3,3	6,5	5,5
7	5,3	4,5	5	5,2
8	5,3	4,5	5,2	4,8
9	5,7	3,6	5,1	5
10	5,4	-	-	5
<b>pH</b>	<b>5,2</b>	<b>5</b>	<b>5,08</b>	<b>5,04</b>

**Harina de Plátano sin Sacarosa**

PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)
	N° FRASCO: 8	N° FRASCO: 4	N° FRASCO: 5	N° FRASCO: 6
1	3,4	4,6	3,2	4,2
2	3,4	4,6	3,5	4,5
3	3,5	5	3,5	4
4	3,6	5,2	3,6	4,1



5	3,1	5	3,7	4,2
6	3,2	4,8	4	4
7	3,3	6,6	3,6	4,1
8	3,6	4,2	4	4,1
9	-	-	3,7	4,2
10	-	-	3,6	4
<b>pH</b>	5,6	5,5	5,83	5,57
<b>Puré de Papa con Sacarosa</b>				
<b>PLÁNTULAS</b>	<b>PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (4cm)</b>	<b>SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (3cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (5cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)</b>
<b>N°</b>	<b>N° FRASCO: 1</b>	<b>N° FRASCO: 2</b>	<b>N° FRASCO: 3</b>	<b>N° FRASCO: 4</b>
1	4,6	4,8	6,2	5,3
2	4,8	4,3	6,2	6,5
3	4,8	4	6,6	5
4	4,6	4,2	6	5
5	4,9	3,5	6,2	6
6	5	4	6,7	5,2
7	4,7	3,3	6,5	4,9
8	4,2	3,5	6,5	4,8
9	4,8	3,6	6,1	4,4
10	4,9	4,8	7,3	-
<b>pH</b>	5,46	5,2	5,1	5
<b>Puré de Papa sin Sacarosa</b>				
<b>PLÁNTULAS</b>	<b>PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)</b>	<b>SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (5cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (5cm)</b>
<b>N°</b>	<b>N° FRASCO: 1</b>	<b>N° FRASCO: 2</b>	<b>N° FRASCO: 8</b>	<b>N° FRASCO: 5</b>
1	3,8	6,1	5,2	6
2	3,6	5,9	4,8	5,9
3	3,5	5,6	4,7	5,3
4	3,6	5,4	4	5,2
5	3,8	5,8	4	5,5
6	3,5	5,7	4,6	6
7	3,5	6	4,7	5,5



8	4	6,1	4	5,3
9	4	5,7	4,3	5,5
10	3,5	-	-	5,6
<b>pH</b>	5,73	6	5,89	5,74

**ANEXO 22**

**Resultados de los incrementos de cada plántula en los diferentes medios y el promedio del incremento del tercer mes, ya que se realizó la medición de dos frascos.**

<b>MS CON SACAROSA</b>					
<b>PLÁNTULAS N°</b>	<b>PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (4cm)</b>	<b>SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (3,5cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (5cm)</b>	<b>PROMEDIO DEL TERCER MES</b>
	<b>N° FRASCO: 6</b>	<b>N° FRASCO: 3</b>	<b>N° FRASCO: 1</b>	<b>N° FRASCO: 7</b>	
1	0,3	1	1,1	1,5	1,3
2	0,8	1,1	1,2	1,2	1,2
3	0,6	0,5	1,3	0	0,65
4	0,8	2,5	0,8	1,5	1,15
5	0,3	1,2	1,5	0,8	1,15
6	0,4	1	1,1	0,3	0,7
7	0,8	1,8	1	0,2	0,6
8	0,5	2	0,8	1,2	1
9	0,2	0,7	0,6	0,9	0,75
10			0,7		0,7
<b>MS SIN SACAROSA</b>					
<b>PLÁNTULAS N°</b>	<b>PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)</b>	<b>SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)</b>	<b>TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)</b>	<b>PROMEDIO DEL TERCER MES</b>
	<b>N° FRASCO: 3</b>	<b>N° FRASCO: 5</b>	<b>N° FRASCO: 7</b>	<b>N° FRASCO: 4</b>	
1	0,1	0,7	0,8	1,1	0,95
2	0,1	0,8	0,9	0,6	0,75
3	0,5	0,6	1,4	0,7	1,05
4	0,4	0,5	2,1	1	1,55
5	0,3	0,5	1,4	1,1	1,25





6	0,2	1,3	2,5	0,7	1,6
7	0	1,4	1	2	1,5
8	0,6	1,2	2,5	1,1	1,8
9	0,2	0,3	1,4	1,2	1,3
10			0,5	1,2	0,85
<b>GUINEO CON SACAROSA</b>					
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3 cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)	PROMEDIO DEL TERCER MES
	N° FRASCO: <b>1</b>	N° FRASCO: <b>2</b>	N° FRASCO: <b>3</b>	N° FRASCO: <b>4</b>	
1	0,3	1,3	1	0,7	0,85
2	0,4	1	0,2	0,3	0,25
3	0,4	1,2	0,4	0,8	0,6
4	0,4	1,1	0,8	0,4	0,6
5	0,3	2	0	0,3	0,15
6	0,7	1,3	0	0,3	0,15
7	0,4	1	0,5	0	0,25
8	0,5	0,9	0,7	0,1	0,4
9	0,3	1,2	1,2	0,8	1
10	0,2	1			
<b>GUINEO SIN SACAROSA</b>					
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	PROMEDIO DEL TERCER MES
	N° FRASCO: <b>1</b>	N° FRASCO: <b>7</b>	N° FRASCO: <b>2</b>	N° FRASCO: <b>3</b>	
1	0,5	1	0	2,2	1,1
2	0,4	1,2	0,2	0,5	0,35
3	0,3	1	0,5	1	0,75
4	0,3	0	1	1,2	1,1
5	0,5	1	1,1	1,1	1,1
6	0,4	1,2	1,3	1,5	1,4
7	0,3	1,3	0,7	0	0,35
8	0,6	1	1,3	0,5	0,9
9	0,7	0,9	2	0	1
10	0,6		2,5		1,25



HARINA DE PLÁTANO CON SACAROSA					
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (5cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	PROMEDIO DEL TERCER MES
	N° FRASCO: 1	N° FRASCO: 2	N° FRASCO: 3	N° FRASCO: 4	
1	0,4	0,5	1,6	3	2,3
2	1	1	1,8	1	1,4
3	0,4	2,6	0,9	2	1,45
4	0,5	2,5	1,4	1,3	1,35
5	0,4	0,6	0,6	2	1,3
6	0,2	0,3	2,5	2,5	2,5
7	0,3	1,5	1	2,2	1,6
8	0,3	1,5	1,2	1,8	1,5
9	0,7	0,6	1,1	2	1,55
10	0,4			2	1
HARINA DE PLÁTANO SIN SACAROSA					
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)	PROMEDIO DEL TERCER MES
	N° FRASCO: 8	N° FRASCO: 4	N° FRASCO: 5	N° FRASCO: 6	
1	0,4	0,6	0,2	0,2	0,2
2	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5
3	0,5	1	0,5	0	0,25
4	0,6	1,2	0,6	0,1	0,35
5	0,1	1	0,7	0,2	0,45
6	0,2	0,8	1	0	0,5
7	0,3	2,6	0,6	0,1	0,35
8	0,6	0,2	1	0,1	0,55
9			0,7	0,2	0,45
10			0,6	0	0,6
PURÉ DE PAPA CON SACAROSA					
PLÁNTULAS N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (4cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (3cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (5cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)	PROMEDIO DEL TERCER MES



	N° FRASCO: <b>1</b>	N° FRASCO: <b>2</b>	N° FRASCO: <b>3</b>	N° FRASCO: <b>4</b>	
1	0,6	1,8	1,2	1,3	1,25
2	0,8	1,3	1,2	2,5	1,85
3	0,8	1	1,6	1	1,3
4	0,6	1,2	1	1	1
5	0,9	0,5	1,2	2	1,6
6	1	1	1,7	1,2	1,45
7	0,7	0,3	1,5	0,9	1,2
8	0,2	0,5	1,5	0,8	1,15
9	0,8	0,6	1,1	0,4	0,75
10	0,9	1,8	2,3		1,15
<b>PURÉ DE PAPA SIN SACAROSA</b>					
PLÁNTULAS  N°	PRIMERA MEDICIÓN 13/05/2015 (3cm)	SEGUNDA MEDICIÓN 10/06/2015 (5cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (4cm)	TERCERA MEDICIÓN 15/07/2015 (5cm)	PROMEDIO DEL TERCER MES
	N° FRASCO: <b>1</b>	N° FRASCO: <b>2</b>	N° FRASCO: <b>8</b>	N° FRASCO: <b>5</b>	
1	0,8	1,1	1,2	1	1,1
2	0,6	0,9	0,8	0,9	0,85
3	0,5	0,6	0,7	0,3	0,5
4	0,6	0,4	0	0,2	0,1
5	0,8	0,8	0	0,5	0,25
6	0,5	0,7	0,6	1	0,8
7	0,5	1	0,7	0,5	0,6
8	1	1,1	0	0,3	0,15
9	1	0,7	0,3	0,5	0,4
10	0,5			0,6	0,3



## ANEXO 23

Promedio de los incrementos y la suma de los diferentes medios.

MESES	MS +	MS -	GUINEO +	GUINEO -	HP +	HP -	PURÉ +	PURÉ -
Mayo	0,5	0,3	0,4	0,5	0,5	0,4	0,7	0,7
Junio	1,3	0,8	1,2	1,0	1,2	1,0	1,0	0,8
Julio	0,9	1,3	0,4	0,9	1,6	0,4	1,3	0,5
Incremento total	2,8	2,3	2,0	2,4	3,3	1,8	3,0	2,0

## ANEXO 24

Prueba de Sheffé de comparaciones múltiples con los incrementos de todas las plántulas durante los tres meses de estudio.

Comparaciones múltiples							
Scheffe							
Variable dependiente	(I) MEDIOS	(J) MEDIOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
MES1	1	2	0,25556	0,09356	0,395	-0,1072	0,6183
		3	0,13222	0,09119	0,951	-0,2213	0,4858
		4	0,06222	0,09119	1	-0,2913	0,4158
		5	0,06222	0,09119	1	-0,2913	0,4158
		6	0,13472	0,09643	0,966	-0,2392	0,5086
		7	-0,20778	0,09119	0,637	-0,5613	0,1458
		8	-0,15778	0,09119	0,882	-0,5113	0,1958
	2	1	-0,25556	0,09356	0,395	-0,6183	0,1072
		3	-0,12333	0,09119	0,967	-0,4769	0,2302
		4	-0,19333	0,09119	0,719	-0,5469	0,1602



		5	-0,19333	0,09119	0,7 19	-0,5469	0,1602
		6	-0,12083	0,09643	0,9 78	-0,4947	0,2531
		7	-,46333*	0,09119	0,0 02	-0,8169	-0,1098
		8	-,41333*	0,09119	0,0 1	-0,7669	-0,0598
	3	1	-0,13222	0,09119	0,9 51	-0,4858	0,2213
		2	0,12333	0,09119	0,9 67	-0,2302	0,4769
		4	-0,07	0,08875	0,9 99	-0,4141	0,2741
		5	-0,07	0,08875	0,9 99	-0,4141	0,2741
		6	0,0025	0,09414	1	-0,3625	0,3675
		7	-0,34	0,08875	0,0 56	-0,6841	0,0041
		8	-0,29	0,08875	0,1 74	-0,6341	0,0541
	4	1	-0,06222	0,09119	1	-0,4158	0,2913
		2	0,19333	0,09119	0,7 19	-0,1602	0,5469
		3	0,07	0,08875	0,9 99	-0,2741	0,4141
		5	0	0,08875	1	-0,3441	0,3441
		6	0,0725	0,09414	0,9 99	-0,2925	0,4375
		7	-0,27	0,08875	0,2 53	-0,6141	0,0741
		8	-0,22	0,08875	0,5 29	-0,5641	0,1241
	5	1	-0,06222	0,09119	1	-0,4158	0,2913
		2	0,19333	0,09119	0,7 19	-0,1602	0,5469
		3	0,07	0,08875	0,9 99	-0,2741	0,4141
		4	0	0,08875	1	-0,3441	0,3441
		6	0,0725	0,09414	0,9 99	-0,2925	0,4375
		7	-0,27	0,08875	0,2 53	-0,6141	0,0741
		8	-0,22	0,08875	0,5 29	-0,5641	0,1241
	6	1	-0,13472	0,09643	0,9	-0,5086	0,2392



					6		
		2	0,12083	0,09643	0,978	-0,2531	0,4947
		3	-0,0025	0,09414	1	-0,3675	0,3625
		4	-0,0725	0,09414	0,999	-0,4375	0,2925
		5	-0,0725	0,09414	0,999	-0,4375	0,2925
		7	-0,3425	0,09414	0,084	-0,7075	0,0225
		8	-0,2925	0,09414	0,228	-0,6575	0,0725
	7	1	0,20778	0,09119	0,637	-0,1458	0,5613
		2	,46333*	0,09119	0,002	0,1098	0,8169
		3	0,34	0,08875	0,056	-0,0041	0,6841
		4	0,27	0,08875	0,253	-0,0741	0,6141
		5	0,27	0,08875	0,253	-0,0741	0,6141
		6	0,3425	0,09414	0,084	-0,0225	0,7075
		8	0,05	0,08875	1	-0,2941	0,3941
	8	1	0,15778	0,09119	0,882	-0,1958	0,5113
		2	,41333*	0,09119	0,001	0,0598	0,7669
		3	0,29	0,08875	0,174	-0,0541	0,6341
		4	0,22	0,08875	0,529	-0,1241	0,5641
		5	0,22	0,08875	0,529	-0,1241	0,5641
		6	0,2925	0,09414	0,228	-0,0725	0,6575
		7	-0,05	0,08875	1	-0,3941	0,2941
MES2	1	2	0,5	0,25613	0,798	-0,4946	1,4946
		3	0,11111	0,24965	1	-0,8583	1,0805
		4	0,35556	0,25613	0,961	-0,639	1,3501
		5	0,07778	0,25613	1	-0,9168	1,0724
		6	0,31111	0,26401	0,985	-0,7141	1,3363



		7	0,31111	0,24965	0,979	-0,6583	1,2805
		8	0,5	0,25613	0,798	-0,4946	1,4946
	2	1	-0,5	0,25613	0,798	-1,4946	0,4946
		3	-0,38889	0,24965	0,929	-1,3583	0,5805
		4	-0,14444	0,25613	1	-1,139	0,8501
		5	-0,42222	0,25613	0,906	-1,4168	0,5724
		6	-0,18889	0,26401	0,999	-1,2141	0,8363
		7	-0,18889	0,24965	0,999	-1,1583	0,7805
		8	0	0,25613	1	-0,9946	0,9946
	3	1	-0,11111	0,24965	1	-1,0805	0,8583
		2	0,38889	0,24965	0,929	-0,5805	1,3583
		4	0,24444	0,24965	0,995	-0,725	1,2138
		5	-0,03333	0,24965	1	-1,0027	0,9361
		6	0,2	0,25773	0,999	-0,8008	1,2008
		7	0,2	0,24299	0,998	-0,7435	1,1435
		8	0,38889	0,24965	0,929	-0,5805	1,3583
	4	1	-0,35556	0,25613	0,961	-1,3501	0,639
		2	0,14444	0,25613	1	-0,8501	1,139
		3	-0,24444	0,24965	0,995	-1,2138	0,725
		5	-0,27778	0,25613	0,991	-1,2724	0,7168
		6	-0,04444	0,26401	1	-1,0696	0,9808
		7	-0,04444	0,24965	1	-1,0138	0,925
		8	0,14444	0,25613	1	-0,8501	1,139
	5	1	-0,07778	0,25613	1	-1,0724	0,9168
		2	0,42222	0,25613	0,906	-0,5724	1,4168
		3	0,03333	0,24965	1	-0,9361	1,0027
		4	0,27778	0,25613	0,991	-0,7168	1,2724
		6	0,23333	0,26401	0,9	-0,7919	1,2585



					97		
		7	0,23333	0,24965	0,9 96	-0,7361	1,2027
		8	0,42222	0,25613	0,9 06	-0,5724	1,4168
	6	1	-0,31111	0,26401	0,9 85	-1,3363	0,7141
		2	0,18889	0,26401	0,9 99	-0,8363	1,2141
		3	-0,2	0,25773	0,9 99	-1,2008	0,8008
		4	0,04444	0,26401	1	-0,9808	1,0696
		5	-0,23333	0,26401	0,9 97	-1,2585	0,7919
		7	0	0,25773	1	-1,0008	1,0008
		8	0,18889	0,26401	0,9 99	-0,8363	1,2141
	7	1	-0,31111	0,24965	0,9 79	-1,2805	0,6583
		2	0,18889	0,24965	0,9 99	-0,7805	1,1583
		3	-0,2	0,24299	0,9 98	-1,1435	0,7435
		4	0,04444	0,24965	1	-0,925	1,0138
		5	-0,23333	0,24965	0,9 96	-1,2027	0,7361
		6	0	0,25773	1	-1,0008	1,0008
		8	0,18889	0,24965	0,9 99	-0,7805	1,1583
	8	1	-0,5	0,25613	0,7 98	-1,4946	0,4946
		2	0	0,25613	1	-0,9946	0,9946
		3	-0,38889	0,24965	0,9 29	-1,3583	0,5805
		4	-0,14444	0,25613	1	-1,139	0,8501
		5	-0,42222	0,25613	0,9 06	-1,4168	0,5724
		6	-0,18889	0,26401	0,9 99	-1,2141	0,8363
		7	-0,18889	0,24965	0,9 99	-1,1583	0,7805
MES3	1	2	-0,34	0,14612	0,6 11	-0,9055	0,2255
		3	0,495	0,14612	0,1 38	-0,0705	1,0605





		4	-0,01	0,14612	1	-0,5755	0,5555
		5	-,67500*	0,14612	0,0 07	-1,2405	-0,1095
		6	0,53	0,14612	0,0 85	-0,0355	1,0955
		7	-0,35	0,14612	0,5 74	-0,9155	0,2155
		8	0,415	0,14612	0,3 41	-0,1505	0,9805
	2	1	0,34	0,14612	0,6 11	-0,2255	0,9055
		3	,83500*	0,14612	0	0,2695	1,4005
		4	0,33	0,14612	0,6 48	-0,2355	0,8955
		5	-0,335	0,14612	0,6 3	-0,9005	0,2305
		6	,87000*	0,14612	0	0,3045	1,4355
		7	-0,01	0,14612	1	-0,5755	0,5555
		8	,75500*	0,14612	0,0 01	0,1895	1,3205
	3	1	-0,495	0,14612	0,1 38	-1,0605	0,0705
		2	-,83500*	0,14612	0	-1,4005	-0,2695
		4	-0,505	0,14612	0,1 21	-1,0705	0,0605
		5	-1,17000*	0,14612	0	-1,7355	-0,6045
		6	0,035	0,14612	1	-0,5305	0,6005
		7	-,84500*	0,14612	0	-1,4105	-0,2795
		8	-0,08	0,14612	1	-0,6455	0,4855
	4	1	0,01	0,14612	1	-0,5555	0,5755
		2	-0,33	0,14612	0,6 48	-0,8955	0,2355
		3	0,505	0,14612	0,1 21	-0,0605	1,0705
		5	-,66500*	0,14612	0,0 09	-1,2305	-0,0995
		6	0,54	0,14612	0,0 74	-0,0255	1,1055
		7	-0,34	0,14612	0,6 11	-0,9055	0,2255
		8	0,425	0,14612	0,3 09	-0,1405	0,9905
	5	1	,67500*	0,14612	0,0 07	0,1095	1,2405
		2	0,335	0,14612	0,6	-0,2305	0,9005



					3		
		3	1,17000*	0,14612	0	0,6045	1,7355
		4	,66500*	0,14612	0,0 09	0,0995	1,2305
		6	1,20500*	0,14612	0	0,6395	1,7705
		7	0,325	0,14612	0,6 66	-0,2405	0,8905
		8	1,09000*	0,14612	0	0,5245	1,6555
	6	1	-0,53	0,14612	0,0 85	-1,0955	0,0355
		2	-,87000*	0,14612	0	-1,4355	-0,3045
		3	-0,035	0,14612	1	-0,6005	0,5305
		4	-0,54	0,14612	0,0 74	-1,1055	0,0255
		5	-1,20500*	0,14612	0	-1,7705	-0,6395
		7	-,88000*	0,14612	0	-1,4455	-0,3145
		8	-0,115	0,14612	0,9 99	-0,6805	0,4505
	7	1	0,35	0,14612	0,5 74	-0,2155	0,9155
		2	0,01	0,14612	1	-0,5555	0,5755
		3	,84500*	0,14612	0	0,2795	1,4105
		4	0,34	0,14612	0,6 11	-0,2255	0,9055
		5	-0,325	0,14612	0,6 66	-0,8905	0,2405
		6	,88000*	0,14612	0	0,3145	1,4455
		8	,76500*	0,14612	0,0 01	0,1995	1,3305
	8	1	-0,415	0,14612	0,3 41	-0,9805	0,1505
		2	-,75500*	0,14612	0,0 01	-1,3205	-0,1895
		3	0,08	0,14612	1	-0,4855	0,6455
		4	-0,425	0,14612	0,3 09	-0,9905	0,1405
		5	-1,09000*	0,14612	0	-1,6555	-0,5245
		6	0,115	0,14612	0,9 99	-0,4505	0,6805
		7	-,76500*	0,14612	0,0 01	-1,3305	-0,1995
* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.							



UNIVERSIDAD DE CUENCA