



RESUMEN:

TÍTULO: “EVALUACION DE DIFERENTES DOSIS DE AUXINAS (ANA - IBA) Y CITOQUININA (BA) PARA EL DESARROLLO DE MERISTEMOS EN *Maxillaria grandis* Rchb.f.”.

Por la gran importancia económica, medicinal, y de endemismos de las orquídeas ecuatorianas nos vemos en la obligación de realizar estudios referentes a salvaguardar especies en vía de extinción como *Maxillaria grandis*, además evitar la trasmisión de patógenos como los virus que eliminan por completo al cultivo y por ende la producción de la flor cortada. La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Y tuvo como finalidad desarrollar meristemas a nivel in vitro, con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en la especie de *Maxillaria grandis*, así como determinar el comportamiento y variaciones que estos pudieron tener. Para obtener los resultados planteados se procedió a la recopilación y clasificación de información y determinar las características de la especie en estudio. Para determinar los resultados de las dosis de AUXINAS (IBA y ANA) y CITOQUININA (BA) se utilizó un diseño de arreglo factorial de 4x4 con 6 repeticiones del cual se obtuvo el 100% de sobrevivencia de meristemas para el tratamiento 9 (ANA0 – IBA0; BA 0.50) en un medio de cultivo de Phytamax al 33.3 % siendo este el recomendable para el desarrollo de los meristemas. Los meristemas tuvieron un comportamiento heterogéneo en las primeras etapas, sin embargo al término de su evaluación a los 90 días se



determino claramente el desarrollo, que se verifico de acuerdo a una escala de colores impuesto.

Palabras claves: Meristemos, Cultivo *in vitro*, Dosificación de Auxinas y Citoquininas. Cultivo de tejidos. *Maxillaria grandis*.

ÍNDICE

I. Introducción	9
II. Objetivos e Hipótesis	13
2.1. Objetivo general.	13
2.2. Objetivos específicos.	13
2.3. Hipótesis.	13
III. Revisión de literatura.	15
3.1. Perspectiva histórica de las orquídeas.	15
3.2. Importancia económica	18
3.3. Distribución y diversidad	19
3.3.1. Ecología y hábitat	21
3.3.2. Patrones generales de endemismo de las orquídeas ecuatorianas.	24
3.4. Estructura botánica del género maxillaria.	27
3.4.1. Clasificación botánica.	27
3.5. Tipos de crecimientos de las orquídeas.	30



3.5.1. Crecimiento simpodial	30
3.5.2. Crecimiento monopodial.	30
3.6. Morfología de Maxillaria sanderiana o Maxillaria grandis	31
3.6.1. Raíz.	31
3.6.2. Los rizomas y pseudobulbos.	31
3.6.3. Hojas.	32
3.6.4. Flor.	33
3.6.5. Frutos	42
3.6.6. Semillas.	48
3.7. Conservación de orquídeas	53
3.7.1. In situ	53
3.7.2. Ex situ	54
3.8. Reseña histórica del cultivo de tejidos	55
3.8.1. Infraestructura adecuada para la micropropagación	59
3.9. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	67
3.9.1. Importancia del cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	69
3.9.2. Tipos de cultivos <i>in vitro</i>	70
3.9.3. Cultivo de meristemos	73
a. El meristemo.	73
b. División dentro de los meristemos	74



c. Zonas de segmentación del meristemo	75
3.10. Sanidad	76
3.10.1. Los Virus	77
3.10.2. La termoterapia o tratamiento térmico	78
3.10.3. La quimioterapia	79
3.11. Técnicas del cultivo in vitro	80
3.11.1. Determinaciones	80
3.12. Vitrificación o Hiperhidridicidad	86
3.12.1. Consistencia del medio productora de vitrificación	88
3.12.2. Sistema de doble fase	89
3.12.3. Concentración y tipos de reguladores de crecimiento	89
3.12.4. Humedad	90
3.12.5. Recipientes	91
3.13. Asepsia y esterilización del material vegetal	92
3.14. Medio de cultivo.	94
3.14.1. Tipos de medio de cultivos	96
a) Medio sólido	96
b) Semi-líquido	96
c) Líquido	96
3.14.2. Medios definidos	97



3.14.3. Medios indefinidos.	99
3.14.4. Componentes del medio de cultivo.	100
a) Macro-elementos	101
b) Micro-elementos	104
c) Compuestos orgánicos	107
d) Reguladores de Crecimiento	109
3.14.5. Proceso para la realización del medio de cultivo.	114
3.14.6. Técnica para la preparación del medio de cultivo.	114
3.14.7. Condiciones físicas del medio de cultivo.	115
a) El pH	115
b) Conductividad eléctrica	116
3.14.8. Esterilización del Medio.	117
IV. Materiales y métodos.	118
4.1. Ubicación del lugar de la investigación.	118
4.2. Características de los laboratorios.	118
4.2.1. Primer laboratorio.	119
4.2.2. Segundo laboratorio.	121
4.2.3. Tercer laboratorio.	121
4.3. Materiales y equipos del laboratorio para la realización de la investigación.	122
4.3.1. Materiales biológicos.	122



4.3.2. Materiales químicos.	122
4.3.3. Materiales físicos.	123
4.3.4. Herramientas.	124
4.3.5. Materiales.	124
4.4. Métodos.	125
4.4.1. Material experimental.	125
4.5. Factores en estudio.	127
4.5.1. Tratamientos estudiados.	127
4.5.2. Diseño experimental.	131
4.5.3. Características de la unidad experimental.	132
4.5.4. Esquema del análisis Estadístico.	132
4.5.5. Prueba de Significación.	133
4.5.6. Manejo de la investigación	133
4.5.7. Técnicas del manejo del ensayo.	134
a) Primera fase preparación de reactivos para el medio de cultivo.	135
b) Segunda fase.	139
c) Tercera fase. Esterilizado de materiales y del medio de cultivo.	143
d) Cuarta fase: Selección de explantes.	145
e) Quinta fase: Preparación del material vegetal para la	



siembra.	145
f) Sexta fase: Siembra de Meristemos	152
g) Séptima Fase: Toma de datos.	153
V. Resultados y discusión	155
V. Conclusiones.	207
VI. Recomendaciones.	209
VII. Resumen	211
VIII. Summary	218
IX. Bibliografía citada	223



UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGRONOMICA.

“EVALUACION DE DIFERENTES DOSIS DE AUXINAS (ANA - IBA) Y CITOQUININA (BA) PARA EL DESARROLLO DE MERISTEMOS EN *Maxillaria grandis* Rchb.f. ”.

Tesis de grado, previa a la

Obtención del título de

Ingeniera Agrónoma

Director: Ing. Agr. Francisco Merchán B.

Coordinación: Instituto de investigación Científica de la FF.CC.AA. de la Universidad de Cuenca

Autora: Paola Dennise Cruz Jaramillo.

Cuenca - Ecuador

2010-2011



I. Introducción

La familia *Orchidaceae*, es una de las más grandes y diversas del planeta, ya que por su forma, tamaño, y sus colores especialmente de sus flores, es uno de los atrayentes, no solo en la parte ornamental, sino también por cosmetólogos, sus aromas son utilizados para la fabricación de perfumes, de la gastronomía y en el campo medicinal en el cual se utiliza las orquídeas (ABC, sf.).

En la economía, es importante, en países donde se encuentra la mayor diversidad de especímenes, como es Sudamérica, su mega diversidad por las condiciones edafo-climáticas que brindan estos países (ABC, sf.).

Ecuador, es uno de los países que tiene la biodiversidad adecuada para este tipo de plantas, encontramos una gran gama de especies que llama la atención no solo por sus atractivos sino también para la investigación científica. Encontramos 4.163 especies de orquídeas y 1.710 endémicas, que son materia de trabajo científico; de estas, muchas de ellas son vulnerables, están amenazadas o en peligro crítico, como es el caso de *Brachionidium lehmannii*,



Cyclopogon leuromorphus, *Dichaea chiquidensis*, *Dichaea longissima*, *Encyclia angustiloba*, *Epidendrum falcisepalum*, *Maxillaria stricta*, *Maxillaria vulcanica*. (Jijón, et al., sf.).

Causas principales para que se encuentren en lista roja en el Ecuador, se debe: a la deforestación, y al saqueo indiscriminado de individuos silvestres; y a un desconocimiento científico para su cultivo. Al determinar cada una de las plagas, enfermedades y virus que las atacan y destruyen completamente, podríamos salvar individuos importantes en estas listas.

Una de los patologías que arrasa con las orquídeas, son los virus; cada uno de estos patógenos traen efectos negativos, ya que el solo roce entre planta y planta, o el mal manejo mecánico, produce una transferencia del 100% de la inoculación del virus, la que se transmite a toda la planta por medio de la savia, dependiendo cada especie, pero en su mayoría se transmiten principalmente los patógenos más comunes, particular que se presenta no solo en nuestro país, si no en el mundo entero, entre las que tenemos: *Cymbidium mosaic potexvirus (CyMV)* que tiene como síntomas manchas necróticas y cloróticas (Ringo, 2004)



El virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (**ORSV o TMV-O**) se caracteriza porque su ataque se concentra en las flores de las orquídeas, para controlar estos síntomas tenemos un manejo fitosanitario, estrategias preventivas, pero que no cura a la planta, por cuanto puede producirse una nueva re-infección, ya con el mismo patógeno o con otra especie de virus(Banks, 2006)

Las orquídeas, son productoras de semillas, al no contar con un porcentaje adecuado de desarrollo in vitro y ex situ, las plantas de orquídeas necesitan de agentes externos como son los hongos, especialmente de la especie (*Rhizoctonia sp.*) para obtener un porcentaje alto de germinación, por cuanto el endospermo que rodea el embrión es muy reducido, y se ha determinado una relación semilla – hongo, dependencia que lleva el nombre de simbiosis, por lo cual debemos conservar adecuadamente a estos hongos para su estudio y reproducción de esta orquídea que se encuentra en la lista roja de especies endémicas del país (Jijón, sf.).

Salvar a una especie de los patógenos para evitar su decadencia por estas causas, es el objetivo del presente trabajo, para lo cual utilizaremos técnicas alternativas, por medio del tejido vegetal que permite la reproducción de



orquídeas en condiciones asépticas, para obtener masivamente plantas para adaptación, en poco tiempo y asegurando la calidad y sanidad de cada una de ellas (Jijón, sf.).

Consideramos que estas técnicas puede ser la respuesta, encaminada para evitar la extinción de estas especies endémicas.

Por la importancia de estas especies justificamos el presente trabajo cuya finalidad es obtener plantas libres de virus.



II. Objetivos e Hipótesis

2.1. Objetivo general.

- Desarrollar meristemos de *Maxillaria grandis* a nivel *in vitro*

2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar el porcentaje de meristemos vivos después de la siembra.
- Evaluar los comportamientos y variaciones de los meristemos *in vitro*

2.3. Hipótesis.

- Las diferentes dosis de AUXINAS (IBA y ANA) y CITOQUININA (BA) actúan de manera diferente para el desarrollo de meristemos *in vitro* en la especie *Maxillaria grandis*?
- Las diferentes dosis de AUXINAS (IBA y ANA) y CITOQUININA (BA) no tienen efecto en el



comportamiento para el desarrollo de meristemos *in vitro*
en la especie *Maxillaria grandis*?



III. Revisión de literatura.

3.1. Perspectiva histórica de las orquídeas.

Su origen se relata desde la prehistoria, donde se han encontrado fósiles del período jurásico, de la era mesozoica que nace en 195 – 136 millones de años y también de la era cenozoica que hace referencia a unos 64 millones de años. Se considera que su origen proviene del Mediterráneo, ya que algunos especímenes crecen espontáneamente como son las *Orchis* y *Ophys* (Kijima, 1994).

En los registros de los chinos, se hace referencia que ya cultivaban las especies más fragantes como *Cymbidium* en los años 500 a.C (Banks, 2006). Especialmente de su flor se encuentran referencias en el libro “Historia de las plantas” de Teofrasto, un discípulo de Aristóteles en los años 300 a.C. En el siglo I d.C. se realiza la primera identificación por un herborista griego llamado Dioscórides el cual las recolectó para formar un herbario de plantas medicinales, que fue utilizado como punto de referencia hasta la edad media en Asia (Kijima, 1994).

En la antigua Grecia, se conoce a las orquídeas, como un símbolo de virilidad. La palabra “orquídea” proviene (del latín



orchis, que a su vez deriva del griego), que significa testículo (que hace referencia al par de rizomas subterráneos de algunas especies); apareció por primera vez mencionada en un manuscrito de un filósofo griego, aproximadamente entre los años 371 a.C. – 285 a.C (ABC, sf.).

En Europa, el cultivo de las orquídeas, comenzó por afición probablemente con las expediciones Británicas del siglo XVIII, y recién a inicios del siglo XIX, el cultivo de orquídeas se convirtió en una actividad popular. En esta época, las expediciones de los colonizadores europeos, iban y venían desde el Nuevo continente, con cargamentos de orquídeas tropicales, financiadas por aristócratas aficionados a estas especies endémicas, por la exotidad de las mismas, que eran sembradas en grandes viveros construidos únicamente para este fin.

La aristocracia se caracterizó por la intensa competencia, por obtener las mejores y más raras orquídeas, la cual daba al que la poseía un estatus social diferente. Los viveros más grandes se encontraban en manos de familias poderosas entre las que se destacan: Loddiges, Williams, Bull, Veitch y Sander, creador de una de las colecciones más importantes que se destaca hasta la actualidad, y entre las que se encuentran las orquídeas tropicales. Sander inmortalizo el nombre de su



familia ya que describió algunas de las orquídeas introducidas en Europa, como por ejemplo: *Paphiopedium sanderianum*; *Dendrobium sanderae*; *Vanda sanderiana* la cual también tiene el nombre de *Euanthe sanderian*, cabe indicar que dentro de esta lista se encuentra la especie en estudio que es la *Maxillaria sanderiana* o actualmente conocida como *Maxillaria grandis*.

La historia, acusa a todos estos recolectores de ser los causantes y devastadores de la parte ambiental y humana que acabó con una gran cantidad de trabajadores relacionados con esta actividad; país al que llegaban para recolectar especies, lo contaminaban con enfermedades contagiosas que trasmítían a la población. Además que extinguían a las especies endémicas de cada país (Banks, 2006).

Las orquídeas han fascinado a la humanidad durante su existencia; consideradas flores místicas en algunos países; en Grecia y Asia los rizomas chancados como pasta se utiliza para tratar algunas dolencias y se coloca en las bebidas como afrodisíaco, en los pueblos primitivos como en la Sierra del Ecuador en la población de Loja - Saraguro se la utiliza con fines medicinales, especialmente la hoja de *Odontoglossum longipes Rchb* (Ríos, et al., 2007).



3.2. Importancia económica

Por su aroma y su belleza, las orquídeas actualmente tienen un elevado costo en el mercado mundial, mientras más rara es la especie, más alto es su valor comercial, por lo cual los productores, ya sean empresarios particulares e industriales la comercializan como flor cortada y como planta ornamental. El cultivo de orquídeas es posible en todas partes del mundo, y está especialmente desarrollado desde la mitad del siglo pasado por muchos híbridos inte-respecífico e inter-genéricos, quienes crearon estas especies para comercializarlo con éxito económico increíble.

La explotación comercial para flor cortada y el cultivo en maceta agrupa a unos cincuenta géneros cuyo cultivo se practica en muchos países. Los principales productores de orquídeas son: Ecuador, Perú, Colombia Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Países Bajos y Tailandia. El aumento de la demanda en los países industrializados ofrece una oportunidad para el desarrollo de mercados de exportación en otros países en desarrollo tanto en Asia Sudoriental como en Sudamérica. Algunos géneros de la familia de las orquídeas son objeto de cultivos importantes para exportación como en el caso del Ecuador que tiene como



representante a empresas reconocidas, las cuales en sus listas tienen gran cantidad de ejemplares entre las que mencionaremos algunas: *Acacallis cyanea*, *Acianthera casapensis*, *Acianthera wageneriana*, *Barbosella cucullata*, *Barbosella cucullata*, *Barbosella fuscata*, *Cattleya gigas*, *Cattleya gigas*, *Cattleya gigas*, *Dendrobium aggregatum*, *Dendrobium anosmum*, *Dendrobium antennatum*, *Dracula andreettae*, *Dracula benedictii*, *Dracula carlueri*, *Encyclia seidellii*, *Encyclia thienii*, *Encyclia unaensis*, *Epidendrum agoyanense*, *Epidendrum angaritae*, *Epidendrum arachnoglossum*, *Gongora catilligera*, *Gongora colombiana*, *Gongora flaveola*, *Masdevallia paivaena*, *Masdevallia panguiensis*, *Masdevallia pastinata*, *Maxillaria sanderiana*, *Maxillaria saragurensis*, *Maxillaria schunkeana*, *Pleurothallis aspasicensis*, *Pleurothallis barbulata*, *Pleurothallis bivalvis*, *Pleurothallisbrenneri*, *Pleurothallis brevipes*, *Pleurothallis breviscapa*, *Pleurothallis brighamella*, especies en las que trabajan mediante cultivos muy especializados. (ABC, sf y Ecuagenera, 2011).

3.3. Distribución y diversidad



Las orquídeas se encuentran casi en todo el planeta a excepción de los polos, ni en las zonas desérticas, tampoco crecen en montes donde existe nieve perpetua. Son plantas monocotiledóneas, pertenecientes a la familia *Orchidaceae*, la más vasta del reino vegetal. (Mújia, et al., 2000).

Freuler, (2008) “Indica que se han descubierto aproximadamente 28.000 especies repartidas en 700 géneros, pero todavía hay regiones sin revelar fitogeográficamente, varias de ellas en el continente americano.

Si a esto le añadimos la enorme cantidad de híbridos entre especies e incluso entre géneros distintos, nos encontramos en un campo de enormes posibilidades. (Mújia, et al., 2000).

Las orquídeas se encuentran distribuidas desde el Norte a 72° y al sur a 54°. La mayor parte en la zona tropical y subtropical del Ecuador, que registra entre un 80 al 90% de su producción. El mayor porcentaje se encuentra en Asia, Indonesia y Australia, en segundo lugar África y Madagascar y luego desde México hasta Brasil. (Jijón, et al., sf.).

El género *Maxillaria* se encuentra dispersa a lo largo de América Tropical, desde Florida y México hasta Argentina, en altitudes van desde el nivel del mar hasta los 3 500 msnm. Las plantas pueden ser epifitas, litófitas, y muchas crecen de forma



terrestre en los taludes y bordes de carreteras. Abundan en zonas muy húmedas, si bien algunas pueden crecer en zonas un más secas. Hasta la fecha se han reportado unas 650 especies para el género, de las cuales 200 están en Ecuador (Jijón, et al., sf.).

3.3.1. Ecología y hábitat

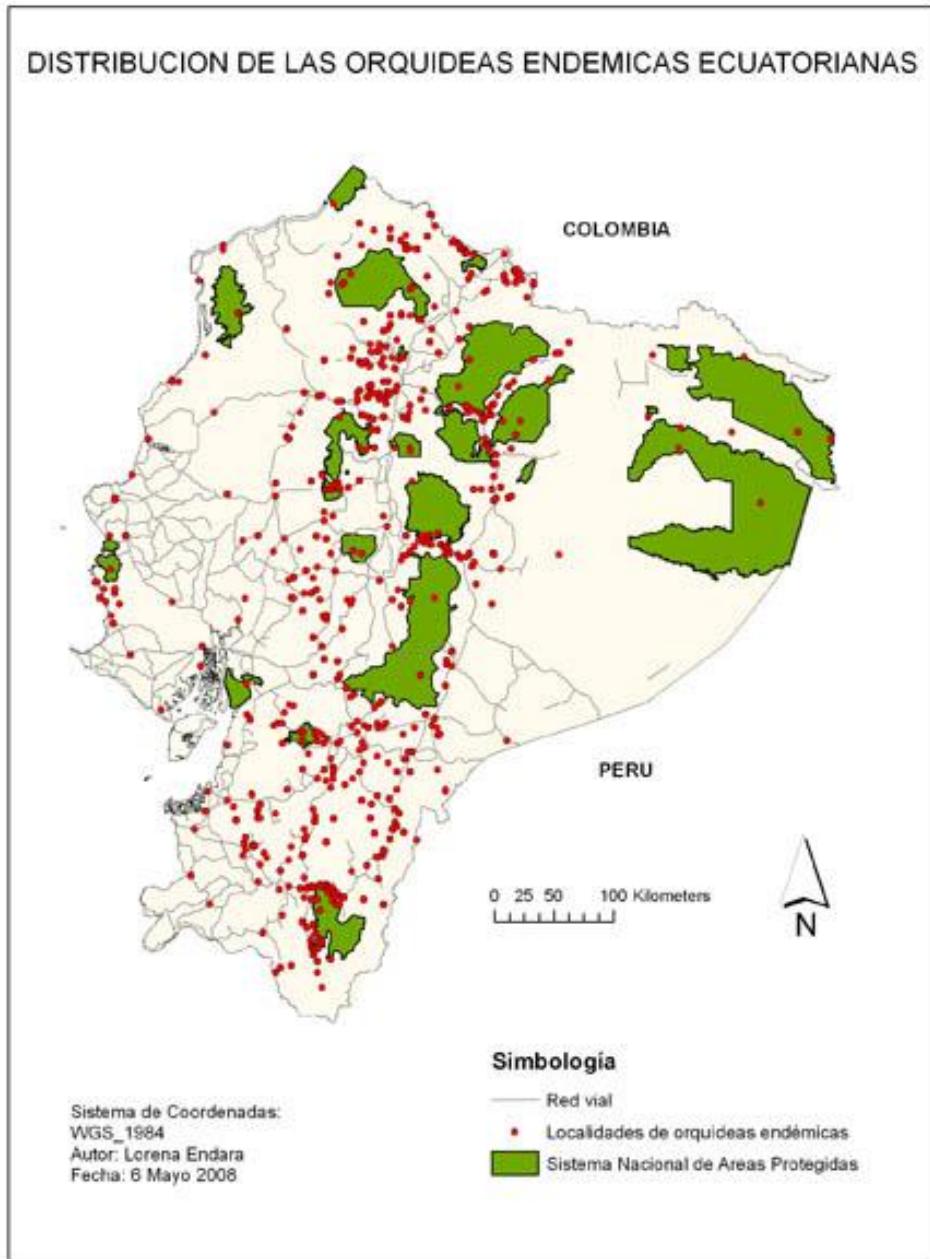
La recolección de orquídeas endémicas en nuestro país se realiza en la red vial, esto es muy común en nuestra zona. Cabe destacar y como lo indica el mapa de la distribución endémica de las orquídeas del Ecuador (Fig. 1), todas las especies se encuentran en zonas protegidas por la SNAP (Sistema Nacional de Áreas Protegidas). Es un reto estudiar los endemismos de las orquídeas en un país mega diverso como es el nuestro, por esta razón se debe contar con varias estrategias. El Ecuador las tiene, para conocer la situación en las que se encuentran las especies, por lo cual contamos con una lista de especies amenazadas en el “Libro Rojo de especies Endémicas del Ecuador”, en la que se destaca el estado en que se encuentran las especies: peligro crítico, en peligro, o amenazadas; esto es de gran ayuda científica; al igual que los herbarios activos y bien mantenidos, ya sean



públicos y privados, que nos proporcionan información sobre la ecología, hábitat, taxonomía de la planta, estructura botánica, y conocer su origen y situación en la se encuentra dentro de la lista roja elaborada a nivel mundial o para el Ecuador.

Nuestro país ha sido botánicamente explorado, con todas estas estrategias ya obtenidas lo cual nos permite establecer tácticas para proteger producir y exportar científicamente esta nueva fuente de ingresos económicos. (Endara, 2009).

Figura 1.- Distribución de las especies endémicas del Ecuador.



Fuente: Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP, sf.)

Dentro de la base de datos de los trópicos tenemos las recolecciones que se han realizado a nivel internacional como es el caso de Perú y local como es el Azuay, Cañar, Napo,



Tungurahua. En esta distribución se encuentra la zona exacta de recolectas y el año que se han obtenido, los códigos que tiene nuestra planta en estudio.

Cuadro 1. Localización por provincias en Ecuador de *Maxillaria grandis*.

Country	Upper	Lower	Author	Year	ArticleTitle	Publication	Collation
Ecuador			Dodson, C. H. & P. M. Dodson	1982	Orchids of Upland Ecuador	Icon. Pl. Trop. 5: 401–500	
Ecuador	Azuay		Jørgensen, P. M. & S. León-Yánez	1999	Catalogue of the vascular plants of Ecuador	Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.	75: i–viii, 1–1181
Ecuador	Cañar		Dodson, C. H. & P. M. Dodson	1982	Orchids of Upland Ecuador	Icon. Pl. Trop. 5: 401–500	
Ecuador	Cañar		Jørgensen, P. M. & S. León-Yánez	1999	Catalogue of the vascular plants of Ecuador	Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.	75: i–viii, 1–1181
Ecuador	Morona-Santiago		Jørgensen, P. M. & S. León-Yánez	1999	Catalogue of the vascular plants of Ecuador	Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.	75: i–viii, 1–1181
Ecuador	Napo		Jørgensen, P. M. & S. León-Yánez	1999	Catalogue of the vascular plants of Ecuador	Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.	75: i–viii, 1–1181
Ecuador	Tungurahua		Dodson, C. H. & P. M. Dodson	1982	Orchids of Upland Ecuador	Icon. Pl. Trop. 5: 401–500	
Ecuador	Tungurahua		Jørgensen, P. M. & S. León-Yánez	1999	Catalogue of the vascular plants of Ecuador	Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.	75: i–viii, 1–1181

Fuente:(Base de los Trópicos. 2011).

3.3.2. Patrones generales de endemismo de las orquídeas ecuatorianas.

El Ecuador es considerado como uno de los 17 países con mayor diversidad de plantas en el mundo, y dentro de esta diversidad encontramos la familia *Orchidaceae*, la cual aporta

con un tercio del total de especies al fito-endemismo del Ecuador, 4.163 spp. De lo cual tenemos que el 40% son orquídeas endémicas, que solo crecen en el país, un tercio de las plantas endémicas son orquídeas, catalogadas en 228 géneros y 4 023 especies. Existen en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 – 4500m.s.n.m., como varios estudios indica que la mayor cantidad de orquídeas endémicas se encuentran en los micro-hábitats. Toda la riqueza del Ecuador se debe a la posición estratégica en que nos encontramos, lo cual permite una convergencia importante con flora de otros países. Así tenemos que la influencia de las especies provenientes de la cuenca del Amazonas al oriente; al oeste la influencia de las especies de Centro América y del Chocó-colombiano; y hacia el sur de nuestro país la influencia de Sudamérica. Otra de las razones por la cual nuestro país es mega-diverso, se debe a la cordillera de los Andes, que se eleva desde los 500 a los 6 000 metros sobre el nivel del mar, aspecto que marca de manera significativa la distribución de las orquídeas en nuestro país. La mayor parte de orquídeas se encuentran en rangos de altitud entre los 1000 y 3000 m, bajo este rango la diversidad está en un 22% del total de las especies, y sobre el 18%. La cordillera de los Andes con sus dos ramales que atraviesa al Ecuador de Norte a Sur,



unidas por ramales transversales que dan origen a las hoyas, por lo cual su orografía es irregular e indefinida de microclimas, micro-hábitat, y consta de varios tipos de vegetación, y por estos accidentes naturales producidos, las irregularidades edáficas favorece a una completa, abundante, y heterogeneidad de cada una de las especies que se encuentran a cada lado de la cordillera, y en los valles que se forma. Para entender mejor citamos un ejemplo, en el rango comprendido entre los 0-1000 metros sobre el nivel del mar crecen alrededor de 969 especies, el 89% de especies comparten similitudes con el otro lado de la cordillera, esto representa el 9%, mientras que el 91% restantes no se encuentran del otro lado de la cordillera con este ejemplo podemos constatar la heterogeneidad de las especies en nuestro país (Jijón, et al., sf.).

Pero no solo se encuentra la cadena montañosa en la parte central (Sierra) si no que en la parte costera el Ecuador se ubican dos corrientes marianas las cuales modifican el clima de esta parte del país, estas corriente son: la cálida del Niño, en el norte que genera un clima húmedo tropical y da origen a bosques del mismo nombre (húmedo tropical), y la fría de Humboldt que genera un clima más seco hacia el sur del país y origina un bosque seco tropical muy rico en especies



endémica. En conclusión podemos decir que las plantas en especial las orquídeas evolucionaron y se adaptaron de acuerdo a las condiciones climáticas que brinda el Ecuador. Gracias a este clima podemos encontrar orquídeas en todas las cuatro regiones del Ecuador como es la Costa en los manglares, Sierra en los páramos, Oriente y Galápagos, en esta última encontramos 15 especies de orquídeas las cuales dos son exclusivas del lugar (Jijón, et al. sf.).

La combinación de perfiles de distribución, como los observados en las orquídeas, y la rápida conversión de bosques son un reto para los esfuerzos de conservación, especialmente porque una pequeña fracción de las especies se encuentra dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Se estima que el 85% del total de especies endémicas presentan algún tipo de amenaza: 2% En peligro crítico, 11% En peligro y 87% Vulnerable. A nivel subtribu la flora de *Orchidaceae* endémica está compuesta por un 65% de especies de la subtribu *Pleurothallidinae*, seguida lejanamente por *Laeliinae* (12%) y *Oncidiinae* (9%) (Endara, 2009).

3.4. Estructura botánica del género *maxillaria*.

3.4.1. Clasificación botánica.



Los científicos dedicados a la Taxonomía, en su afán de comprender su naturaleza, han buscado clasificar y ordenar los diferentes elementos que la constituye. Desde las épocas primitivas se ha determinado clasificaciones básicas las cuales eran útiles, en la actualidad se utiliza el ADN para poder identificar la afinidad de las especies para su agrupación en las diferentes escalas que corresponde en relación con las existentes a nivel internacional. Al reino vegetal se lo ha dividido en subgrupos por la gran cantidad y diversidad de plantas que se encuentran distribuidas en la tierra. Cada grupo tiene una división, pero estas divisiones también tiene terminación las cuales nos pueden ayudar para identificar o nominar correctamente una especie; utilizaremos la clasificación de **Cronquist** quien es uno de los más nobles botánicos y cuyo sistema se utiliza hasta la actualidad (Jijón, et al., sf.).

Cuadro 2. Clasificación de las orquídeas según Cronquist.

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Orchidales
Familia	Orquidaceae



Fuente: Jijón, C.sf.Ecuador país de orquídeas.

Como existe una clasificación general desde REINO hasta la FAMILIA, hay una clasificación para la SUBFAMILIA (Jijón, et al., sf.).

Cuadro 3. Subdivisión de la familia Orchidaceae

Subfamilia	Vandoideae
------------	------------

Fuente: Jijón, sf. Ecuador país de orquídeas.

Cuadro 4. Subdivisión de Tribus y Sub-tribus dentro de la Subfamilia Vandoideae.

Tribu	Maxillarieae	
	Subtribu	Zygotetalinae

Fuente: Jijón,sf. Ecuador país de orquídeas.

Los botánicos españoles Ruiz y Pavón establecieron el género *Maxillaria* en 1794, con más de 600 especies hasta ahora. Este gran género debería estar claramente definido, lo cual no ha sido clasificado hasta la fecha. Hay taxonomistas que trabajan para clasificar los grupos y algunos de ellos están más o menos claramente definidos. Varios grupos han sido segregados, como es el caso de *Maxillaria*; a veces se



reconoce el estatus de género para *Camaridium*, *Ornithidium*, y *Pseudo maxillaria*.

Hay un vasto grupo de especies que no ha sido descrito aun. Algunas *maxillaria* son especies de tierras bajas, otras son de cotas altas y algunas se encuentran entre estos extremos. Su rango va desde el nivel del mar y los 3 500 m de altura, creciendo como epifitas, litofitas, y terrestres (Zelenko, et al., 2009).

3.5. Tipos de crecimientos de las orquídeas.

3.5.1. Crecimiento simpodial

Es aquel que se presenta en las orquídeas que tienen bulbos y pseudobulbos, es de crecimiento definido, esto se basa en que luego de florecer la orquídea no sigue creciendo. Los tallos darán nuevos brotes a partir de una yema específica que se encuentra en la base del tallo y sin esta yema la orquídea no volverá a florecer (Jijón, et al., sf.).

3.5.2. Crecimiento monopodial.

Es aquel que se da en forma longitudinal e indefinida, lo cual se debe a que hay un punto de crecimiento apical el cual da



origen a hojas y posteriormente a los tallos, y está provisto de raíces en toda su longitud: las inflorescencias nace de las axilas de las hojas (Jijón, et al., sf.).

3.6. Morfología de *Maxillaria sanderiana* o *Maxillaria grandis*

3.6.1. Raíz.

La investigadora Freuler, (2008) señala que las raíces se ven gruesas apenas emergen del rizoma.- pseudobulbo o tallo- y a veces se ramifican cuando son muy largas. Están cubiertas por un tejido que actúa como una esponja, llamado “velamen”.

3.6.2. Los rizomas y pseudobulbos.

La referida tratadista Freuler, (2008) nos enseña que “Las plantas simpodiales tienen un rizoma (tallo subterráneo o aéreo) al partir del cual se originan pseudobulbos (órganos de reserva de alimento y agua.). Los más jóvenes llevan las hojas, son portadoras de yemas auxiliares, dan origen a raíces y, en muchos casos, a flores. Pueden ser cilíndricos, fusiformes, elípticos, ovales, etc.” En el caso de *Maxillaria grandis* tenemos que el tipo de pseudobulbo es el ovoide.

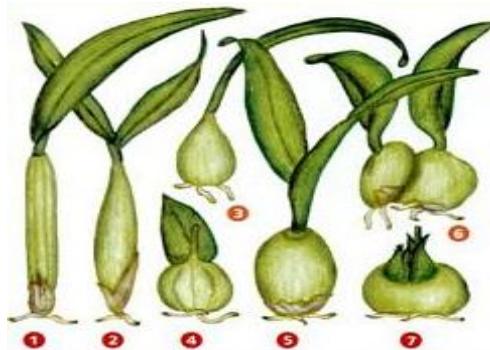


Gráfico 1: Clasificación de rizomas y pseudobulbos en orquídeas

Fuente: María Freuler (2008).

3.6.3. Hojas.

Sobre el tipo de hojas, dice la tratadista Freuler, (2008) en las plantas monocotiledóneas, sus hojas se presentan nervaduras (llevan agua y transportan los productos de la fotosíntesis) que corren paralelas entre si y al eje longitudinal". Por las observaciones que se han hecho el tipo de hoja de la *Maxillaria* es la lineal.

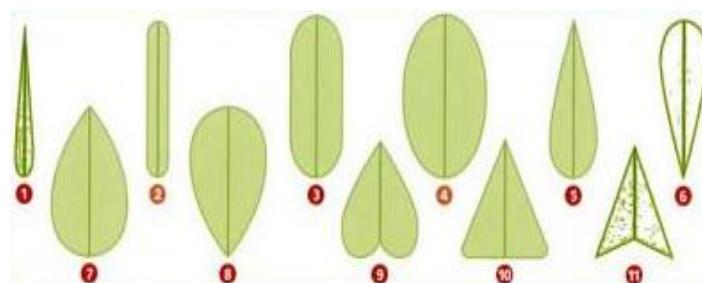




Gráfico2: Clasificación de hojas en las orquídeas
Fuente: María Freuler (2008).

3.6.4. Flor.

Cuando nos referimos a flores de orquídeas, no las imaginamos grandes, coloridas, con labelos grandes; o, si no grandes racimos de colores vivos, aunque debemos destacar que las orquídeas son pequeñas, de formas simétricas en sus flores. Podemos sostener que todas las orquídeas tienen una simetría bilateral; si cortamos la flor de la orquídea en dos estas son exactamente iguales, una es la copia de la otra. Las flores de ciertas orquídeas pueden ser solo masculinas o femeninas; por ejemplo: es el caso de las especies de *Catacetum*, estas pueden ser masculinas o femeninas y dependiendo del género de la flor, tendremos diferente estructura en sus órganos reproductores (Jijón, et al., sf.).

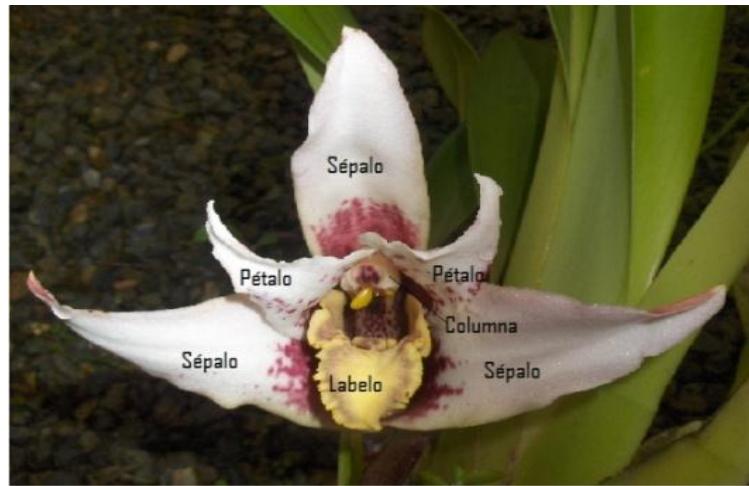
En el caso de la *Maxillaria*, es solitaria, y su característica principal es que sus flores crecen desde la base de los pseudobulbos. Para evitar problemas con las flores, estas deben ser sembradas en macetas de alambre y colgadas para asemejar a su hábitat (Banks, 2006).



Fotografía 1: Flor de *Maxillaria grandis*
Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2010)

a) Estructura de la flor de orquídea de *Maxillaria grandis*.

Tiene 3 sépalos; estos son más grandes que los pétalos de color blanco con manchas rojizas; sus pétalos son 2, son de la misma coloración que los sépalos, pero su borde es algo irregular. El labelo es de color amarillo, esta se encuentra opuesta a los pétalos, y su característica es de forma irregular, como una mandíbula, de donde proviene su nombre. El labelo es la estructura más importante, por ser la parte reproductiva de la flor de *Maxillaria grandis*, esta estructura está conformada por órganos femenino y masculino (Seaton, et al., 2009).



Fotografía 2: Estructura floral de *Maxillaria grandis*

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2010)

b) Tipos de polinización y polinizadores.

Existen dos tipos de polinización natural y artificial.

- **Proceso de polinización natural.**

Dentro de la polinización natural, con la ayuda de la flor de orquídea, que por su forma, olor, estructura, textura, fragancia, sirve como atrayente para la gran cantidad de insectos que participan en la polinización. Gracias a la estructura de las orquídeas se puede dar la polinización, ya que todas poseen un labelo modificado, como es el caso de *Ophrys scolopax*, cuya estructura se asemeja a una abeja, por su forma, color y olor de abeja hembra, que le permite atraer a las abejas machos para el proceso de polinización, que se conoce también como pseudo-copulación.

Debemos recalcar que las orquídeas no solo tienen agradable fragancia que emanan feromonas; sino existen otras que producen olores desagradables, como el caso de la *Bulbophyllum*, que se da en Nueva Guinea, y tiene un olor a carne en estado de putrefacción; lo cual no implica que atraiga polinizadores, si la tiene, que en este caso son moscas o insectos carroñeros.



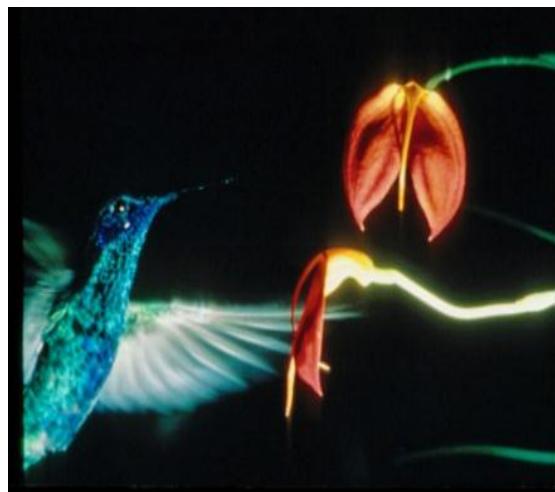
Fotografía 3 y 4: Polinización natural y Polinización artificial respectivamente.

Fuente: Alex Hirtzi. (2010)

El proceso de polinización natural es muy rápido, después que el insecto es atrapado por la planta, éste se posa sobre la flor para intentar volar, que lo consigue luego de varios intentos. Como resultado tenemos que el insecto lleva consigo una gran cantidad de polen en su cuerpo y al posarse en otra flor,

con la misma estructura, dejara el polen inoculado, en la parte estigmática y de esa forma tendremos la polinización natural (Banks, 2006).

Este proceso se efectúa también en la especie de *Maxillaria grandis*, la cual atrae a colibríes y avispas para su polinización (Dodson, 2002).



Fotografía 5: Polinizador de *Maxillaria grandis*
Fuente: Alex Hirtzi. (2010)

- Proceso de polinización artificial.

Antes del proceso de polinización, se recomienda identificar correctamente la estructura de la flor, para poder polinizar y evitar la transferencia de virus a la planta. Tener a mano los instrumentos necesarios para el trabajo como es: pinzas de

punta fina, un palillo, una hoja de papel, es fundamental para garantizar este proceso (Seaton, et al., 2009).



Fotografía 6. Identificación de las estructuras floral

Fuente: Ing. Francisco Merchán. (2009)

Las flores a polinizar deben estar frescas y con toda su estructura. Debemos identificar la planta madre (en la cual se va a polinizar) y la planta padre (de quien se va a obtener el polineo) para lo cual debemos seguir el siguiente procedimiento:

- 1.- Debemos identificar en la flor como es la columna, la antera, el róstelo, y el estigma.



Fotografía 7. Estructuras de la orquídea y eliminación del labelo para la polinización artificial.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2009)

2.- Colocar la hoja de papel para recoger si se cae el polen y los polinios que se necesitan.

3.- Separar de la flor el capuchón que se encuentra cubriendo al polineo, y es de fácil identificación.

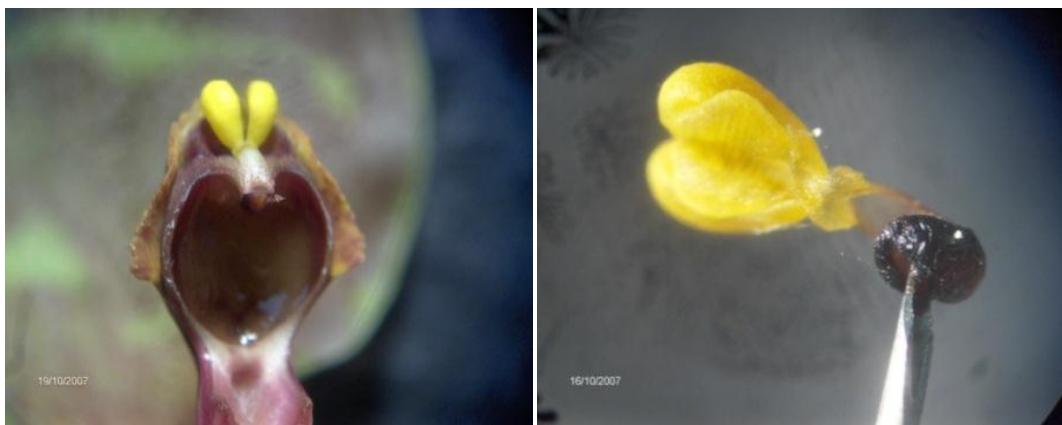


Fotografía 8. Eliminación del capuchón para la polinización artificial.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2007)



4.- Al separar el capuchón, nos encontramos con el polinio que es de color amarillo, el mismo que prevalece en la mayoría de orquídeas; en algunas plantas, como es el caso de *Sophronitis cernua*, es de color gris – azulado, en el cual se encuentran las anteras, que tienen en su interior el polen.



Fotografía 9 y 10. Observación de los polinios y Extracción de los polinios.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2007)

5.- Al ser identificado el polinio, se recoge el polen y se lleva hasta a la flor madre, donde será colocado en el estigma para su posterior fertilización.



Fotografía 11. Polinización en la planta madre.
Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2007)

6.- Etiquetar y registrar correctamente la orquídea polinizada, con el nombre de las plantas madre y padre, y fecha de polinización; y en el registro que se lleva, adicionalmente, anotaremos la fecha de recolección, numero de flores polinizadas; polinizaciones efectivas; fecha de corte, etc (Merchán, 2010).

Cabe indicar que entre más generoso sea la cantidad de polonio que se coloca, más abundante será la cantidad de semillas que se obtendrán al momento que se recoja la cosecha de la cápsula.



3.6.5. Frutos

Los frutos de las orquídeas son cápsulas dehiscentes, que se abren cuando llegan a la madurez fisiológica. Estas se pueden recolectar antes de esta etapa, para su posterior siembra.



Fotografía 12. Frutos de orquídeas (capsulas dehiscentes).

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2010)

En el cuadro5.- señalamos ejemplos de días en los que la capsula posiblemente se puede abrir, ¿por que posiblemente?, ya que esto depende del cuidado que el investigador de al cultivo de orquídea, como es la cantidad de suministros de agua, luz, temperatura, las condiciones de sanidad, plagas enfermedades, la calidad de sustrato (Merchán, 2010).

Cuadro 5. Ejemplo de días a la cosecha de capsulas verdes.

Género especie	Días cápsula
----------------	--------------



	verde
<i>Anguloa uniflora</i>	240
<i>Bollea ecuadorensis</i>	210
<i>Brassia arcuifera</i>	180
<i>Cattleya maxima</i>	220
<i>Comparettia speciosa</i>	200
<i>Cytochillum macranthum</i>	220
<i>Epidendrum secundum</i>	120
<i>Gongora quinquenervis</i>	120
<i>Masdevallia rosea</i>	120
<i>Maxillaria rufescens</i>	140

Fuente:

Dr.

Eduardo Sánchez. (2010)



Fotografía 13. Invernadero de donde se obtienen las capsulas para la siembra.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2009)

Luego de la recolección y guardada la semilla o cápsula que se abrió, debemos proceder a la siembra, aplicando diferentes técnicas como la de Philip Seaton, (las cuales se la realiza con un sobre de papel en el cual se encuentran la semilla, este sobre será sellado con grapas, desinfectado y sembrado) (Sánchez, 2010).



Fotografía 14 y 15. Técnica del sobre para la siembra de semillas de orquídeas.

Fuente: III Curso Internacional de Cultivos In vitro y Germoplasma de Orquídeas. (2011)

Otro método es la siembra de:

- **Semillas de cápsula cerrada**, se realiza de la siguiente forma:
 - 1 Prender la cámara de flujo laminar.
 - 2 Limpiar y atomizar con alcohol etílico comercial de 30 minutos a una hora de anticipación a cualquier trabajo.
 - 3 Colocar en alcohol etílico, pinzas, bisturís, pipeta Pasteur, invirtiendo el orden una vez, por lo menos.

Para el ambiente debemos seguir el siguiente procedimiento:

- 1 Limpiar las áreas necrosadas.
- 2 Dejar en agua circulante por 4 a 6 horas la cápsula.



- 3 Con un cepillo de dientes suave limpiar la cápsula
- 4 Colocar en un litro de agua, 1 gramo de detergente y de 1 a 2 gotas de tween 20 y sumergir la cápsula por 10 minutos.
- 5 Eliminar el detergente con 2 lavadas utilizando agua normal.
- 6 Preparar alcohol etílico al 70% y colocarlo en un vaso de precipitación.
- 7 Preparar hipoclorito de sodio entre el 1 y 1.5% (Ajax cloro de 20 a 25 cc y aforar a 100 cc con agua).
- 8 Colocar sobre una tapa de caja petra unas gotas de alcohol, las pinzas, bisturís y flamear.
- 9 Poner en alcohol al 70% por tres minutos.
- 10 Con una pinza pasar a un recipiente con agua estéril para elimine el alcohol.
- 11 En un vaso o jeringuilla, colocar la cápsula en hipoclorito de sodio por 10 minutos realizando de 2 a 3 succiones.
- 12 Eliminar el cloro en un vaso.
- 13 Sobre un papel estéril abrir la cápsula con una pinza y bisturí.
- 14 Con el bisturí pasar semilla a una caja petri con 1 o 2 cc de agua.
- 15 Poner una a dos gotas de semillas en el medio de cultivo usando una pipeta pasteur.



- 16 En un frasco pequeño poner 1 gota de agua oxigenada y en grandes 2 gotas.
- 17 Flamear el frasco y tapar.
- 18 Etiquetar el material con marcador resistente al alcohol o lápiz, y no con bolígrafo: genero, especie, variedad, fecha de siembra año mes día, quien siembra en códigos.
- 19 Colocar los frascos en el cuarto de cultivo a baja intensidad luminosa hasta la germinación.
- 20 Anotar en el registro de laboratorio: Código, descripción, fecha de siembra, tipo de medio, número de siembras, cambios de medio, contaminaciones, responsable y otros. En el cuarto de cultivo, revisar periódicamente y anotar resultados (Merchán, 2010).

- Siembra de cápsula abierta o semilla seca se realiza de la siguiente manera:

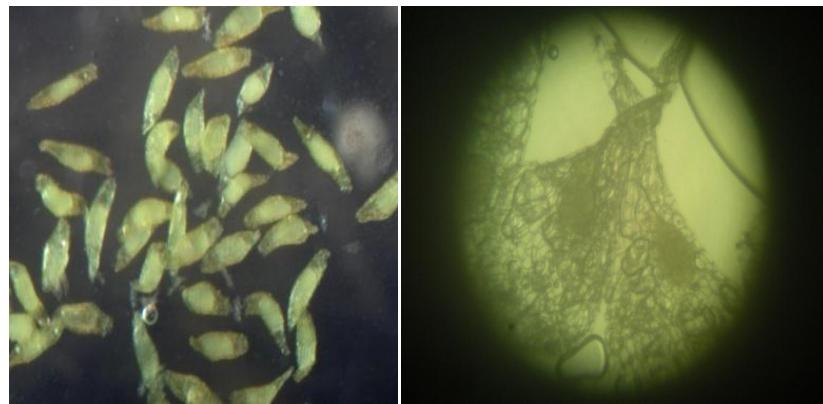
- 1 Preparar hipoclorito de sodio de 1 a 1.5 % de concentración.
- 2 Colocarlo dentro de la cámara de flujo laminar.
- 3 Poner la semilla dentro de una jeringuilla hipodérmica y adicionar el hipoclorito de sodio, realizar la succión 3 veces, a los 2 minutos pasar al filtro estéril



- 4 Eliminar el cloro con un chorro de agua estéril.
- 5 Poner el filtro dentro de un vaso y adicionar agua, realizar 3 cambios de agua cada 3 minutos.
- 6 Pasar la semilla a una caja petri, adicionar agua para poder distribuir uniformemente la semilla.
- 7 Seguir luego los pasos descritos en los numerales 17 a 20 referentes a preparación del ambiente (Merchán, 2010).

3.6.6. Semillas.

Una vez efectuada la cosecha, debemos proceder a la evaluación de la calidad de la semilla. Este proceso se realiza con la ayuda de un microscopio para observar las diferentes estructuras de las semillas de las orquídeas que se han recolectado. Se identifica la calidad, esto es por medio de la cantidad de semillas con embriones, los que deben encontrarse completos. Es importante conocer que dentro de la capsula se tiene porcentajes de semillas con embriones viables, poco desarrollados o poco viables; y, por supuesto, semillas sin embriones. Se puede proceder a realizar la prueba de tetrazolium para verificar la viabilidad de las semillas, previo a proceder a la siembra o al almacenamiento. (Seaton, et al., 2009).



Fotografía 16 y 17: Observación de semillas a través del microscopio y semillas con embriones viables.

Fuente: Paola Cruz Jaramillo. (2011)

a. Cosecha y almacenamiento de la semilla.

Para proceder a la cosecha debemos tener en cuenta los días que han transcurrido desde la siembra y por medio de bibliografía conocer los días de maduración del fruto por especies, para detectar correctamente época de cosecha del fruto y no perder la semilla. Para mantener la viabilidad, se guarda deshidratada la semilla evitando que tome humedad a -20 °C de temperatura. (Seaton, et al., 2009).



Fotografía 18: Cosecha y etiquetado de las capsulas para su almacenamiento.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2008)

El secado de las semillas se pueden realizar de distintas maneras: si no se tiene los diferentes productos químicos que se aplican dentro de grandes laboratorios, como es el cloruro de calcio o cloruro de litio que sirven para el secado de las semilla, se puede sustituir estos reactivos por granos de arroz secados al horno a una temperatura de 105°C; la semilla del arroz se deben colocar en un frasco sellado por 4 a 6 días. Proceso que se debe realizar con la semilla y el arroz, cada vez que se quiera secar un nuevo grupo de semillas.



Fotografía 19. Secado de semillas con granos de arroz.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2007)

En los grandes laboratorios se puede tener las siguientes opciones para el secado de las semillas: las semillas debemos introducirlas por 3 o 4 días en cloruro de calcio o cloruro de litio saturado. Para reducir la humedad de las semillas de 5 a 6 % se puede utilizar cloruro de calcio a una temperatura de 20°C, aunque podemos utilizar cloruro de litio que produce mejor resultado.

Se puede utilizar diferentes tipos de gel para el secado, recalmando que estos pueden ser perjudiciales para la salud de quien o quienes intervienen en estos procesos; no se recomienda utilizar sílica gel azul/rosa, que actualmente ha sido remplazado por la sílica anaranjada, cuya característica

es cambiar de color a translucido, al absorber humedad. (Seaton, et al., 2009).

Luego de haber secado las semillas se procederá al almacenamiento, a una congelación a -20° C (Merchán, 2009).



Fotografía 20. Almacenamiento de las semillas de orquídeas.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2009)

b. Fuentes de semillas.

Las semillas se puede encontrar en banco germoplásmico el cual permite obtener semillas de muy buena calidad. Se pueden intercambiar semillas con instituciones dedicadas al cultivo de orquídeas como: Universidades, Jardines Botánicos, Empresas, que cumplen con los requisitos y estándares de calidad, como también mediante intercambio o compras



podemos evitar que dañen aun más la naturaleza y el hábitat de las orquídeas (Seaton, 2011).



Fotografía 21. Banco Germoplásmico de Inglaterra.
Fuente: Phil Seaton (2011)

3.7. Conservación de orquídeas

Tenemos dos tipos de conservación: la in situ y la ex situ, que igualmente aplicamos a las de orquídeas (Castillo, et al. 1991).

3.7.1. In situ

Esta conservación se basa en que las especies de orquídeas se conserven en cada hábitat, la misma que se produce sin perturbar su dinámica. Para este tipo de conservación se puede determinar varias estrategias como son: Preservar las orquídeas de una manera integral, no alterando su hábitat, clima y en general el medio ecológico en el cual se desarrollan.

Y preservando las especies silvestres en comunidades naturales (Castillo, et al. 1991).



Fotografía 22. Bosque nativo conservación in situ

Fuente: Phil Seaton. (2011)

3.7.2. Ex situ

Está conservación se realiza fuera de su hábitat y altera la dinámica de las especies, además de existir varias estrategias, podemos conservar y salvar especies que estén en peligro, preservándolas en invernaderos, controlando humedad y temperatura; utilizando técnicas como la conservación de germoplasmas, que almacenan partes de las plantas, para su estudio como son bancos de polen, bancos de clones, banco de semillas, bancos de propagación y conservación in vitro. (Castillo, et al. 1991).

En cualquiera de las dos formas descritas, podemos tener beneficios y aportar de manera eficiente a las necesidades de

la naturaleza, que actualmente es una necesidad para poder sobrevivir en armonía con ella.



Fotografía 23. Invernadero. Facultad de Ciencias Agropecuarias conservación ex situ.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2011)

3.8. Reseña histórica del cultivo de tejidos

Esta técnica comienza con las prácticas que se producen por heridas que se encontraron en árboles descortezados, en los cuales se aplicaban la técnica de injertos; al producirse una herida en los árboles éste producía una serie de células no identificadas, que actualmente conocemos como callos, y a partir de éste experimento, se lo aplicó en otras plantas. La falta de una base científica para determinar el desarrollo que



hoy se conoce como la teoría celular, impide su aplicación de una forma adecuada (Pérez, 2006).

Los primeros experimentos realizados refieren a Duhamel du Monceauen el año de 1756, quien aplicó la teoría de los árboles descortezados, en árboles de olmo, observando el desarrollo de callos y yemas. Investigación que fueron seguidos y que le permitió determinar la existencia de abultamientos denominados callos; basado en la circulación de la savia, procedió a efectuar injertos y sellados de las heridas. Hoy sabemos que la formación de callos es la respuesta de varias plantas a las heridas (Pérez, 2006).

En la época de Trécul en el año de 1853, realizó experimentos basados en los anteriores, observando por medio del microscopio que los callos podían obtenerse a partir de diferentes tejidos como es el cambium, floema y otros. En el año de 1893 Rechinger experimento con raíces, tallos, y yemas que fueron colocadas en arena húmeda, para determinar el crecimiento de cada uno de los materiales (Pérez, 2006).

Los primeros resultados obtenidos fueron conocidos como callos, que llegaban a un límite de 1.5 mm y no crecían mas;



los otros materiales vegetales llegaron a un grosor de 20 mm y comenzaron a producir ocasionalmente yemas (Pérez, 2006).

Todos estos resultados, al no tener una base teórica científica, no sirvieron para formular hipótesis que permitan la posibilidad de poder cultivar aisladamente material vegetal. Con el descubrimiento de la toti potencia se genera nuevas visiones; la misma que es entendida como la capacidad que tiene una célula para regenerarse a partir de ella. Todos los diferentes tipos de células que componen un organismo multicelular tienen esta característica (Pérez, 2006).

Esta teoría fue dirigida por dos científicos alemanes, el botánico Matthias Jacob Schleiden en el año de 1838 y el zoólogo Theodor Schwann en el año de 1985, quienes formularon la teoría por la cual dicen que las células son la base de la estructura de los animales y plantas (Pérez, 2006).

Para comprenderla base de la toti potencia citamos un ejemplo: la forma de división que tiene el zigoto, que este contiene todo la información genética para formar un nuevo organismo (Pérez, 2006).



En el siglo XIX se dio uno de los más grandes descubrimientos, que cambio la visión de la mayoría de los científicos, al descubrir que las plantas no necesariamente pueden depender de un suelo para poder vivir; sino que lo podía hacer fuera de él, dándose a conocer el primer cultivo hidropónico, consistente en cultivar plantas sin suelo, a base de sales minerales que proporcionaban los nutrientes necesarios para su desarrollo (Pérez, 2006).

Con esto se dieron los primeros pasos para realizar el cultivo in vitro. En los años posteriores se cultivaron embriones zigóticos. En 1958, Thilo Irmisch realizó un intento para determinar el cultivo aislado, y propuso analizar su comportamiento frente a diferentes condiciones. Julios Sachs, en 1859 se realizó el primer cultivo de embriones aislados de judías en un medio artificial (Pérez, 2006).

Cabe destacar que al no tener las condiciones asépticas estos cultivos no se mantenían. Con el pasar de los tiempos se fue perfeccionando los elementos que conforma el cultivo in vitro, como es el medio de cultivo con todos sus componentes minerales para que cada unos de los tipos de cultivos tengan las condiciones adecuadas para multiplicarse adecuadamente;



se perfeccionaron las técnicas, condiciones adecuadas para aislar la contaminación del medio, etc. (Pérez, 2006).

En estos momentos existe tecnología muy avanzada, conocimientos científicos que nos permite adaptar cada unos de los tipos de cultivos a condiciones favorables y mantener estas plantas a salvo (Pérez, 2006).

3.8.1. Infraestructura adecuada para la micropropagación

El tratadista Roca, et al. (1991) su en obra “Cultivo de Tejidos en la Agricultura” se refiere a los siguientes procesos relacionados con las condiciones de infraestructura, técnicas y método aséptico de Micro propagación. Nos enseña que ésta área puede estar constituida por dos áreas conectadas entre si, o por un solo ambiente, y puede estar localizada dentro del área general de preparación. El área de esterilizado debe tener espacio para el autoclave vertical u horizontal, el cual puede ser pequeño (olla de presión) o grande (de carga frontal o vertical y de enfriamiento lento o rápido), según sea el volumen del material que se procese. El área también puede incluir espacio para estufa, secador destilador de vidrio,



gradillas para secado bandejas de aluminio y de plástico de varios tamaños y un lavador con agua caliente y fría.

a) Esterilización

Igualmente el tratadista, refiere que la esterilización es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie, este libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. Se dice que tales materiales o sitios son estériles o se han esterilizado.

b) La desinfección

Roca, et al. (1991) no enseña, que ésta se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos. Se utiliza la palabra *aséptico* como sinónimo de estéril.

c) Proceso de esterilización

Roca, et al. (1991) nos dice que es bien conocido, el éxito en el logro de esterilidad en cualquier preparación depende de



muchos factores, como es la naturaleza de la sustancias que se esterilizan, el volumen contenido en cada unidad, el tamaño del recipiente y el número de unidades que se puede manejar es una sola operación. Por consiguiente, no se pueden dar instrucciones específicas relacionadas con el método de esterilización que se utiliza para una preparación individual; en contraposición, se presentan sugerencias generales relacionadas con los procedimientos de esterilización.

d) Calor seco (estufa)

Roca, et al. (1991)nos relata que los recipientes de vidrio secos que se utilizan para operaciones estériles se pueden esterilizar por medio de aire caliente; para el efecto se colocan en una estufa de aire caliente a una temperatura mínima de 170º C, preferiblemente durante dos horas, pero nunca menos de una hora. El algodón (debidamente envasado) a menudo se esteriliza por intervalos más largos, ya que tiene a contener esporas altamente resistentes; pues que tanto el algodón como el papel toman un color marón a temperaturas de 190º C o superiores, para este material se debe usar una temperatura menor de 170º C, manteniéndolos bajo ella por lo menos durante un hora". Es obvio que los materiales esterilizados

mediante calor seco deberán estar limpios, e incluso libres de trazas de material orgánico.

e) Vapor de agua a presión (autoclave)

Roca, et al. (1991) describe que el vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias y hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo (siempre y cuando no contengan componentes termolábiles). La autoclave más utilizada actualmente en el laboratorio es la contraparte de mayor tamaño de la olla de presión común. Al utilizarlo, es necesario extraer todo el aire antes de empezar el proceso de esterilización ya que, a presiones iguales, la temperatura de una mezcla de aire y vapor no es tan alta como la del vapor puro; la extracción de aire se logra automáticamente al permitir que el vapor expulse el aire del aparato, antes de cerrar la válvula correspondiente. La temperatura dentro de la autoclave se regula mediante la presión y es directamente proporcional a ésta; la presión se lee en un manómetro que forma parte de autoclave. Para esterilizar los materiales relacionados con el cultivo de tejidos se acostumbra usar una presión de 15 lb durante 20 minutos; a



esta presión la temperatura del vapor es aproximado 121º C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida en cinco minutos. Sin embargo se debe recalcar que el tiempo de exposición requerido dependerá tanto del tipo del material que se va a esterilizar como de la cantidad. Si se desea que la esterilización sea completa, el calor debe penetrar en cada porción del material; ninguna sustancia es estéril si queda en ella un organismo viable o esporas. La siguiente es una guía para presiones variables.

10 lb de presión (115.5º C) durante 30 minutos

15 lb de presión (121.5º C) durante 20 minutos

20 lb de presión (126.5º C) durante 15 minutos

Para las operaciones mayores se recomienda colocar detectores de esterilización en diferentes puntos dentro de la autoclave o dentro de la masa de material que se trata, para asegurar de que todas las partes han alcanzado la temperatura deseada.

f) Calor húmedo a 100º C.



Roca, et al. (1991) nos enseña que con este método probablemente sea suficiente una sola exposición de 15 minutos al calor vivo (100° C) para matar todas las formas vegetativas microbianas. Sin embargo, así no se mata necesariamente todas las formas de esporas y pueden ser práctico, por consiguiente, efectuar la esterilización intermitente, siempre y cuando se disponga de cierto equipo. En este caso, la exposición puede ser de 30 a 60 minutos y se repite diariamente durante tres días consecutivos, conservando el material a la temperatura del cuarto o en una incubadora entre una exposición y otra. Teóricamente la primera exposición destruye todas las formas microbianas; durante las próximas 24 horas, generalmente germinan las esporas convirtiéndose en formas vegetativas que mueren en la segunda exposición; la tercera exposición es simplemente un medio de prevención para destruir las esporas vivas que hayan podido tener una germinación lenta. A veces el procedimiento se modifica utilizando temperaturas inferiores a la del agua hirviendo y aumentando el número de las exposiciones hasta cuando haya una seguridad razonable de esterilidad. Se utilizan temperaturas de 60 a 80° C y se repiten sucesivamente las exposiciones durante 4 a 7 días. Este método de calor húmedo a 100° C, conocido como “método de



Koch" se utiliza en la esterilización de medios que contienen componentes capaces de soportar la exposición a temperaturas de vapor vivo, pero no a las temperaturas mayores que tienen el vapor bajo presión. No obstante, este método no está exento de problemas; las esporas pueden no desarrollarse en las soluciones no nutritivas como el agua corriente, por lo cual se recomienda reemplazarlo, cuando sea posible, por el método de filtración; sin embargo se menciona, incluso en este caso, como una alternativa cuando no se dispone de las instalaciones o medios para esterilizar por filtración. En términos generales, los medios para el cultivo de tejidos de plantas son bastante ricos en componentes que pueden servir de sustento a los microorganismos y existen la posibilidad de que los contaminantes aparezcan durante los intervalos sucesivos.

g) Filtración

Indica que la esterilización de líquidos va acompañada rutinariamente de la filtración a través de filtros especiales a prueba de hongos y bacterias. Es claro que los filtros y otros aparatos se deben esterilizar antes de tratar de utilizarlos para remover los contaminantes de un líquido. Obviamente el tamaño de poros es el principal factor en la capacidad de



retención de bacterias de estos filtros; otros factores que afectan la penetrabilidad del filtro por los microorganismos son el pH, la carga eléctrica del material filtrado, la temperatura, la presión y la duración del procedimiento de filtración como el efecto de la absorción de proteínas y otras sustancias en el filtro; también puede haber contaminación en el filtro a causa de una presión excesiva en el filtro o de fugas de las líneas al vacío cuando se utiliza presión negativa. En el mercado se encuentra una amplia gama de aparatos de filtración entre los cuales está el “Millipore”. Se encuentra disponibilidad además los filtros desechables que, aunque costosos, pueden ahorrar tiempo y son pre-esterilizados.

h) Limpieza de los recipientes de vidrio

Roca, et al. (1991) explica que la limpieza de los recipientes de vidrios y otros utensilios es de importancia vital en el trabajo de cultivos de tejidos vegetales. Nunca se debe utilizar jabón debido a que este deja residuos grasos y puede ser uno de los contaminantes; cuando sea posible, se deben adoptar detergentes que se laven y enjuaguen fácilmente. Se debe utilizar agua caliente con el detergente, enjugar con agua caliente sola, hacerlos después con agua desionizada y



finalmente con agua destilada. Bajo circunstancias especiales pueden ser necesarios exponer los recipientes de vidrio a soluciones limpiadoras de ácido crómico, durante varias horas. Pero es necesario reconocer que sería imposible remover los iones de cromato residuales y que estos a su vez serían dañinos o tóxicos para las células y tejidos de las plántulas. Adicionalmente, las soluciones limpiadoras son peligrosas y se deben utilizar con cautela para evitar quemaduras y problemas de contaminación ambiental. Los residuos de iones de cromo se podría remover lavando con detergente, pero el proceso de limpieza se volvería a más intensivo en el uso de recursos humanos. También existen soluciones inorgánicas para el lavado, las cuales son tan efectivas como las soluciones de ácido crómico y, a diferencia de ellas, se dice que son inocuas para el medio ambiente.

3.9. Cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo in vitro, es un proceso complicado que requiere condiciones para su cultivo; manifestando que el término in vitro proviene de los primeros experimentos que se realizaron en vidrio, ya que en esa época se sembraba el material vegetal en matraces, tubos de ensayos, y erlenmeyers. El cultivo de

tejidos in vitro se basa en el cultivar, órganos, tejidos, células, embriones, y requiere de dos condiciones: la primera, controlar el ambiente en condiciones asépticas (eliminación de microorganismo del lugar que se va a trabajar) para evitar problemas posteriores como la contaminación de hongos, virus; la segunda, es determinar un medio nutritivo con las diferentes dosis de macro y micro elementos adecuados para sustituir los minerales que requiere la planta y que absorbe del suelo (Pérez, 2006).



Fotografía 24. Instrumentos que se necesitan en el laboratorio de cultivo de tejidos.

Fuente. Paola Cruz. (2011)



3.9.1. Importancia del cultivo de tejidos *in vitro*

Las técnicas que se utilizan dentro del el cultivo *in vitro* son muy importantes; y actuando en interrelación con otras ciencias como la ingeniería genética, ingeniería molecular, etc, podemos multiplicar gran cantidad de plántulas que en la naturaleza es muy difícil propagar e identificar; por esa razón requerimos de ellas y la tecnología adecuada para realizar el trabajo que nos propone estas técnicas, como es identificar por medio de ADN o propagar especies que están en peligro de extinción en el laboratorio; igualmente podemos producir sustancias de interés farmacológico o alimentario, para proveer a una sociedad de consumo que requiere de los mismos para subsistir.

Por todas estas consideraciones, es importante contar con instalaciones adecuadas y laboratorios en los cuales se debe estar equipados con la más alta tecnología; y aplicando todos los conocimientos científicos que los diferentes tratadistas nos han legado, poner en práctica la mircopropagación de orquídeas, especialmente para salvar la biodiversidad en nuestro país, ya que es muy extensa (Pérez, 2006).



3.9.2. Tipos de cultivos *in vitro*

El tratadista Pérez, (2006) en su obra “Cultivos de tejidos *in vitro*” nos enseña que los diferentes tipos de cultivos que se dan *in vitro* son:

- Cultivo de callos.
- Cultivo de células en suspensión.
- Cultivo de protoplastos.
- Cultivo fotoautotrópicos
- Cultivo de órganos

Dentro del cultivo de órganos se presenta la siguiente clasificación:

- Cultivo de meristemos
- Cultivos de yemas, segmentos nodales
- Cultivo de anteras y polen aislados
- Cultivo de flores, ovarios y óvulos
- Cultivos de embriones zigóticos
- Cultivos de embriones somáticos

De esta clasificación centraremos nuestro estudio en el cultivo de meristemos.



3.9.3. Cultivo de meristemos

Las primeras plantas saneadas a partir del cultivo de meristemos fueron obtenidas por Morel y Martin entre 1952 y 1957, a partir de cultivos de papa y Dalia, según refiere el tratadista (Rivero, 2007.)

El tratadista Roca, en su obra antes referida, manifiesta que en el año 1960, se desarrolló los procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos, período de tiempo en el cual recibió este procedimiento, un impulso dramático; ello se debió al descubrimiento de la capacidad que tiene las puntas de los brotes y los meristemos de las orquídeas *Cymbidium* sp. cortados apropiadamente y sembrados en cultivos asépticos, para producir protuberancias que semejan protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas.

Desde entonces se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemos de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de una punta de brote cultivado o de explante, en algunos casos, se



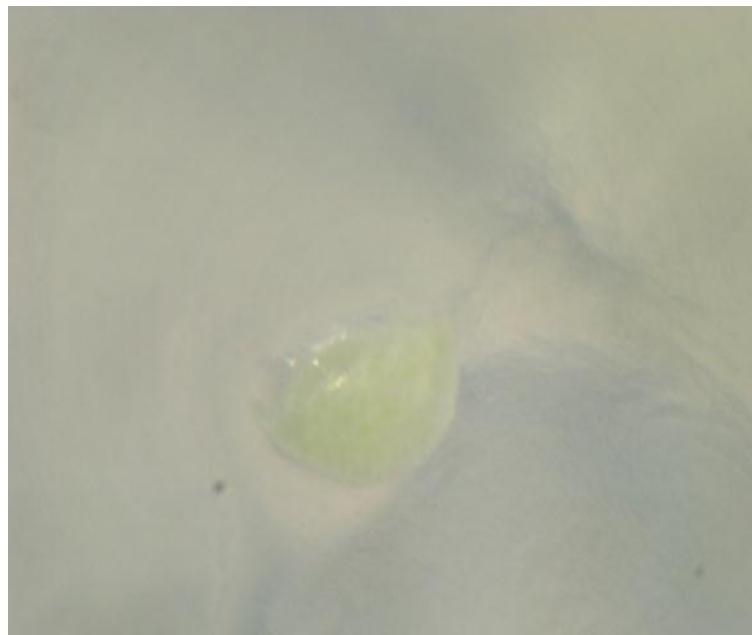
regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Pérez, 2006).

Se han realizado cultivos de meristemos, como es en el caso de banano, y como primer paso debemos realizar una buena extracción y en forma inmediata proceder a identificar correctamente el pseudotronco de la planta de banano; como segundo paso, se procede a separar el cormo de la planta, y se comenzará a realizar los cortes hasta identificar la parte apical en donde se encuentra el meristemo, luego se corta el meristemo y se siembra. Este meristemo es de 5 mm, aunque contiene primordios foliares, con estas dimensiones, si queremos tener plantas sin virus se tendrá que extraer correctamente el meristemo (Pérez, 2006).

En el caso de las orquídeas, es más complejo la extracción del meristemo, ya que se comienza a partir de la germinación de la semilla y brotes en desarrollo, posteriormente se identifica y se procede a la eliminación de hojas para encontrar la parte apical y reconocer al meristemo; al extraer el meristemo se siembra y hay que esperar que el medio sea el adecuado para obtener resultado positivo.



Para que esta técnica tenga mayor resultado, debemos considerar otros aspectos para conseguir los objetivos planteados en este campo, como es la aplicación de la termoterapia o la quimioterapia o en combinación termoterapia y cultivo de meristemos.



Fotografía 25. El meristemo
Fuente: Paola Cruz (2011)

a. El meristemo.

Son grupos de células indiferenciadas que retienen la capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida de una planta. Los meristemos determinan el crecimiento de la planta y dan origen a sus diferentes órganos. El cultivo de



meristemos facilita la eliminación de patógenos. El domo meristemático no está vascularizado (muchos patógenos se traslocan por los tejidos de conducción) por lo cual se utiliza para obtener plantas libres de virus. La velocidad de división celular a nivel del meristemo es mayor que la velocidad de replicación de un virus por esta razón podemos obtener plantas sin virus (Pérez, 2006).

El tratadista Rivero, nos enseña quela estructuración de los meristemos está conformada de la siguiente manera: al momento de su extracción debemos localizar la pared primaria, que generalmente se presenta de forma isodiamétrica y con gran actividad mitótica; luego determinamos la presencia del núcleo, que se localiza en la parte central, en donde encontramos vacuolas y citoplasma. Los meristemos siempre están en constante división por esta razón tenemos gran cantidad de meristemos que se pueden ver durante la citocinesis (Pérez, 2006).

b. División dentro de los meristemos

Existen tres divisiones dentro de los meristemos: una división anticlinal (es la división transversal); división periclinal (es la



división longitudinal); y la división oblicua (como su palabra lo dice oblicua o diagonal); esta división nos permite conocer que estructuras van a originar posteriormente; las mismas que pueden ser primordio o tallos. El meristemo apical es más complejo, el cual consta de una túnica, en las angiospermas, la túnica del meristemo está conformado por dos capas celulares; y, a su vez, la suma de varias capas de células se las denomina capas L1 (capa externa), L2 (capa interna), L3 (esta capa se denomina corpus, en esta capa hay varias divisiones específicamente las tres anteriores descritas), Luego podemos observar los primordios que son estructuras que cubren al meristemo apical, cuyo diámetro es de 0.1 a 0.2 mm y un altura de 0.1 a 0.5 mm. (Pérez, 2006).

c. Zonas de segmentación del meristemo

Así, como se encuentran divisiones en los meristemos, también tenemos zonas en las cuales se desarrollan segmentaciones importantes que son:

La zona ZC., que se distingue por tener células de mayor tamaño que el resto de las células del meristemo y se dividen con menos frecuencia que las otras células. Estas células se



denominan iniciales y producen las células que formarán las otras zonas denominadas derivadas de las iniciales.

La zona ZP., dispone de alrededor de ZC y está formada por células en rápido división, que formarán los primordios foliares y otros órganos laterales que puedan generarse en el meristemo.

La zona ZM., Situada por debajo de las otras zonas, esta también constituida, al igual que la ZP, por células con alta actividad mitótica. Las funciones principales de esta zona son, formar los tejidos de la zona central del tallo y los tejidos vasculares. Por debajo de la zona meristemática, se encuentra una zona de maduración.

A medida de que nos alejamos del meristemo, podemos observar que las células dejan de dividirse y comienzan a diferenciarse. Eso trae consigo la formación de la pared secundaria, la elongación celular, la aparición de una gran vacuola que relega el núcleo a la periferia. (Pérez, 2006).

3.10. Sanidad

La mayor amenaza para las orquídeas son los virus, que afectan a los géneros más populares. Debilitan a las plantas y suelen producir hojas con malformaciones, en ocasiones con

fallos en los colores. Las hojas muestran un moteado por ambos lados, o bien se distinguen un claro motivo con forma de diamante. Por desgracia, no existen remedios para las plantas infectadas, que deben eliminarse. Existen numerosas cepas que son propagadas por ácaros, cochinilla, áfidos y otros insectos chupadores y masticadores. (Banks, 2006).



Fotografía 26. Problemas virales en las plantas de orquídeas.

Fuente: Paola Cruz. (2010)

3.10.1. Los Virus

La infección vírica puede matar a una célula; los virus son, como mínimo, una carga para su huésped. Todos los organismos son susceptibles a la infección vírica, y según una estimación conservativa, existe 10clases de virus diferentes. La ubicuidad, la variedad y la destructibilidad de los virus han



motivado el estudio de su reproducción (Ringo, 2004). Uno de los virus más conocidos y más dañinos es el virus del mosaico de *Cymbidium* y el punto de anillo de *Odontoglossum* (Banks, 2006).

3.10.2. La termoterapia o tratamiento térmico

Consiste en elevar o bajar la temperatura para inactivar los virus de plantas enteras, órganos, tejidos, o meritemos. Cuando los virus son excesivamente dañinos, es preferible utilizar temperaturas altas, pero no solo se le utiliza para eliminación de virus, sino también para eliminar bacterias y micoplasmas. (Pérez, 2006). En el Cuadro 6 podemos observar unos ejemplos de la inactivación viral, el tiempo requerido y a que temperatura fue expuesto.

Cuadro 6. Tipos de virus y sus días de irradiación.

40 °C, 7 días	irradicación de Aimv
40 °C, 9 días	irradicación de Cmv
32 °C, 16 a 168 días	Virus detectados
32 °C, 46 a 48 días	Erradicación de

	virus

Fuente: Walkey, 1976.

3.10.3. La quimioterapia

Es la aplicación de productos químicos al medio de cultivo, lo que ocasiona una mayor probabilidad de obtener plantas libres de patógenos, por cuando se aplican diferentes productos quimioterapéuticos de manera exógena al medio de cultivo, estamos asegurando la obtención de material sano(Rivero, 2007).

Después de investigaciones realizadas se detectaron pocos antivirales, pero su precio es elevado, y adicionalmente se debemos detectar el virus para aislarlo y aplicar la dosis exacta. Los compuestos más usados son el **Virazole** (también denominado ribavirina) y **Vidarabina**; para utilizar estos químicos se debe identificar si la planta o el material vegetal está contaminado con virus, y al tener los resultado se procede a colocar por ejemplo el Virazole a una concentración de 35 mg/l; esta dosis es como ejemplo (Pérez, 2006).



Se deben realizar ensayos con diferentes dosis y con un parámetro de virus en una determinada planta. Al hacer el experimento se debe realizar prueba para detectar virus, ya para subir la dosis o eliminar las plantas por toxicidad (Pérez, 2006).

3.11. Técnicas del cultivo *in vitro*

3.11.1. Determinaciones

Dentro de la cámara de crecimiento nos encontramos con una gama de efectos físicos que necesitan los ex plantes para sobrevivir, y ayudan a mantener las condiciones adecuadas para tener éxito en el presente trabajo. Estos factores son determinantes, ya que al no tener controlados, podemos perder años de investigación.

Los factores físicos que se necesita son:

a) Temperatura:

Para determinar correctamente debemos tener en cuenta la procedencia de cada uno de los ex plantes y plantas que se producen *in vitro* y provienen de los trópicos; quienes necesitan una mayor cantidad de temperatura para su

desarrollo y crecimiento el rango se encuentra entre los 28 y 29 °C; para material vegetal proveniente de temperaturas bajas o que contengan bulbos es necesario tener una temperatura de 18 °C, pero en la mayoría de laboratorios se tiene una temperatura promedio de 24-25 °C. (Pérez, 2006).



Fotografía 27. Instrumentos de control, de temperaturas en el laboratorio de tejidos.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2009)

b) Intensidad de luz.

La luz es uno de los factores más importantes, ya que de éste depende el desarrollo y el crecimiento de cada uno de los explantes la luz afecta de 3 maneras diferentes dentro del experimento.



- Como fuente de energía para la fotosíntesis.
- Como fuente de calor.
- Como fuente para el desarrollo de plantas y esto nos conduce a los procesos de foto morfogénesis.

Para mantener cada una de estas condiciones, lo más recomendable es tener energía artificial por medio de lámparas fluorescentes de color blanca; estas pueden colocarse de manera lateral o en la parte superior de donde se encuentran los frascos o tubos de ensayo. La localización de las lámparas fluorescentes depende del criterio que tenga cada investigador. Debemos manifestar que no solo depende de la luz el crecimiento de los ex plantes; debemos tener en cuenta el tipo de tapa y el recipiente a utilizar, como pueden ser de vidrio o plástico, ya que esto ayudara a definir correctamente la intensidad de luz necesaria e incluso la posición de los tubos fluorescentes (Pérez, 2006).



Fotografía 28. Intensidad lumínica.
Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2010)

Dentro de la luz tenemos tres aspectos que son:

- El fotoperiodo
- La Irradiación
- Composición espectral

Estos tres aspectos nos ayudaran a determinar mejor las condiciones que se necesitan para tener un excelente cuarto de crecimiento (Pérez, 2006).

- El fotoperiodo

Es básicamente la cantidad de horas luz y oscuridad que recibe el explante por ejemplo tenemos que para cultivos in



vitro se utiliza, 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad o 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad. Para tener mejores referencias de qué cantidad de luz y oscuridad necesita cada uno de los experimentos es necesario realizar prácticas con estos parámetros y así determinar correctamente las necesidades para cada uno de los experimentos ya que no todos son iguales por ejemplo en explantes de melocotón se trabajan con 4 horas de luz 2 horas de oscuridad con este fotoperiodo de luz determinaron crecimientos de tallos significativamente. En el caso de las orquídeas se necesita determinar correctamente el fotoperiodo, ya que estas pueden ser extremadamente sensibles a la longitud luz, estos casos se encuentran en semillas dentro de la cámara de crecimiento.

Para una mayor agilidad de trabajo se puede determinar un rango estándar que sirva para todo los trabajos de investigación que se encuentren en la cámara, lo cual nos ayudará a ahorrar una mayor cantidad de energía y podremos dar adecuadamente la luz necesaria que necesita un investigador (Pérez, 2006).

- La irradiación



Es simplemente la cantidad de luz que fluye a través de fotones que inciden sobre una superficie a un determinado tiempo (Pérez, 2006).

- **La composición espectral**

Es la coloración de cada una de las lámparas que irradian la luz para toda la cámara de cultivo. Normalmente se utilizan lámparas de luz roja-anaranjada pero los mejores resultados se han observado al ocupar lámparas de sodio, hay también lámpara que irradian luz (LED) la cual se trata de tipos de luz de color azul, roja o roja lejana estas lámparas puede ahorrar energía. (Pérez, 2006)

Estos diodos son de costo bajo, ocupan un volumen pequeño, tienen larga vida y podrían ser una alternativa práctica a los sistemas convencionales. Las investigaciones con cultivos sometidos a luz de diferentes longitudes de onda ponen de manifiesto los resultados sobre la Fisiología de las plantas que han notorio que la luz no solo es solo fundamental para la realización de la fotosíntesis o como fuente de calor sino que además, juega un papel importante como Factor de reguladores de crecimiento y desarrollo vegetal. (Pérez, 2006).



En diversas especies la luz roja (600 nanometros) promueve la formación de yemas adventicias y en ciertos casos, también raíces adventicias. Estos efectos son producidos por el Fitocromo. En el caso de la luz azul la mejor para estimular el crecimiento en algunos sistemas. Los foto receptores de luz azul, se denomina criptocromos, conociéndose hasta el presente, dos moléculas de este tipo en las plantas. La luz blanca (poli cromática) generalmente es mejor para la formación de tallos adventicios pero puede inhibir el crecimiento de raíces adventicias. (Pérez, 2006).

3.12. Vitrificación o Hiperhidridicidad

El término vitrificación, hasta hace algún tiempo atrás, se refería a una enfermedad bioquímica que actualmente conocemos como hiperhidridicidad; y se le conoce como vitrificación al proceso que involucra la transformación de la fase líquida de las células y tejidos vivos en una fase vítreo o amorfa, como consecuencia de la sustitución del agua de dichos tejidos, por ciertas sustancias crioprotectoras. Esto impide la formación de grandes cristales de hielo evitando así, el daño por congelación.



La hiperhidridicidad que se define, como un conjunto de síntomas fisiológicos, morfológicos, anatómicos y ambientales, que pueden aparecer en cultivos in vitro o en plantas procedentes de cultivos in vitro, como consecuencias de ciertas condiciones del cultivo. Esta enfermedad, es un problema grave dentro de la Micropropagación, ya que se pierde el 60% de las vitro-plantas producidas dentro del laboratorio; y por cuanto estos datos son elevados, deberemos tomar muy en cuenta esta enfermedad al momento de realizar un protocolo de trabajo dentro del laboratorio.

Los primeros síntomas que presentan en las plantas son: hojas y tallos con aspectos translúcidos, plantas más gruesas en sus tallos (se debe a problemas en la médula y células corticales); se encuentra una elongación, y se rompen con facilidad en referencia a las plantas normales. Al avanzar esta enfermedad podemos constatar las malformaciones e incluso deficiencias de clorofila, esto se produce por problemas en las granas y estomas (estos pueden estar tapados por depósitos de calosa), y esto se verifica en los tejidos.

Causa probable para la presencia de esta enfermedad, es los altos niveles de etileno, causado por el estrés que tienen los



explantes al momento de ser sembrados en in vitro, o encontrarse en un medio liquido, tener condensaciones dentro del recipiente, y en especial la alta humedad relativa. La presencia de hipolignificación, es el resultado de los bajos niveles de compuestos fenólicos, alteración en la actividad enzimática y desordenes metabólicos (esto se da por estrés oxidativo, anoxia, deficiencia en ciertos elementos minerales, alteraciones en la peroxidasa, y cambio en la poliaminas) (Pérez, 2006).

Estos síntomas se resumen en cuatro aspectos principales:

- Elevada transpiración.
- Escaso crecimiento.
- Baja tasa de multiplicación enraizamiento y aclimatación.
- Facilidad para adquirir enfermedades.

Otra causa de este problema, es el medio de cultivo, cuando tiene ciertas características:

3.12.1. Consistencia del medio productora de vitrificación



Que depende de la concentración y tipo de agar que se utilice, cuando más baja es la concentración de agar, más posibilidades de tener plantas con hiperhidrididad, en la propagación de explantes.

3.12.2. Sistema de doble fase

Que consiste en colocar sobre el medio de cultivo sólido un medio de cultivo líquido, el cual acelera la enfermedad.

3.12.3. Concentración y tipos de reguladores de crecimiento

Cuya importancia radica en su utilidad dentro del laboratorio, donde se trabaja con diferentes dosis de citoquininas y auxinas/citoquininas; y al tener altas concentraciones y utilizar Phitagle, puede activar la enfermedad, por lo cual se deben ser dosificadas con cuidado para cada micropopagación que se vaya a realizar. Esta enfermedad podemos evitar si tomamos en cuenta las recomendaciones efectuadas, especialmente si se complementan con la utilización de recipientes dentro del laboratorio, ya que si estos no permiten el intercambio de gases se producirá un aumento en el contenido de agua,

etileno y dióxido de carbono en el interior del recipiente favoreciendo la precipitación de la enfermedad. (Pérez, 2006).

3.12.4. Humedad

Dentro de la cámara necesitamos una humedad entre 50 – 60 %, por su importancia debido a que el momento que suben los niveles de éste podemos tener problemas críticos que se producen normalmente en el laboratorio como es la contaminación de bacterias, hongos etc. La humedad es alta en el interior de cada uno de los frascos, lo que puede producir deformaciones en el material como es el daño de hojas; se puede producir deshidratación por la supresión de transpiración que se encuentran en los frascos; al presentarse estos problemas podemos tener deficiencia en Ca, por lo cual se debe tener tapas adecuadas para intercambiar los gases que se encuentran en el interior con el exterior (Pérez, 2006).



Fotografía 29: Efectos de la humedad sobre los explantes de orquídeas

Fuete: Paola Cruz. (2010)

3.12.5. Recipientes

Los recipientes que se utilizan dentro del laboratorio son de acuerdo a las necesidades del experimento que se van a realizar, por ejemplo, los tubos de ensayos los podemos utilizar no solo con medio sólido, sino también con medio líquido para siembra de meristemos; igual podemos utilizar cajas petri para siembras de semillas de orquídeas con el método del sobre de Phil Seaton, elermeyer; con medio líquido para siembra de meristemos, yemas, brotes, se recurre a los frasco para siembra de semillas de orquídeas, cuando se quiere producir una gran cantidad de explantes, ya que en los frascos se tiene la capacidad requerida. Los recipientes deben ser adecuados para autoclavado (Pérez, 2006).





Fotografía 30 y 31. Recipientes utilizados para el laboratorio.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B.(2009)

3.13. Asepsia y esterilización del material vegetal

Para obtener un buen cultivo in vitro, se requiere de condiciones asépticas necesarias, no solo es en la limpieza del área del laboratorio, sino también en la desinfección de los explantes.

Debemos desinfectar el material vegetal con el que se va a realizar el experimento, ya que en el campo existe contaminación superficial, por el medio en que se desarrolla y por las condiciones en las que se encuentran. Para la desinfección de los explantes, se puede utilizar detergente (limpieza de zonas grasosas), cloro (desinfección completa de hongos). (Pérez, 2006).



Fotografía 32. Eliminación de residuos del material vegetal.
Fuente: Paola Cruz. (2010)

El aire, uno de los factores que debemos cuidar para evitar la contaminación; en el ambiente encontramos microorganismos para desinfectarlo; debiendo tener en cuenta las lámparas de luz ultravioleta, para esterilizar el ambiente del cuarto; y para la manipulación del material se necesita una cámara de flujo lamina; se recomienda verificar constantemente los filtros que mantienen el aire limpio, de esa manera contrarrestamos los efectos de la contaminación. (Guachizaca, 2011).

Debemos tener presente las siguientes recomendaciones para la esterilización:

Para la esterilización del medio de cultivo, tener en cuenta los componentes del mismo, ya que pueden ser termolábiles, y la mayoría de medios se esterilizan en autoclave.

Los instrumentos como por ejemplo, pinzas largas, pinzas cortas de diferentes puntas, mangos de bisturís, cajas petri, papel, frascos, para cada experimento deben ser esterilizados, ya sea en seco a 180 °C, por dos horas, o en húmedo a 121 °C por 20 minutos. (Guachizaca, 2011).



Fotografía 33 y 34. Eliminación de patógenos por medio de luz ultravioleta y Tipo de Autoclave

Fuente: Ing. Francisco Merchán Ing. Iván Guachizaca. (2011)

3.14. Medio de cultivo.

Es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, que usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplemento con algún regulador de crecimiento y

ocasionalmente con otras sustancias. Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir. También se añaden azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas, cuando se desarrollan en condiciones *in vitro*. Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener. Debido a estas condiciones específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivos. (Penacho, et al. sf).

El tratadista Hartmann, T. et al., (1968) nos dice: que además que los nutrientes requeridos en el medio de cultivo varían con la clase de plantas y con el propósito del cultivo. Las sustancias necesarias pueden agruparse de modo conveniente en varias categorías.



Fotografía 35. Medio de cultivo para cultivar en *in vitro*

Fuente: Paola Cruz. (2011)

3.14.1. Tipos de medio de cultivos

- a) **Medio sólido:** Este medio se lo puede utilizar para la siembra de, semillas de orquídeas, trasplantes, repiques, cultivo de callos, regeneración de plantas, cultivo de meristemos, etc.
- b) **Semi-líquido.** -Este medio se utiliza para el cultivo de antera de arroz, crecimientos de callos de *Stylosanthes guianensis*, etc. (Pérez, 2006).



Fotografía 36. Medios de Cultivo sólidos
Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2008)

- c) **Líquido:** Este medio se usa usualmente cuando se necesita tener en agitación constante para tener un mayor rendimiento en crecimiento y desarrollo, como por ejemplo, en cultivo de protoplastos, cultivo de meristemos

si no se va a cambiar constantemente al material vegetal
(Pérez, 2006).



Fotografía 37: Medio líquido.
Fuente: Paola Cruz (2011)

3.14.2. Medios definidos

Como su palabra lo dice ya están determinados con sus exactas dosis de macro y micro, elementos para cada requerimiento de los experimentos; dentro de estos medios tenemos los siguientes:

- **Murashige y Skoog,**
- **Phytamax,**
- **Schenk y Hildebrandt,**



- **Loyd y Mc Cown,**

Woody Plant Medium, este medio es utilizado para plantas leñosas.

Cada uno de estos medios se encuentra con facilidad en el mercado. (Pérez, 2006).

**Cuadro 7. Formulación de medios de cultivos definidos.
Concentraciones en mg/l**

SALES INORGANICA	P 6793		K 4003		M 8280		L 0270	
	100%	35%	100%	35%	100%	35%	100%	35%
Clorhidrato							0.05611	0.0196385
Nitrato de	825.0	288.75						
Sulfato de			500.0	175.0			1000.0	350.0
Acido bórico	3.1	1.085	0.056	0.0196	6.2	2.17	1.014	0.3549
Clorhidrato	166.0	58.1			332.2	116.27		
Nitrato de			694.4	243.04			347.2	121.52
Clorhidrato	0.0125	0.004375			0.025	0.00875		
Sulfato	0.0125	0.004375	0.0624	0.02184	0.025	0.00875	0.019	0.00665
Aci de Na,	37.24	13.034			37.3	13.055		
Citrato férrico							4.4	1.54
Sulfato	27.85	97.475	25.0	8.75	27.8	9.73		
Magnesium	90.35	316.225	122.125	427.437	180.7	63.245	58.62	20.517
Sulfato de	8.45	29.575	5.682	1.9889	16.9	5.915	0.0515	0.018025
Trióxido de			0.016	0.0056				
Molybdicacid	0.125	0.04375			0.25	0.0875		
Clorhidrato							0.03116	0.010906
Clorhidrato							1050.0	367.5
Potassium	0.415	0.14525			0.83	0.2905	0.099	0.03465
Nitrato de	950.0	332.5			1900	665		
Fosfato de	85.0	29.75	250.0	87.5	170	59.5	135.0	47.25
Nitrato de					1751	612.85		
Sulfato de	5.3	1.855	0.331	0.1158	8.6	3.01	0.565	0.19775



ORGANICOS							
Agar		6,5		6,5		6,5	
Myo-inositol		100		100		100	
Nicotinic acid		0,5		0,5		0,5	
Peptone	2000.0	2000.0		2000.0		2000.0	
Pyridoxine		0,5		0,5		0,5	
Sucrose		7000		7000.00		7000.00	
Thiamine HCl		1		1		1	

Fuente: Plant tissue culture. SIGMA p 74, 75

3.14.3. Medios indefinidos.

Dentro de esta clase tenemos el medio casero, el cual no está determinado correctamente y se puede dar uso de las dosificaciones de acuerdo a las necesidades del experimento (Merchán, 2010).

a) Ingredientes para la realización del medio casero.

- Maicena 80 g
- Banano maduro 100 g
- Tomate cherry 5 o 100 g de tomates
- Agua de coco 50 cc
- Carbón activado 1 g o carbón vegetal molido
- Azúcar 15 g



- Fertilizantes 20 20 20 y 30 10 10 1 g de c/u. (Merchán, 2010).

b) Proceso de preparación del medio casero:

- Cocine por 15 minutos en 400 cc de agua el tomate y guíneo.
- Licue y tamice la mezcla anterior.
- Cocine por 5 minutos la maicena.
- Ponga todos los ingredientes en un recipiente (Agua de coco, carbón activado, azúcar y el fertilizante con sus respectivas dosis) y afores a 1 litro. Homogenice o licue.
- Ponga en los frascos de 30 a 40 cc de medio.
- Ajuste el pH con cinta para pH.
- Esterilizar en: Autoclave, Olla de presión a 15 libras por presión al cuadrado lb/p² por 15 minutos o en microondas (Merchán, 2010).

3.14.4. Componentes del medio de cultivo.

Los componentes básicos del medio se determinan de la siguiente manera.

- Macro-elementos.



- Micro-elementos.
- Sales minerales.

Otro de los elementos básicos es el agua, este elemento no se toma mucho en cuenta, pero es de gran importancia, ya que este aporta los beneficios suficientes para elaborar el medio de cultivo. Se recomienda utilizar agua destilada para la realización y evitar problemas con el pH. (Pérez, 2006).

a) Macro-elementos.

Son sustancias que las plantas necesitan en gran cantidad para su desarrollo como por ejemplo:

- *Nitrógeno.*

Influye directamente en el crecimiento de la planta, elemento esencial para formación de proteínas, clorofila, amino ácidos.

Fuente: nitrato de amonio (NH_4NO_3) sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Deficiencia: hojas cloróticas poco crecimiento

Exceso: crecimiento vigoroso de hojas color verde muy intenso (Vaca, 2011).



- *Fósforo.*

Abundante en tejidos meristemáticos. Constituyente de ADN y ATP es esencial para la fotosíntesis y tiene efecto en la maduración de las raíces.

Fuente: fosfato de potasio (KH_2PO_4) fosfato de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Deficiencia: enanismo y malformaciones en las hojas (Vaca, 2011).

- *Potasio.*

Necesario para la división celular y promueve el crecimiento meristemático. Ayuda la síntesis de proteínas, clorofila y reduce nitratos.

Fuente: nitrato de potasio KNO_3 fosfato de potasio KH_2PO_4

Deficiencia: plantas anormales con hojas con pecas enrolladas o de filos muertos (Vaca, 2011).

- *Calcio.*

Componente de la pared celular controla y facilita el movimiento de carbohidratos y amino ácidos por la planta y



promueve el desarrollo de raíces. Ayuda en la asimilación de nitrógeno.

Fuente: nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Deficiencia: muerte de brotes o raíces. Brotes blanco (Vaca, 2011).

- *Hierro.*

Síntesis de clorofila y en la respiración

Fuente: Sulfato de hierro $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mezcla frecuentemente con Na_2EDTA)

Deficiencia: hojas jóvenes cloróticas entre las venas poco crecimiento

Exceso: crecimiento vigoroso de hojas color verde muy intenso (Vaca, 2011).

- *Magnesio.*

Elemento central de la molécula de clorofila, importante activador enzimático

Fuente: Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Deficiencia: hojas maduras amarillentas rojizas (Vaca, 2011).

- *Azufre.*



Constituyente de algunas proteínas ayuda a la coloración verde de las hojas.

Fuente: complemento de otras sales sulfatos.

Deficiencia: Crecimiento muy lento, sobre todo de brotes.
(Vaca, 2011).

b) Micro-elementos.

Son sustancias que las plantas necesitan en mínimas cantidades pero al sobrepasar la dosis podemos producir una toxicidad para el material vegetal.

Estos elementos son:

- *Boro.*

Elemento que facilita el movimiento de azúcares agua y hormonas, y está involucrado en el metabolismo del nitrógeno y división celular.

Fuente: Cloruro de Calcio.

Deficiencia: deterioro de tejidos internos, enrolamiento intenso de hojas cloróticas.

Exceso: daños severos a la planta y muerte (Vaca, 2011).

- *Cloro.*



Elemento que estimula la fotosíntesis, además muy necesario para el crecimiento.

Fuente: Ácido bórico $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Deficiencia: hojas marchitas de color amarillo a bronce y posteriormente mueren.

Exceso: daños severos a la planta y muerte (Vaca, 2011).

- *Cobalto.*

Elemento presente en el complejo B12, esencial para la fijación de nitrógeno, (nitrógeno atmosférico en nitratos).

Fuente: Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

No se ha demostrado que sea esencial (Vaca, 2011).

- *Cobre.*

Elemento necesario en la conversión de energía, síntesis de clorofila y se encuentra en varias enzimas.

Fuente: Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Deficiencia: crecimiento deficiente, malformaciones, hojas decaídas y manchadas.

Exceso: tóxico para la planta (Vaca, 2011).

- *Yodo.*

Elemento que es componente del amino ácido, no se lo considera como elemento esencial



Fuente: Yoduro de potasio KI

Exceso: toxico para la planta (Vaca, 2011).

- *Manganoso.*

Elemento fundamental en la membrana de los cloroplastos

Fuente: Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Exceso: Tóxico para la planta en medios con pH ácido (Vaca, 2011).

- *Molibdeno.*

Ayuda a convertir el nitrógeno en amonio ayuda a la fijación de nitrógeno, necesario para la síntesis de proteínas.

Fuente: Molibdato de sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Deficiencia: cuando se presentan venas de color amarillo

Exceso: cantidades superiores a 10 ppm son dañinas para la planta (Vaca, 2011).

- *Zinc.*

Activador enzimático involucrado en la formación de la clorofila así como en la producción de AIA.

Fuente: Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Deficiencia: Raíces anormales y hojas punteadas de color amarillo o bronce.



Exceso: tóxico para la planta. (Vaca, 2011).

c) Compuestos orgánicos:

- *Sucrosa.*

Es un producto indirecto de la fotosíntesis, las plantas in vitro no son capaces de fabricar todo el azúcar que necesitan por ello generalmente se añade en grandes cantidades.

Fuente: Azúcar de caña, remolacha. (Vaca, 2011).

- *D-Mannitol y D-Sorbitol.*

Azúcares, alcohol, usados como reguladores osmóticos y primeros carbohidratos traslocables en algunas plantas (Vaca, 2011).

- *Adenina vit B4.*

Componente importante de los ácidos nucleídos tiene efecto como una citokinina débil.

Efecto: Vitamina útil para promover la formación de brotes.

Fuente: Sulfato de Adenina (Vaca, 2011).

- *Tiamina.*



Actúa como coenzima para asistir a los ácidos orgánicos en el ciclo del ácido cítrico (respiración)

Fuente: Tiamina HCl (Vaca, 2011).

- *Inositol.*

Azúcar, alcohol del complejo B, es una forma de fosfato y es parte de algunas membranas como en los cloroplastos.

Efecto: No es esencial pero es beneficioso al cultivo in vitro de tejidos.

Fuente: myo-inositol (Vaca, 2011).

- *Acido Nicotínico.*

Es un componente de las coenzimas que actúan en la reacción de luz-energía (Vaca, 2011).

- *Piridoxina.*

Tiene su función también como coenzima en varias reacciones metabólicas

Fuente: Piridoxina HCL (Vaca, 2011).

- *Acido Ascórbico.*

Tiene cierta capacidad desinfectante y se lo usa como antioxidante para prevenir la producción de fenoles



Restricción: No se debe usar por largos periodos ya que se convierte en un oxidante por si mismo (Vaca, 2011).

- *Pantotenato de Calcio.*

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas, pero es necesario añadir al medio algunas vitaminas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina, y el ácido nicotínico se consideran benéficos y se añaden de forma rutinaria (Roca, et al. 1991).

d) Reguladores de Crecimientos:

Auxina.

Roca, et al., (1991), nos enseña que las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Existen varias auxinas llamadas “naturales” que incluyen AIA (ácido 3-indolacético). También se utiliza ampliamente un buen número de sustancias que provocan



un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas “auxinas sintéticas”, como el 2,4 D, el ANA (1 ácido naftalen acético) y el IBA (3 ácido indol butírico) se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente. En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina, que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, comúnmente se utiliza el ANA, en concentraciones levemente mayores 1mg/litro como máximo.

- *Acido Dicloro Fenoxi Acetico.*

Auxina sintética, usado ampliamente para la producción de callo (masa de células) (Vaca, 2011).

- *AIA (3 Acido Indol Acetico).*

Hormona mejor conocida por los propagadores de plantas, por ser buen promotor de raíces, frecuentemente usado para este fin en el medio de cultivo. Restricción: Sensible a la luz (Vaca, 2011).

- *IBA (3 Acido Indol Butirico).*



Auxina natural, promotora de enraizamiento más estable que el AIA, es la más usada. Restricción: en altas dosis se lo utiliza como herbicida (Vaca, 2011).

- *ANA (1 Acido Naftalen Acetico).*

Hormona inductora de enraizamiento, usada especialmente para promover el desarrollo de callo. Restricción: en altas dosis se lo utiliza como herbicida en productos comerciales (Vaca, 2011).

Citoquininas

Las citoquininas o citocinas constituyen un grupo de hormonas que promueven la división y la diferenciación celular. (Roca, W. et al. 1991). La primera citoquinina fue descubierta en 1950, en la Universidad de Wisconsin, por un grupo de profesores. Muchas citoquininas exógenas y todas las endógenas derivan probablemente de la adenina, una base nitrogenada de purina (Weaver, 1979 y Rodriguez, 2005).

- *BA. 6 BA 6 bencilladenina (6-BA, CAS 121-39-7).*



Es la primera citoquinina sintética. Puede inhibir la degradación de la clorofila, ácidos nucleicos y proteínas, promover la entrega de los aminoácidos, sales inorgánicas y reguladores del crecimiento. Ayuda a mantener la planta verde y retarda el envejecimiento. Puede ser utilizada en la agricultura, en el campo de la horticultura, las plantas en las diferentes etapas desde la germinación hasta la cosecha (Roca, et al. 1991).

- *BAP (6 Adenina O 6 Benzil Amino Purina)*.

Hormona sintética, usada ampliamente para promover el desarrollo de yemas axilares, se presume que se encuentra en la planta, pero difícilmente se la encuentra (Vaca, 2011).

- *2ip (2 Isopentenil Adenina)*.

Hormona sintética de amplio uso en los medios de cultivo, se ha encontrado en ciertas bacterias del género *Corynebacterium*, ésta produce rápida división celular y posible crecimiento irregular (Vaca, 2011)

- *Kinetina (6 Furfuril Amino Purina)*.



Regulador de crecimiento aislado del ADN se lo usa frecuentemente para promover la división celular (Vaca, 2011).

Giberelinas.

- Acido giberelico AG3.

Conjunto de sustancias naturales que influyen en el alargamiento celular y en la elongación del tallo. Se han identificado 3 o 4 giberelinas. Algunas, activas en la germinación de las semillas activadas por los embriones, que actúan sobre los almidones y su transformación en azucares. Utilizada ampliamente como complemento de las auxinas y citokininas (Vaca, 2011).

Agentes gelificantes.

- Agar.

Polvo que al entrar en contacto con el agua se convierte en un soporte suficientemente firme para sostener el explante. Y lo suficientemente suave para permitir un contacto adecuado entre el medio y éste. Medios con pocas sales u hormonas tienden a ser más duros y el movimiento de los nutrientes suele ser más lento.



Agar muy suave, posible causa de vitrificación o pH bajo 4.7 suelen ser suaves y agar con pH 5,8, suelen ser duros. Otros compuestos gelificantes como gelrite o phytigel pueden reemplazar al agar. Mezclas de estos –AGARGEL, agar y phytigel, pueden dar el efecto deseado por el investigador. Mezclas de gelrite con agar en proporción 3:1 o 5:1 son recomendadas (Vaca, 2011).

3.14.5. Proceso para la realización del medio de cultivo.

Para la realización del medio de cultivo se dispone de todos los componentes del medio macro y micro elementos, vitaminas, auxinas, citoquininas, azúcares, agar, y debemos elegir correctamente el medio de cultivo para las necesidades que se requiere dentro del laboratorio, para lo cual debemos contar con los equipos e instrumentos, cristalería adecuada, y equipo de esterilización (Merchán, 2011).

3.14.6. Técnica para la preparación del medio de cultivo.

Para la preparación de los medios se requiere un gran cuidado ya que al alterar los porcentajes podríamos dañar los cultivos.



Para ahorrar tiempo en la preparación, se dosifica soluciones madres de las cuales se pipetea volúmenes, que permite seguridad de la cantidad exacta de cada uno de los elementos, además de replicar en el tiempo con los mismos resultados. Se procede al pesado de cada uno de las sales que son compatibles, se diluyen en un vaso de precipitación pequeño y se afora a 100 cc, y se coloca en el recipiente, el cual va a contener todos los componentes del grupo, y se refrigerara. Posteriormente se procede a pipetear las solución madre, Ácido giberelico (G3), Myo-inositol, auxinas, citoquininas, vitaminas, y la sucrosa, se afora a un litro, se ajusta el pH, y la conductividad eléctrica, posteriormente se coloca el agar y se procede a calentar hasta diluirlo, se hace el dispensador en recipientes adecuados: frascos, tubos, elermeyer, y se realizara la esterilización del medio de cultivo (15°C por 15 minutos), se deja enfriar y llevar al cuarto de crecimiento para su utilización (Merchán, 2011).

3.14.7. Condiciones físicas del medio de cultivo.

a) El pH.

Es uno de los indicadores para verificar el equilibrio de los macro y micro elementos del medio. Cuando el pH de



encuentra por debajo de los 4 y por encima de 8 el medio no solidifica. Al ser bajo algunos reguladores de crecimiento, giberelinas y vitaminas, presentan menos estabilidad, y algunas sales pueden precipitar. El pH se debe ajustar, para subir el pH se coloca Hidróxido de sodio OH Na y para bajar se coloca Acido Clohídrico Cl H el pH debe quedar en un rango de 5,8 y 6.0 antes de esterilizar (Pérez, 2006).

b) Conductividad eléctrica, se manifiesta a través del siguiente cuadro:

Cuadro 8. Ejemplo de conductividad eléctrica para cada uno de los medios de cultivos.

MS. 4.9	8280 2.31	100%	M.S. 7.02	5524 3.44	100%
Murashige 2.31	S 5524	35%	Phytamax 3.44		75%
Phytamax 1.23 a 2		35%	Linderman 1.84		35%
Knudson 1.63		35%	Casero 0.43		35%

Fuente: Ing. Francisco Merchán.



3.14.8. Esterilización del Medio.

Después haber obtenido los datos de pH, y conductividad eléctrica, se procede a la esterilización; para este proceso se debe determinar las características del material a esterilizar, ya que de esto depende el tiempo, y el grado de temperatura que hay que mantener el material dentro de la autoclave.

La esterilización se realiza en autoclave, es un aparato similar a una olla de presión en la cual de combina la temperatura y la presión para eliminar cualquier microorganismo que se encuentre dentro de los frascos o en el medio de cultivo. En la autoclave se puede esterilizar cualquier material como por ejemplo recipientes de vidrio, papel, agua, el cual se esteriliza de 1 a 1.5 atmosferas de presión durante al menos 20 minutos, materiales plásticos, prolipropileno, polimetilpenteno, teflón. Para los medios de cultivos se procederá con una presión de 0.5 atmosferas durante 15 a 20 minutos (Pérez, 2006).



IV. Materiales y métodos.

4.1. Ubicación del lugar de la investigación.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Cantón: Cuenca.

Provincia: Azuay

Parroquia: Yanuncay.

Altitud: 2 584 m.s.n.m.

UTM: E 719768 N 9677340.

Temperatura Laboratorio (cámara del cultivo): 20 a 25 ° C

Precipitación promedio: 847 mm/año

4.2. Características de los laboratorios.

El laboratorio de tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias tiene una infraestructura adecuada para la realización del trabajo de investigación, posee las siguientes instalaciones:



4.2.1. Primer laboratorio.

Cuenta con los equipos necesarios para cada una de las etapas de la investigación. Para la realización de medios de cultivos se dispone de los siguientes equipos y los componentes que se necesitan para su estructuración: una autoclave, necesaria para la esterilización de papel, agua, cajas petri, medios de cultivos sólidos y líquidos.

Para la preparación de los medios de cultivo, se cuenta con un sin número de reactivos: (sales minerales), como nitratos, sulfatos, potasios, molibdatos, bromuros, componentes con hierro, vitaminas, giberelinas ácidos, y una balanza automática para medidas de peso; equipos para medición de pH y conductividad eléctrica.





Fotografía 38 y 39: Equipos y sustancias químicas con que cuenta en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2007)



Fotografía 40. Balanza automática del laboratorio.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2007)

El laboratorio dispone de una estufa, dos refrigeradoras, para mantener todo tipo de soluciones que se han preparado, y para almacenamiento de semillas.

Dentro de los instrumentos de vidriería, existen pipetas, cajas petri, erlenmeyer, frascos, balones de aforo, vasos de precipitación de diferentes medidas.

Cuenta con una bibliografía adecuada para la investigación del alumnado.



Fotografía 41: Estufa que se encuentra en el laboratorio.

Fuente: Ing. Francisco Merchán B. (2007)

4.2.2. Segundo laboratorio.

Cuenta con microscopios, estéreo microscopio, computadora, se encuentra almacenados los frascos para su utilización.

4.2.3. Tercer laboratorio.

Para el cultivos de tejidos, consta de dos zonas: en la primera zona es la que se encuentra el cuarto de crecimiento con todos los implementos necesarios como son iluminación,



temperatura, humedad, etc.; la segunda zona, está conformada por la cámara de flujo laminar, los instrumentos necesarios para la manipulación del material como son pinzas de todo tipo, agujas de insulina, vidriera, cabe indicar que todos estos equipos e instrumentos no salen de este laboratorio para prevenir contaminación, este laboratorio consta con luz ultra violeta la cual es necesario para desinfectarlo de microorganismos y mantener el área estéril.

4.3. Materiales y equipos del laboratorio para la realización de la investigación.

4.3.1. Materiales biológicos.

- Material vegetal de *Maxillaria grandis* para la extracción de los meristemos.

4.3.2. Materiales químicos.

- Sales para el medio de cultivo que se describen:
- ANA. Sigma (N 0640)
- IBA. Sigma (I 5386)
- G3. Sigma (G 7645)



- BA Sigma (B 9395)
- Agua estéril.
- Detergente.
- Hipoclorito de Sodio (Cloro).
- Alcohol etílico.
- Solución para los medio de cultivo.

4.3.3. Materiales físicos.

Equipos:

- Cámara de flujo laminar.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Estéreo microscopio.
- Medidor de pH.
- Conductímetro.
- Roseador para el alcohol.
- Refrigerador.
- Cámara de crecimiento (20 a 25 °C, 10 horas de luz, 14 horas de oscuridad, 400 pie/ candela para la primera etapa que comprende los 45 días y para la segunda etapa que comprende entre los 60 días y 132 días 537 pie/candela) y repisas a 50 cm con 2 lámparas



fluorescentes de 40 watts para la primera etapa y 4 lámparas para la segunda etapa.

4.3.4. Herramientas.

- Pinzas
- Mango de bisturí largo (hoja # 11)

4.3.5. Materiales.

- Probeta 100 cc
- Tubos de ensayo de 150 mm de largo x 16 mm de diámetro, tapas para tubos.
- Cajas petri
- Algodón.
- Vasos de precipitación de 50, 100 y 250 ml.
- Jeringuilla hipodérmica de 50 ml
- Agujas de insulina.
- Lámpara para alcohol.
- Mandil de laboratorio.
- Mascarilla.
- Cubre pelo.
- Papel estéril.



- Pipeta digital de medición en landas (ul)

4.4. Métodos.

4.4.1. Material experimental.

a. Taxonomía de la planta que se utilizará para la investigación.



La especie en estudio fue conocida antiguamente como *Maxillaria sanderiana* (Rchlo. F. ex. Sander). (Dodson, 2002). Actualmente se ha realizado una nueva clasificación y se la conoce como *Maxillaria gradis*. (Sanchez, 2010).

Reino Vegetal.

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Orchidales

Familia: Orquidaceae

Subfamilia: Vandoideae

Tribu: Maxillarieae

Subtribu: Zygopetalinae

Género : ***Maxillaria***

Gráfico 3: *Maxillaria grandis*
Fuente: Ángela Mirro.

Especie: *grandis*

La semilla fue obtenida del invernadero, cosechada deshidratada y congelada a -20 °C de la que se sembró el 30/07/10 en medio de cultivo Phytamax al 75%. Este material vegetal, se desarrollaba en el cuarto de tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. (Merchán, 2009).

Para el proceso de investigación los explantes in vitro fueron obtenidos de una altura entre 5 a 7 centímetros de altura, con una excelente fisiología y morfología, requerida al momento de la extracción de los meristemos.



Fotografía 42: Material vegetal para la investigación
Fuente. Paola Cruz. (2011)



4.5. Factores en estudio.

- Evaluación del Medio de Cultivo.
- Evaluación de diferentes dosificaciones de Auxinas (ANA, IBA); Citoquininas (BA).
- Desarrollo de los meristemos.
- Sobrevivencia de los meristemos.
- Número de tubos contaminados.

4.5.1. Tratamientos estudiados.

Se recurrió a utilizar los siguientes tratamientos en el proceso para el desarrollo de los meristemos.

- Phytamax 33.3 %+ G3 (Testigo).
- Phytamax 33.3% +G3+ BA con 4 dosis de Citoquininas 0, 0.25, 0.5 y 1 ppm.
- Phytamax 33.3% +G3+ ANA+ IBA con 3 Auxinas dosis 0.5, 1, 0.5, ppm.
- Phytamax 33.3% +G3+ ANA+ IBA+ BA Auxinas x Citoquininas con 3 dosis 1, 2, 1 ppm



Cuadro 9. Dosificaciones para los tratamientos de Auxinas

(ANA-IBA); Citoquininas (BA) en ppm.

Numero de Tratamientos	ANA	IBA	BA
T1	0	0	0
T2	0,25	0,5	0
T3	0,5	1	0
T4	1	2	0
T5	0	0	0,25
T6	0,25	0,5	0,25
T7	0,5	1	0,25
T8	1	2	0,25
T9	0	0	0,5
T10	0,25	0,5	0,5
T11	0,5	1	0,5
T12	1	2	0,5
T13	0	0	1
T14	0,25	0,5	1
T15	0,5	1	1
T16	1	2	1

Elaborado: Paola Cruz



Cuadro 10. Randomización de los tratamientos.

Numero de Tratamientos	ANA	IBA	BA
T13	0	0	1
T1	0	0	0
T5	0	0	0,25
T12	1	2	0,5
T2	0,25	0,5	0
T6	0,25	0,5	0,25
T3	0,5	1	0
T12	1	2	0,5
T1	0	0	0
T5	0	0	0,25
T4	1	2	0
T13	0	0	1
T2	0,25	0,5	0
T15	0,5	1	1
T8	1	2	0,25
T16	1	2	1
T9	0	0	0,5
T13	0	0	1
T11	0,5	1	0,5



T12	1	2	0,5
T2	0,25	0,5	0
T9	0	0	0,5
T3	0,5	1	0
15	0,5	1	1
T1	0	0	0
T5	0	0	0,25
T14	0,25	0,5	1
T5	0	0	0,25
T4	1	2	0
T12	1	2	0,5
T16	1	2	1
T7	0,5	1	0,25
T11	0,5	1	0,5
T14	0,25	0,5	1
T6	0,25	0,5	0,25
T9	0	0	0,5
T8	1	2	0,25
T6	0,25	0,5	0,25
T4	1	2	0
T11	0,5	1	0,5
T7	0,5	1	0,25
T15	0,5	1	1



T10	0,25	0,5	0,5
T8	1	2	0,25
T14	0,25	0,5	1
T16	1	2	1
T11	0,5	1	0,5
T2	0,25	0,5	0
T13	0	0	1
T8	1	2	0,25
T10	0,25	0,5	0,5
T16	1	2	1
T4	1	2	0
T6	0,25	0,5	0,25
T1	0	0	0
T14	0,25	0,5	1
T10	0,25	0,5	0,5
T3	0,5	1	0
T9	0	0	0,5
T3	0,5	1	0
T10	0,25	0,5	0,5
T15	0,5	1	1

Elaborado: Paola Cruz

4.5.2. Diseño experimental.



El diseño experimental que se utilizó para esta investigación fue un arreglo factorial de 4 x 4 con 6 repeticiones.

4.5.3. Características de la unidad experimental.

Cada unidad experimental fue conformada por un tubo de ensayo con tapas de algodón y papel aluminio, con una dimensión de 150 mm de largo por 16 mm de diámetro con seis repeticiones por cada tratamiento, se ubicaron en el cuarto de crecimiento dentro del laboratorio, con las condiciones adecuadas de horas luz 6-8 pm, temperatura 20°C-25°C, humedad 50% - 60%, para las primeras etapas que fueron a los 9 días, 15 días, 30 días y 45 días después de la siembra se utilizó luz de 2 lámparas fluorescentes, para el restos de etapas como fueron a los 60 días, 75 días, 90 días se utilizó la luz de 4 lámparas fluorescentes a 50 cm de altura para que el meristemo continuo con su desarrollo.

4.5.4. Esquema del análisis Estadístico.



Se realizó los análisis de Variancia (ADEVA) para tratamientos, efectos o factores principales e interacción entre los factores determinados los cuales son:

Factor 1.- Auxinas

Factor 2.-Citoquininas

Factor 3.- Auxinas + Citoquinina

4.5.5. Prueba de Significación.

Se realizó la prueba de significación de Tukey al 5% para las variables que resultaron significativas o altamente significativas, para observar si la muestra representa al universo y con qué margen de error lo hace, para obtener una probabilidad que lo encontrado en la muestra es real o al azar.

4.5.6. Manejo de la investigación, recurrimos a las siguientes fases:

- a. **Primera fase.**-Se preparó los reactivos y soluciones de acuerdo a las dosis y concentraciones del medio de cultivo para la investigación.
- b. **Segunda fase.**-Se preparó los medios de cultivo de acuerdo a los tratamientos y número de repeticiones; dispensados en tubos.



- c. Tercera fase.**-Esterilización de materiales y medio de cultivo (vidriería, papel, agua, medio de cultivo) en auto clave.
- d. Cuarto fase.**-Preparación del material vegetal, laboratorio, estufa, cámara de flujo laminar, pinzas, bisturís, papel, para los frascos, flameado, y destapado, eliminación de medios de cultivo no aptos para la siembra.
- e. Quinta fase.**- Dentro del material vegetal se identificó los mejores explantes que se encontró en los frascos para la extracción de meristemas.
- f. Sexta fase.**- Extracción y siembra de meristemas dentro de la cámara de flujo laminar uso de papel estéril, bisturís, y jeringuillas hipodérmicas de insulina para el corte del meristemo, flameados de tubos, corte del agar para dejar el meristemo en el medio de cultivo, flameado del tubo, tapado, trasporte a la cámara de crecimiento cada uno de los tubos, mover los meristemas cada día y cambiar a nuevo medio.
- g. Séptima fase.**-Toma de datos.

4.5.7. Técnicas del manejo del ensayo.



Las técnicas que se realizó dentro de la investigación fueron proporcionadas por el Ing. Francisco Merchán B. impartidas dentro de la cátedra de Biotecnología y en práctica de laboratorio. Utilizamos como referencias bibliografía que contiene experiencias de varios investigadores. Todo este proceso fue realizado en las siguientes fases:

a) Primera fase preparación de reactivos para el medio de cultivo.

Consistió en la preparación del medio de cultivo; y para su ejecución utilizamos soluciones y pesados al 33% de concentración. La investigación se basó en la formulación del medio de cultivo Pytamax, con sus dosis exactas en soluciones madres para 10 litros de medio de cultivo del que se formula 10cc de cada grupo.

Cuadro 11.Reactivos químicos **grupo I** que se utilizó para el medio de cultivo. Nitratos.

Nitrato de Amonio	NO ₃ (NH ₄)
Nitrato de Potasio	NO ₃ K



Elaborado: Paola Cruz.

Cuadro 12. Reactivos químicos **grupo II** que se utilizó para el medio de cultivo. Sulfatos.

Sulfato de Magnesio	SO ₄ Mg
Sulfato de Manganese	SO ₄ Mn
Sulfato de Zinc	SO ₄ Zn
Sulfato Cuprico	SO ₄ Cu

Elaborado: Paola Cruz.

Cuadro 13. Reactivos químicos **grupo III** que se utilizó para el medio de cultivo. Yoduros y clorhidratos.

Yoduro de Potasio	I ₂ K
Clohidrato de Cobalto	ClCo
Clohidrato de Calcio	Cl ₂ Ca

Elaborado: Paola Cruz.

Cuadro 14. Reactivos químicos **grupo IV** que se utilizó para el medio de cultivo. Fosfatos y ácidos.

Fosfato de Potasio	
Monobásico	PO ₄ H ₂ K
Ácido Borico	Bo ₄ H ₃



Molibdato de Sodio	MoO ₄ Na
--------------------	---------------------

Elaborado: Paola Cruz.

Cuadro 15. Reactivos químicos **grupo V** que se utilizó para el medio de cultivo.

Sulfato ferroso	SO ₄ Fe
EDTA	

Elaborado: Paola Cruz

Cuadro 16. Reactivos químicos **grupo VI** que se utilizó para el medio de cultivo. Vitaminas.

Tiamina	HCL
Priridoxina	HCL
Acido Nicotinico	C ₆ H ₅ NO ₂

Elaboración: Paola Cruz



Cuadro 17. Macro y micro-elementos al 33% de concentración para el medio de cultivo de la investigación.

SALES INORGANICAS	P 6793 #	
	mg / litro	
	100%	33,30%
Nitrato de Amonio	825	274,725
Nitrato de Potasio	950	316,35
Sulfato de Magnesio	90,35	30.08655
Sulfato de Manganese	8,45	2.81385
Sulfato de Zinc	5,3	1.7649
Sulfato Cuprico	0,0125	0.003996
Yoduro de Potasio	0,415	0.138195



Clohidrato de Cobalto	0,0125	0.0041625
Clohidrato de Calcio	166	55.278
Fosfato de Potasio Monobasico	85	28.305
Acido Borico	3,1	1.0323
Molibdato de Sodio	0,125	0.041625
Sulfato ferroso	27,85	9.27405
EDTA	37,24	12.40092
ORGANICOS		
Tiamina	1	0.333
Priridoxina	0,5	0.1665
Acido Nicotinico	0,5	0.1665
Pantatenato de calcio		2 cc/l
Acido giberelico		0.25 cc/l
Myo-inositol		100 mg/l
Sucrosa		10 gr/l
Agar		6.5 gr/l

Fuente: (Sigma, 1930 y Arditii, 1992)



b) Segunda fase.

Se agruparon los reactivos de acuerdo a su compatibilidad en los 5 grupos de soluciones madres para 10 litros de medio de cultivo: Nitratos, sulfatos, otros y vitaminas; dentro del laboratorio pueden ser conservados al ambiente, refrigeración y en congelación, hasta 4 meses para su utilización sin que se presenten cambios en las respuestas de las plantas o especies que se cultiven sobre esos medios.

Para cantidades muy pequeñas como de 0.041 de mg que se requiere en sulfato de cobre y otros, se procedió a realizar diluciones para obtener la cantidad exacta en el medio de cultivo las mismas que se conservan de manera individual en frascos oscuros y en refrigeración hasta su utilización. La dilución se ajusta para utilizar un volumen fijo de 1, 5 o 10 ml por litro de medio de cultivo.

Para obtener la quelatificación de los micro-elementos metálicos se inicia con el sulfato de hierro y EDTA sus cantidades respectivas son diluidas y calentadas por separado y en frio mezcladas.

La auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) se prepararon a 100 ppm 100 ml, utilizando como disolvente el OHNa 1 N y como diluyente agua para aforar y son conservadas en refrigeración

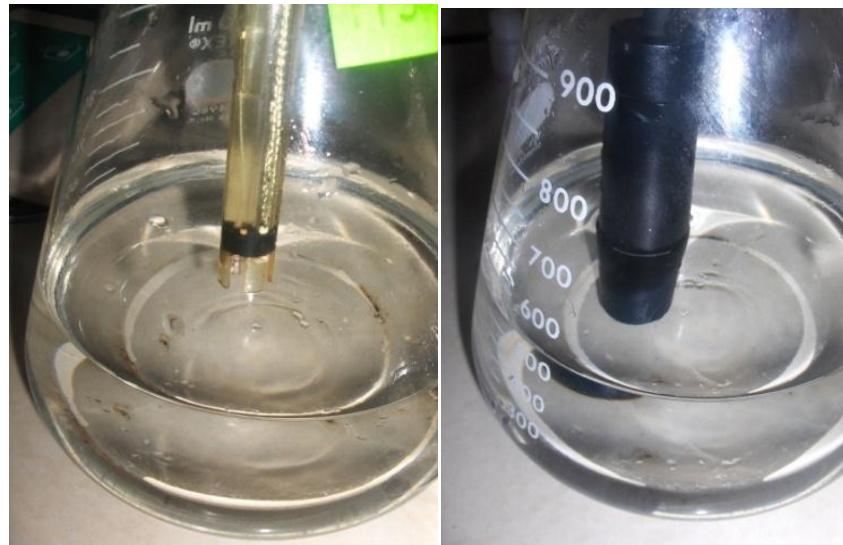


hasta su uso, para obtener 0.25 ppm de ANA se tomó 2.5 ml para un litro de medio de cultivo.

Las cantidades que la balanza permiten pesar con exactitud son disueltas en vaso de precipitación y llevadas a un balón volumétrico para su mezcla y aforo.

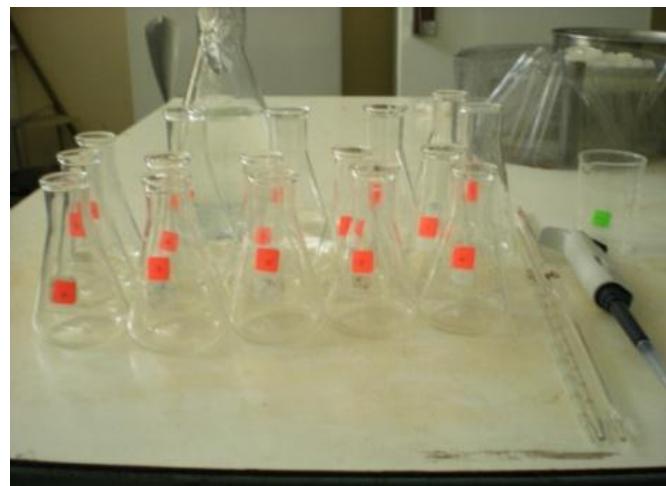
De cada solución madre se tomó un volumen de 10 ml para un litro de medio de cultivo que se adiciona el Myo-inositol100 mg/l, pantotenato de calcio con una dosis de 2cc/ l, se disolvió y se colocó el G3 en dosis de 0.25 cc/l, por último se colocó la sacarosa10gr/l, se procedió a medir el pH y la conductividad eléctrica. En la mayoría de los casos se requirió ajustar el pH, para subir con una solución 1 normal de hidróxido de sodio OHNa; y para bajar el pH con una solución 1 normal de acido clohidrico; normalmente, el ajuste del pH se hizo a 5.5 – 5.6, para nuestra investigación el pH se estabilizó en 5.53 y la conductividad eléctrica fue de 2.62 mstcm.

Como último paso añadimos el agar, calentamos el medio de cultivo hasta hervir para diluir todo el agar, evitando no quemar la solución, y al terminar este proceso colocar en elermeyer etiquetados con cada uno de los tratamientos en el cual se puso las dosis de auxinas y citoquinicas con una pipeta automática en landas (ul), para cada unos de los tratamientos.



Fotografía 43 y 44. Equipo para el ajuste de pH y medición de la conductividad eléctrica.

Fuente: Paola Cruz. (2011)



Fotografía 45: Dosificación de dosis de Auxinas y Citoquininas.

Fuente: Paola Cruz. (2011)

- **Etiquetado y colocación de medio de cultivo en los tubos de ensayos.**

Dentro del etiquetado se procedió a identificar cada uno de las distintas dosis en parte por millón (ppm) de ANA IBA y BA con etiquetas de colores, con las dosis de auxinas, citoquininas, la fecha de la realización y el código de cada tratamiento.

Para el dispensado del medio de cultivo se tomó en cuenta la temperatura, esta debió mantenerse sobre los 45° C a fin de evitar la gelificación, se colocó en cada tubo la cantidad de 5 cm³ de medio de cultivo, terminado el envasado se procedió a la rotulación de cada uno de los tubos respectivas, con las etiquetas de cada uno de los erlenmeyer, se colocó las tapas de algodón y aluminio para posteriormente la esterilización.



Fotografía 46: Etiquetado y dispensado de tubos.
Fuente: Paola Cruz. (2011)

c) Tercera fase. Esterilizado de materiales y del medio de cultivo.

Para la esterilización del medio de cultivo se procedió a la colocación de los tubos en fundas de papel, las cuales contenían los números de tratamientos para no tener confusiones subsiguientes.



Fotografía 47 y 48: Preparado y colocación de los tubos de ensayos para la esterilización.

Fuente: Paola Cruz (2011)

Los tubos se colocaron en las rejillas. La esterilización se realizó por quince minutos a una temperatura de 20° C.

Además se realizó la esterilización de la cristalería, agua, papel para trabajar dentro del laboratorio. Pasado el tiempo de esterilización se procedió a colocar los tubos en las

respectivas gradillas, con una inclinación para obtener que el medio tenga la forma requerida (flauta) cuando se solidifique.



Fotografía 49 y 50. Esterilización de agua y papel e inclinación (flauta) del medio de cultivo respectivamente

Fuente: Paola Cruz. (2011)

- **Preparación de los equipos e instrumentos para la investigación.**

Se utilizó radiación ultravioleta para el ambiente, las lámparas quedaron prendidas por 24 horas para desinfectar el área de trabajo y en la cámara de flujo laminar, posteriormente se traslado los tubos con medio de cultivo, agua, papel, pinzas, etc. para la siembra. Dentro de los elementos químicos se utilizó alcohol al 70% esto se utilizó para la cámara de flujo

laminar y para las manos, y de 96° para cada una de las lámparas de alcohol.

d) Cuarta fase: Selección de explantes.

Se tomó los mejores frascos y se seleccionó únicamente las plantas vigorosas.



Fotografía 51: Selección de explantes para la extracción.
Fuente: Paola Cruz (2011)

e) Quinta fase: Preparación del material vegetal para la siembra.

Previo a la extracción se debe tener el ambiente desinfectado, mientras que el estéreo microscopio, la cámara de flujo laminar, los tubos de ensayo, y las pinzas flameadas, el papel

estéril, los frascos con el material vegetal, el agua de la autoclave, deberán ser desinfectados con alcohol al 70%.



Fotografía 52 y 53: Limpieza del estéreo-microscopio y el área de trabajo

Fuente: Paola Cruz. (2011)

Con las referencias expuestas, se procedió a realizar el trabajo práctico que consistente en:

1. Selección de explantes que se desarrollaron en el cuarto de crecimiento.
2. Se procedió a colocar una lámina de papel estéril en la base del estéreo-microscopio.



3. Se roció y flameó con alcohol el frasco del material vegetal.
4. Abrimos cuidadosamente para evitar contaminaciones y seleccionamos la planta sana, evitando las que se encuentran de color amarillento y colocamos en el papel bajo el estéreo- microscopio.
5. Observamos y eliminamos cada una de las hojas externas que se encuentra en el material.
6. El tiempo empleado para la eliminación de hojas externas y extraer el meristemo es de 4 minutos como máximo para evitar la marchitez de las hojas de los explantes y facilitar el corte del meristemo.
7. Al eliminar las hojas exteriores nos encontramos con diferentes capas: la L1 externa la L2 interna y la L3 corpu; al pasar por estas tres capas encontramos los primordios foliares.
8. Luego procedemos a eliminar los primordios foliares, que envuelven al meristemo.



9. Al tener limpio el meristemo, se procede a cortar con el bisturí, observando nuevamente la punta del bisturí, para constatar que el meristemo se encuentre en la punta para trasladarlo al tubo de ensayo.

Recomendaciones para la preparación del material vegetal antes de la siembra.

- Al utilizar las pinzas se debe tener una presión muy leve: para evitar la destrucción del material vegetal.
- Debemos tener cuidado al utilizar el bisturí, ya que es muy fino y podemos cortar mucho material.

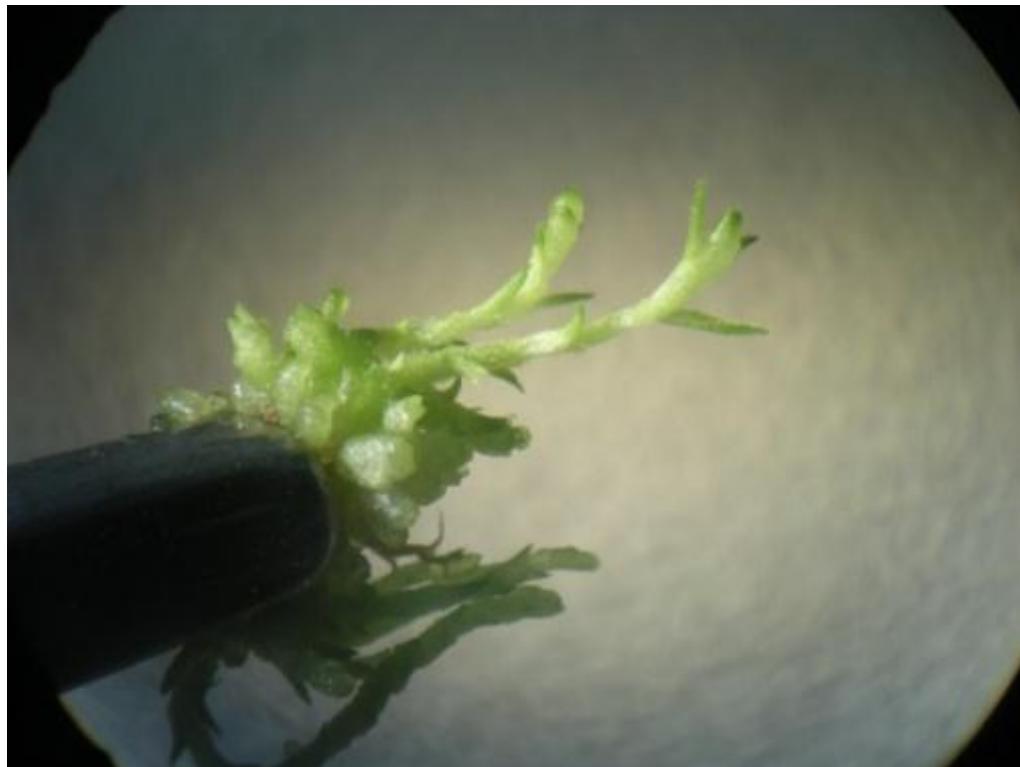
Recomendaciones para cortes del material vegetal antes de la siembra.

- Para controlar el pulso no olvidar asentar correctamente los codos para contrarrestar las vibraciones de la cámara de flujo laminar.
- Flamear correctamente los frascos y tubos antes y después de destaparlos.



- En esta fase, trabajamos con agujas de insulina, aunque también se puede trabajar con bisturí, evitando cortar al meristemo.
- Si se trabaja con bisturí tener en cuenta que si este se oxida por las flameadas desechar rápidamente para evitar contaminaciones.
- Si al extraer los explantes de los frascos estos caen sobre la cámara de flujo laminar eliminarlos para evitar contaminación de hongos o bacterias que se encuentren en la cámara.
- Al eliminar los primordios foliares obtendremos mejores resultados en la eliminación de virus.
- Para el corte del meristemo se recomienda cortar de abajo hacia arriba, para evitar que este caída sobre el papel que se encuentra extendido sobre el estéreo-microscopio.

- Después de cada una de las extracciones de los meristemos se recomienda eliminar la hoja de papel que se encuentra sobre el estéreo-microscopio, el bisturís, la aguja de insulina para evitar la contaminación cruzada.



Fotografía 54: Eliminación de hojas externas.

Fuente: Paola Cruz. (2011)



Fotografía 55y 56: Eliminación de hojas externa y primordios foliares.

Fuente: Paola Cruz. (2011)



Fotografía 57: Corte del meristemo para la siembra.

Fuente: Paola Cruz. (2011)



f) Sexta fase: Siembra de Meristemos

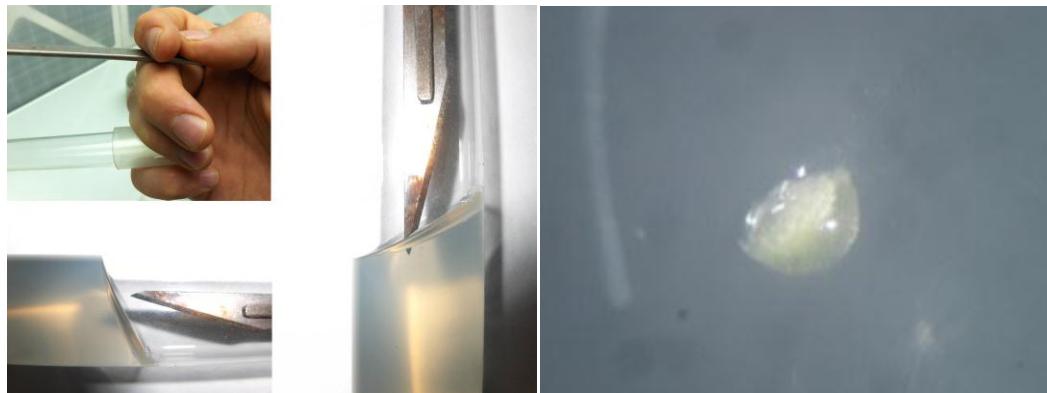
Para la siembra se utilizó el bisturí con la mano derecha en el cual se encuentra inserto el meristemo; con la mano izquierda se flamea el tubo, luego destapamos el tubo de ensayo con mucho cuidado con la mano derecha sin soltar el bisturí, luego, con precaución, realizamos un corte en el medio de cultivo en el cual quedó impregnado el meristemo, y lo tapamos, colocándole en la gradilla de espuma flex para trasladarlo a la cámara de crecimiento. Para facilitar un buen desarrollo de los meristemos se procedió a mover cada tres días, luego cada semana. Esto nos facilitó que el meristemo absorba los nutrientes de todo el medio de cultivo.

Recomendaciones para la siembra del meristemo.

- Es recomendable utilizar el dedo meñique y anular, haciendo presión sobre la palma de la mano para destapar el tubo de ensayo para luego introducir el bisturí en el tubo y proceder a la siembra.
- No se debe realizar el corte muy profundo en el medio de cultivo para evitar que el meristemo se ahogue.



- Despues de la siembra se vuelve a flamear la boca del tubo y la tapa para evitar contaminación.



Fotografía 58 y 59: Destapado del tubo y siembra del meristemo en el medio de cultivo.

Fuente: Paola Cruz. (2011)

g) Séptima Fase: Toma de datos.

Para una mayor facilidad de recopilación de datos estos fueron tomados cada 15 días hasta los 90 días.

- Evaluación de Meristemos.

Para la evaluación se observó a los meristemos y se determinó su desarrollo por medio de una escala de colores definida por la autora.

Cuadro 18. Escala de colores y equivalencia para la evaluación del desarrollo.



Código	Codificación	Escala
C/c/b	Cambió de color a blanco	1
C/c/m	Cambió de color a marrón	2
C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	3
C/c/n	Cambio de color a negro	4
C/C/v	Cambio de color a verde	5
C/c/f/v	Cambio de color y forma	6
Muerto		7
Mantiene		8



V. Resultados y discusión

Para realizar las evaluaciones se recurrió a la observación bajo el estéreo microscopio debido a que a simple vista no se puede detectar su tamaño, ni las diferencias entre ellos. De la siembra de meristemos de *Maxillaria grandis* se obtuvo los siguientes resultados:

A los 9 días no se detectó cambio alguno de los meristemos, al realizar el ADEVA con valor 8, su color y forma se mantuvieron (Datos que se encuentran en el anexo 1 basados en la tabla 1.). Los resultados obtenidos dieron valores ceros debido a que no mostró cambios. El ADEVA y la prueba de Tukey al 5% no detectaron diferencia alguna.

Gráfico 4. Comportamiento de los meristemos a diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* de los tratamientos a los 9 días.

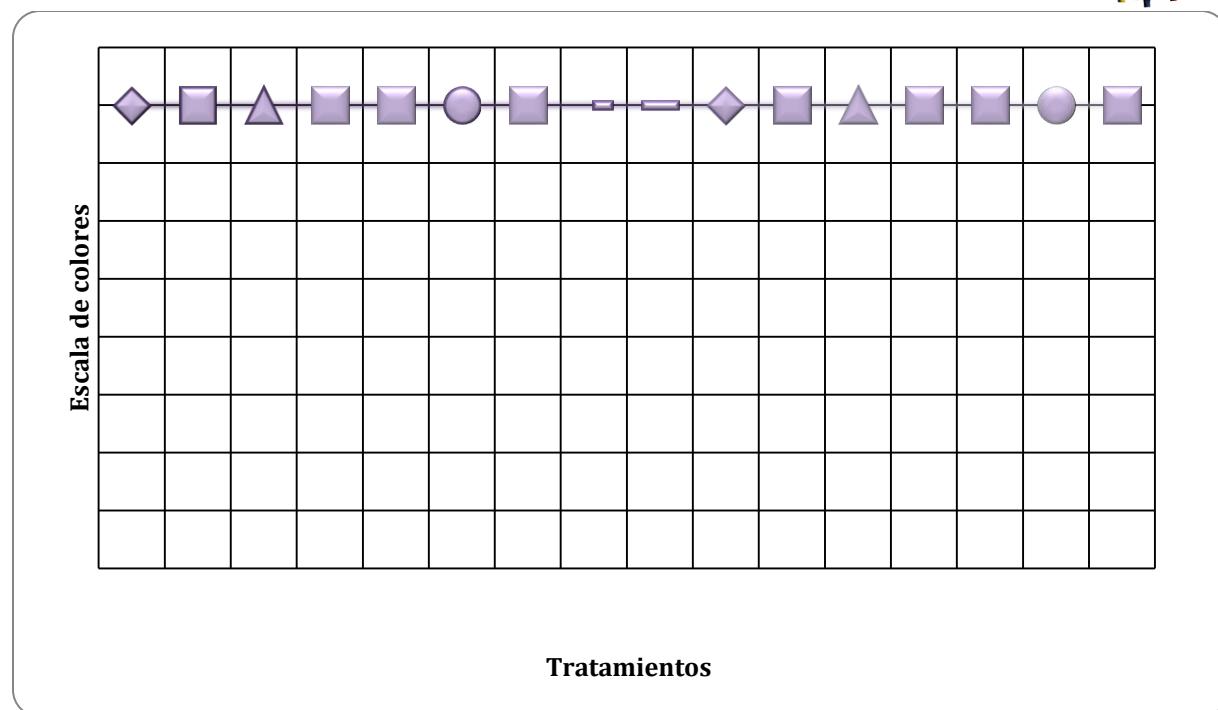


Tabla 1. Escala de colores y tratamientos al que pertenecen los tratamientos a los 9 días

Escala	Códigos	Codificación	Tratamientos
1	C/c/b	Cambió de color a blanco	
2	C/c/m	Cambió de color a marrón	



3	C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	
4	C/c/n	Cambio de color a negro	
5	C/C/v	Cambio de color a verde	
6	C/c/f/v	Cambio de color a verde y forma	
7	Muerto		
8	Mantiene		Se encuentran todos.

Para realizar las evaluaciones de los meristemos se procedió a diseñar una tabla que permita cuantificar los cambios cualitativos que presenten los meristemos en su proceso de adaptación y comportamientos in vitro.

En el gráfico 3 y en la tabla 1 a los 9 días los meristemos no cambiaron de color ni de forma se mantuvieron del tamaño sembrado sin alteración alguna.

Cuadro 19. Análisis de Variancia de la codificación para el comportamiento de los meristemos a diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) para *Maxillaria grandis* a los 15 días desde la siembra.



F.V.	GI	SC	CM	FC		F	Tab
						0.5%	
						0.01%	
Total	9 5	1025.33 3	-	-			
Tratamiento s	1 5	12.93 194	3	1.2	NS	1.82	2.31
Auxinas	3	12.19 36.583	4	1.128 4	NS	2.74	4.085
Citoquininas	3	30.91 92.75	7	2.860 9	*	2.74	4.085
Auxi Vs. Cito	9	0.664 64.667	7.185	9	NS	2.02	2.68
Repeticiones	5	0.385 20.833	4.167	6	NS	2.74	3.298
Error	7 5	10.80 810.5	7				

C.V. = 75.86

Del ADEVA se encontró que el efecto de citoquininas es el único que dio diferencia significativa, y los demás efectos fueron estadísticamente iguales. El coeficiente de variación del 75,86% corresponde a una heterogeneidad alta debido a que cada tubo con su meristemo corresponde a una unidad



experimental y la respuesta diferente que manifestaron los meristemos en esta etapa. Los datos originales y los que corresponden a valores codificados se encuentran en el anexos 2.

Cuadro 20. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos a diferentes dosis de Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* a los 15 días.

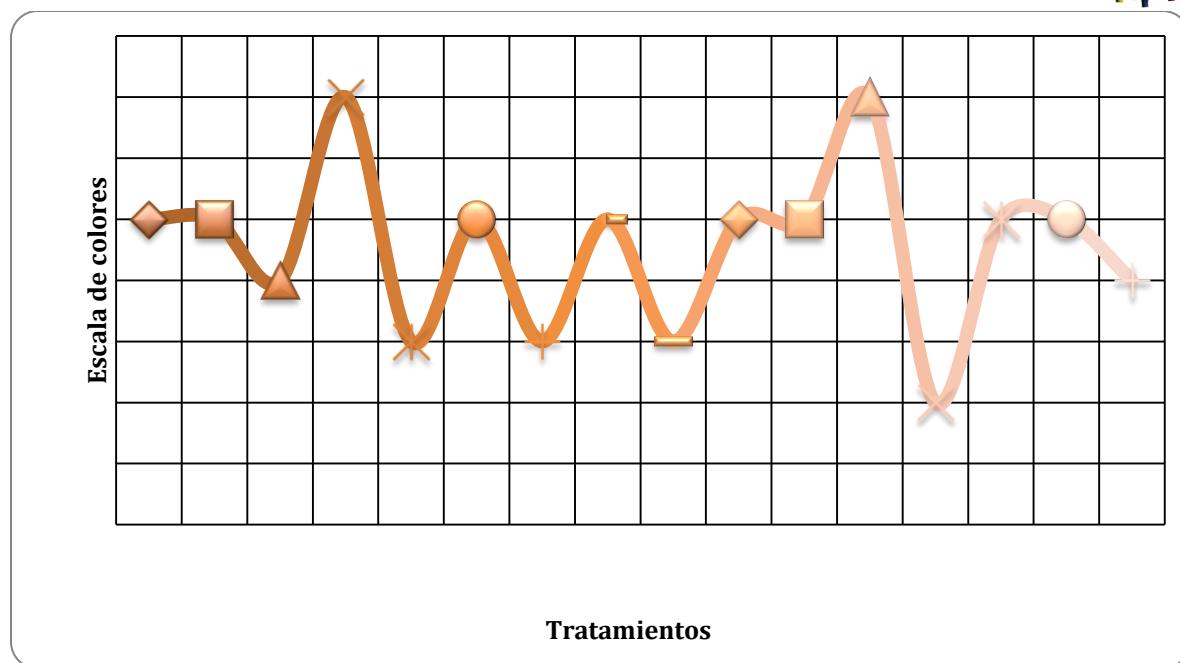
Dosis/Citoq	BA	Promedios	Rango
4	1	5.667	a
2	0.25	4.667	ab
3	0.5	4.042	ab
1	0	2.958	b

De la prueba de Tukey al 5%. se encontró en el primer puesto el rango “a” en el cual se encuentra la dosis 4, está dosis son las más altas utilizadas ANA (1 ppm, IBA 2 ppm, BA 1ppm) con un valor promedio de 5.667, seguido por el rango “ab” que comparten la dosis 2 y 3, para la dosis 2 (ANA 0.25 - IBA 0.5 ppm, BA 0.25 ppm) con un valor promedio de 4.667,y la dosis 3(ANA 0.5 ppm, IBA 1 ppm, BA 0.5 ppm) con un valor promedio de 4.042, y en último puesto con el rango “b” la dosis 1 (ANA 0 ppm, IBA 0 ppm, BA 0 ppm) que dio un



promedio de 2.958. Con estos datos se determinó que las dosis que contenían auxinas y citoquininas en dosis altas, presentaron valores promedios próximos a 6, son los que interesan por la sobrevivencia de los meristemos, valores promedios que se encuentran afectados por los de categoría 7 que corresponden a una fenolización presente en los tratamientos 13 y 15.

Gráfico 5. Codificación del comportamientos de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 15 días desde la siembra.



Para el tratamiento 3 se determinó que la dosis alta de IBA y al no tener una dosificación de BA el meristemo no cambia a color verde, sino se mantiene de color blanco marrón como es el caso del tratamiento 3; en los tratamientos 7 y 11, los meristemos cambiaron de color a verde debido posiblemente a la dosificación de BA que fue de 0.25 a 0.5 ppm y el tratamiento 15 al tener una alta dosificación de BA de 1 ppm el meristemo fenolizó como en el caso del tratamiento 13. En los últimos cuatro tratamientos 4, 8, 12 y 16 tuvimos que el comportamiento fue similar a los otros tratamientos, las dosificaciones de BA determinaron un cambio de comportamiento de los meristemos, el tratamiento 4 cambió de color a marrón al no tener dosificación de BA, los tratamientos 8 y 12 cambian de color a verde en las dosificaciones de 0.25 y 0.5 de BA, y el tratamiento 16 cambió de color a negro información que se estima en la Tabla 2.

Tabla 2. Escala de colores y tratamientos al que pertenecen a los 15 días

Escala	Códigos	Codificación	Tratamientos
1	C/c/b	Cambió de color a blanco	



2	C/c/m	Cambió de color a marrón	4_
3	C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	2_3_10
4	C/c/n	Cambio de color a negro	9_16
5	C/C/v	Cambio de color a verde	1_5_6_7_8_11_12_14
6	C/c/f/v	Cambio de color a verde y forma	
7	Muerto		13_15
8	Mantien e		

Cuadro 21. ADEVA para la codificación del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) para *Maxillaria grandis* a los 30 días desde la siembra.

F.V.	GI	SC	CM	FC	F Tab
					0.5% 0.01%
Total	95	698.74	-	-	



Tratamientos	15	181.24	12.083	1.78	NS	1.8175	2.31
Auxinas	3	18.698	6.233	0.9194	NS	2.74	4.085
Citoquininas	3	83.948	27.983	4.1277	**	2.74	4.085
Auxi Vs							
Cito	9	78.594	8.733	1.2881	NS	2.02	2.68
Repeticiones	5	9.052	1.81	0.2671	NS	2.74	3.298
Error	75	508.448	6.779				

C.V.= 76.91%

De los datos del ADEVA al comparar con el análisis de los 15 días se encuentra un incremento en el efecto de Citoquininas esto es de significativo a altamente significativo, el coeficiente de variación tiene un ligero incremento en una unidad 75.86 a 76.91 esto se da debido a que se encuentra todavía una heterogeneidad en cada uno de los tratamientos en estudio.

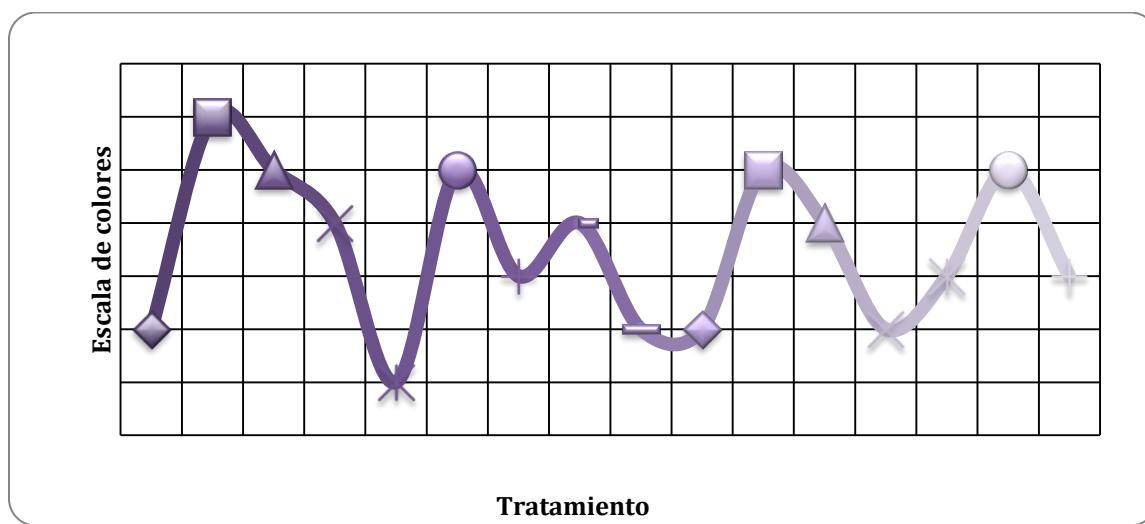
Cuadro 22. Prueba de Tukey al 5% para la codificación en valores promedios del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis a los 30 días de Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis*.

Dosis/Citoq	BA	Promedios	Rango
3	0.5	4.333	a
2	0.25	3.75	ab
4	1	3.625	ab

1	0	1.833	b
---	---	-------	---

La dosis 3 se mantiene en el valor de codificación en la característica de color negro además se encuentra en la primera ubicación, se asume que las dosis 2 y 4 al estar próximo al valor codificado 4 mantienen características similares, la dosis 1 que corresponde a un cambio hacia un color blanco marrón a marrón.

Gráfico N° 6. Codificación del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA - IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 30 días.



Los tratamientos 1, 5, 9 y 13 se comportaron de la siguiente manera:

El tratamiento 1 cambió de color verde a marrón, este cambio se dio posiblemente porque el tratamiento 1 no tiene dosificaciones de auxinas y citoquinina, el tratamiento 5 cambió de color a verde y de forma y se mantiene de este color, este cambio fue debido a que el meristemo entró en su etapa de desarrollo, cabe indicar que el meristemo por su tamaño no se pudo medir, (el cambio también puede radicar que estadísticamente las dosificaciones de citoquininas son altamente significativo), para el tratamiento 9 una sección del meristemo tuvo un comportamiento inusual paso de color negro a color verde, el cambio se manifestó posiblemente por los movimientos que se realizaron a un nuevo medio de cultivo en el que se colocó y tuvo una mejor adaptación y absorción de los componentes del medio de cultivo y en el caso del tratamiento 13 también se obtuvo cambio de fenolización pasó a color negro el meristemo.

En el tratamientos 2 (ANA 0.25–IBA 0.5 ppm, BA 0 ppm) cambió de blanco a blanco marrón este cambio se produjo posiblemente por no tener dosificación de BA, el tratamiento 6 se mantuvo de color verde, el tratamiento 10 se mantuvo de color blanco marrón, para el tratamiento 14 pasa de color



verde a color negro una de las causa puedo haber sido la alta concentración de BA.

Para los tratamientos subsiguientes (ANA 0.5-IBA1 ppm) como es el caso del tratamiento 3 (BA 0 ppm) pasó de blanco marrón a negro este tratamiento no tiene dosificaciones para BA al comparar con la evaluación a los 15 días los tratamientos con éstas dosificaciones no se obtuvieron resultados satisfactorios. El tratamiento 7 de color verde cambió a color negro esto es posiblemente por las altas dosificaciones de BA, el tratamiento 11 se mantiene de color verde, para el tratamiento 15 los meristemos muertos pasan a color negro este tratamiento concuerda con las lecturas tomadas del tratamiento 13.

Al analizar los últimos cuatro tratamientos 4, 8, 12 y 16 tenemos que el comportamiento fue que las dosificaciones de BA determinaron los cambios de comportamiento en los meristemos, el tratamiento 4 se mantiene de color marrón, el tratamiento 8 cambia de color verde a blanco marrón, el tratamiento 12 se mantiene el color verde, para el último tratamiento que es el 16 cambia de color negro a blanco marrón, los comportamientos de los meristemos no fueron iguales para cada una de las diferentes dosis del medio de cultivo.

Tabla 3 Escala de colores para los tratamientos al que pertenecen los 30 días

Escala	Código	Codificación	Tratamientos
1	C/c/b	Cambió de color a blanco	2_-
2	C/c/m	Cambió de color a marrón	1_3_4_7
3	C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	8_10_16
4	C/c/n	Cambio de color a negro	13_14_15
5	C/C/v	Cambio de color a verde	6_9_11_12
6	C/c/f/v	Cambio de color a verde y forma	5_-
7	Muerto		
8	Mantiene		

Como se observó en el gráfico 8 y la tabla 3 cada uno de los tratamientos se encontró agrupado por sus características cualitativas, tenemos que los tratamientos se ubicaron en las



escalas en grupos de 5 y 6 que corresponden a los tratamientos 6, 9, 11, 12 y 5.

Cuadro 23. Análisis de variancia de la codificación del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) para *Maxillaria grandis* a los 45 días desde la siembra.

F.V.	GI	SC	CM	FC		F	
						Tab	0.01
Total	95	702.24	-	-			
Tratamientos	15	246.41	16.42	7	2.75	**	5 2.31
Auxinas	3	29.615	9.872	5	1.652	NS	2.74 4.085
Citoquininas	3	138.36	46.12	2	7.720	**	2.74 4.085
Auxi Vs Cito	9	78.427	8.714	7	1.458	NS	2.02 2.68
Repeticiones	5	7.802	1.56	2	0.261	NS	2.74 3.298
Error	75	448.03	5.974	1			



C.V. = 56.81%

Realizado el análisis de ADEVA para los 45 días se observó que los tratamientos fueron altamente significativos y al dividirse su efecto la citoquininas arrojó un valor altamente significativo, los valores restantes fueron estadísticamente iguales; los valores originales para realizar el ADEVA se encuentran en el anexo 4. El coeficiente de variación que se dio para esta etapa es de 56.81% sigue siendo alto debido a la heterogeneidad de los tratamientos en el desarrollo de los meristemos, pero al comparar entre los 30 días y 45 días se redujo en un 20.1% debido posiblemente a que los tratamientos se comportaron homogéneamente y dentro de la escala.

Cuadro 24. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 45 días.

Tratamiento	Auxin vs Citoq	Rangos
6	7.167	a
13	6.167	ab
16	5.833	ab



14	5.667	ab
9	5.5	ab
10	5.333	ab
5	4.5	ab
11	4.5	ab
15	4.5	ab
12	4.167	ab
1	3.333	ab
3	3.333	ab
8	3.167	ab
7	3	ab
4	1.5	b
2	1.167	b

De la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos tuvimos que el tratamiento 6 (ANA 0.25 ppm-IBA 0.5 ppm, BA 0.25 ppm) se encontró en la escala 7 esto indica que una parte de su tejido fenolizó y por consiguiente ocupa el rango “a”, el tratamiento 13 (ANA 0 ppm - IBA 0 ppm, BA 1 ppm) se encontró en el rango “ab” se observó en una de sus repeticiones un cambio de color pero en su mayoría hubo una elevada fenolinazaciòn, para los siguientes tratamientos:



16 (ANA 0 ppm-IBA 0 ppm, BA 1 ppm); 14 (ANA 0.25-IBA 0.5 ppm, BA 1 ppm); 9 (ANA 0 ppm-IBA 0 ppm, BA 0.5 ppm) se encontraron dentro del rango 6 de la escala esto indicó que los meristemos se encontraron viables de color verde y cambiaron de forma el tratamiento 10 (ANA 0.25 ppm-IBA 0.5 ppm, BA 0.5 ppm) éste cambió de color pero no de forma, por esta razón se encontró en el valor 5.33 de la escala.

Para los tratamientos 5, 11 y 15 estadísticamente se encontraba en 4.5 cabe indicar que dentro de este tratamiento no cambió en su totalidad a 5 debido a que una de sus repeticiones se encontró de color negro.

Como resultados parciales para los 45 días vimos que la interacción entre auxinas y citoquininas se encontraron en su mayoría entre los tratamientos 10, 11, 14, 15 y 16 como bien lo vimos cada una de las dosis de éstos tratamientos se encontraron en relación a las dosis de citoquininas debido a que en los tratamientos 5, 9 y 13 no contienen dosis de auxinas por lo tanto las dosis de citoquinas fueron las responsables de la interacción y el cambio de color y forma que se manifestó en los meristemos.



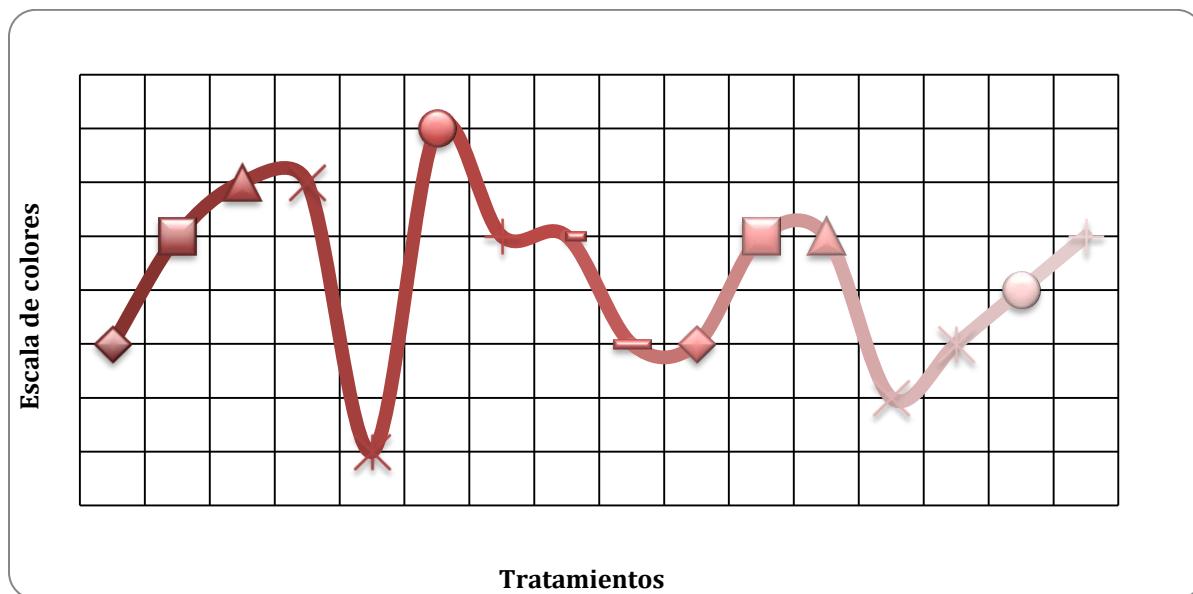
Cuadro 25.Codificación para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 45 días.

Dosis/Citoq	BA	Promedios	Rango
4	1	5.542	a
3	0.5	4.875	a
2	0.25	4.458	a
1	0	2.333	b

Para el caso de las citoquininas a los 45 días las dosis que mejor resultaron y compartieron el rango “a” fueron las dosis 4(ANA 1 ppm-IBA 2 ppm, BA 1ppm), 3 (ANA 0.5 ppm, IBA 1 ppm, BA 0.5 ppm), y 2 (ANA 0.25ppm-IBA 0.5 ppm, BA 0.25 ppm) esto nos indicó que dentro de la escala de colores los tratamientos en su mayoría se encontraron cambiando de color y de forma, al comparar los resultados para los 30 días y 45 días vemos que hubo un aumento de su promedio en más de una unidad de cada una de las dosis, también se encontró una mayor homogeneidad de los tratamientos para ubicarse dentro de la escala.

Gráfico 7. Codificación para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y

Citoquininas (BA) en *Maxillaria gradis* para los tratamientos a los 45 días desde la siembra.



Para el primer grupo de tratamientos 1, 5, 9 y 13 que se analizó para los 45 días tenemos, el tratamiento 1 se encontró en los valores escala 5 a los primeros 15 días a los 30 días se encontró en el valor 2 y a los 45 días se encuentra en el valor codificado 3 de la escala de colores, esto no cambiaron de forma por la falta de auxinas y citoquininas que no le permitió elongar sus células y desarrollarse, y al comparar con otros tratamientos que ya han cambiado de forma y color, el tratamiento 1 se mantuvo en un color blanco marrón. Para el tratamiento 5 se mantuvo de color verde y siguió su desarrollo, para el tratamiento 9 en esta etapa ya cambió su forma y se mantuvo de color verde, el tratamiento 13 paso de



color negro una sección del meristemo cambió de forma y color el inusual comportamientos de este tratamiento se da probablemente a que el meristemo ya comenzó a absorber mejor los nutrientes del medio de cultivo, para esta epata se procedió a cambiar a los meristemos a un nuevo medio de cultivo con las mismas concentraciones de macro y micro elementos con sus respectivas dosificaciones de auxinas y citoquininas, el meristemo posiblemente en las otras etapas anteriores se encontró recubierto del medio de cultivo anterior o al agotar este medio pasó de una coloración blanca o por efectos de exposición al ambiente de la cámara de flujo laminar o por efectos de movimientos dentro del tubo de ensayo a una coloración negra al cambiar de medio el meristemo reacciono.

En el tratamiento 2 entre los 15 y 30 días de coloración se encontró dentro de la categoría 1 que es la coloración blanca y 3 que es la coloración blanca marrón esto se produjo posiblemente por no tener dosificaciones de BA; para el tratamiento 6 pasó de color verde a fenolizado, esto pudo darse probablemente en el momento de mover o cambiar los meristemos o por efecto del corte, el tratamiento 10 cambió dentro de la escala de colores pasó de color marrón a color



verde debido posiblemente a las dosis de auxinas, el tratamiento 14 pasó de color negro a verde.

Para los tratamientos subsiguientes ANA-IBA el tratamiento 3 retornó de color negro a color blanco marrón, al no tener dosificaciones de BA el meristemo no presentó desarrollo. El tratamiento 7 pasó de color negro a color blanco marrón, el tratamiento 11 se mantuvo de color verde, el tratamiento 15 pasó de color negro a color verde probablemente la interacción entre auxinas y citoquininas como las responsables.

En el último grupo (ANA-IBA ppm) tenemos el tratamiento 4 que se mantiene de la misma coloración esté fue de color negro, para el tratamiento 8 también se mantuvo en el color, este fue el blanco marrón, el tratamiento 12 cambió de color negro a color verde, y por último el tratamientos 16 cambió de color blanco marrón a verde; tratamientos que se ubicaron en el gráfico 9.

Al analizar en el gráfico 9 los tratamientos 1, 5, 9 y 13 y los tratamientos 4, 8, 12 y 16 observamos que a mayor concentración de BA mejor resultados obtuvimos para estos 45 días de evaluación.



Tabla 4. Escala de colores y tratamientos al que pertenecen a los 45 días

Escala	Código	Codificación	Tratamientos
1	C/c/b	Cambió de color a blanco	2_
2	C/c/m	Cambió de color a marrón	4_
3	C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	1_3_7_8
4	C/c/n	Cambio de color a negro	12_
5	C/C/v	Cambio de color a verde	5_10_11_15 —
6	C/c/f/v	Cambio de color a verde y forma	9_13_14_16 —
7	Muerto		6_
8	Mantiene		

Al observar la tabla 4 pudimos agrupar cada uno de los tratamientos dependiendo del comportamiento que tuvieron a los 45 días y observamos que los tratamientos ya se ubican entre los rangos de la escala 5 y 6 en su mayoría.



Cuadro 26. ADEVA de la codificación del comportamiento del meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) para *Maxillaria grandis* a los 60 días desde la siembra.

F.V.	GI	SC	CM	FC		F	0.05%	Tab
							0.01%	
Total	95	592.90	-	-				
Tratamientos	15	189.07	12.60	2.48	**	1.8175	2.31	
Auxinas	3	17.448	5.816	5	1.144	NS	2.74	4.085
Citoquininas	3	69.531	23.17	7	4.561	**	2.74	4.085
Auxi Vs Cito	9	102.09	11.34	4	2.232	*	2.02	2.68
Repeticiones	5	4	22.719	4	0.894	NS	2.74	3.298
Error	75	381.11	5	5.082				

C.V. % = 45.37 %



De los datos originales del Anexo 5 se realizó el ADEVA, para tratamientos, citoquininas, se obtuvo valores altamente significativos y para la interacción Auxinas vs Citoquininas fue significativo. El coeficiente de variación disminuyó en 11.44 % con relación a los 45 días de evaluación, esto nos indicó que la investigación se consolida secuencialmente, al homogenizarse las respuestas entre comportamientos de un mismo tratamiento.

Cuadro 27. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA, IBA) y Citoquininas (BA) para los tratamientos a los 60 días en *Maxillaria grandis*.

Tratamientos	X	Rangos
13	7	a
6	6.833	a
14	6.5	a
11	6.167	a
9	6	a
5	5.833	a
15	5.833	a
4	5.333	a
16	5	a



7	4.833	a
2	4.167	a
10	3.833	a
12	3.5	a
8	3.333	a
3	2.833	a
1	2.5	a

En la prueba de Tukey para la interacción entre los Tratamientos y Auxinas vs Citoquininas tuvimos que todos los tratamientos se encuentran en el rango “a”, el efecto que se debe al coeficiente de variación de alta y a la heterogeneidad debido a que se trabajó con 1 tubo con un meristemo como repetición.

Los tratamientos 6 (ANA 0.25-IBA 0.5 ppm, BA 0.25 ppm); 11(ANA 0.5 ppm-IBA 1 ppm, BA 0.5 ppm);13 (ANA 0 ppm-IBA 0 ppm, BA 1 ppm); 14(ANA 0.25-IBA 0.5 ppm, BA 1 ppm) se encuentran en los primeros lugares como podemos observar éstos tratamientos dentro de la escala se ubicaron en el rango 7, los tratamientos de este grupo se encontraban entre valores que son 6 viable y 7 muerto parcial y para los tratamientos 9_11 (ANA 0 ppm-IBA 0 ppm, BA 0.5 ppm) se ubicó con



exactitud en la escala de colores 6 en el cual representa viabilidad, cambio de forma, y de color verde, porque todas sus repeticiones se encontraron en desarrollo, los tratamientos 5 (ANA 0 ppm-IBA 0 ppm, BA 0.25 ppm); 15(ANA 0.5ppm-IBA 1 ppm, BA 1ppm); estadísticamente fueron del mismo valor 5.8 estos tratamientos en una de sus repeticiones no cambió en su totalidad para ubicarse en el rango 6, el tratamiento 4 (ANA 1 ppm-IBA 2 ppm, BA 0 ppm); con valores promedio 5.3 este tratamiento se mantuvo en color verde, no progresó a cambiar de forma, el tratamiento 16 (ANA 1 ppm-IBA 2 ppm, BA 1 ppm); se ubicó en su totalidad en el rango 5 se mantuvo de color verde.

El resto de tratamientos evaluados se encuentran en la escala de colores de 2 y 3 los cuales indicaron con su coloración marrón y blanca marrón que no son viables.

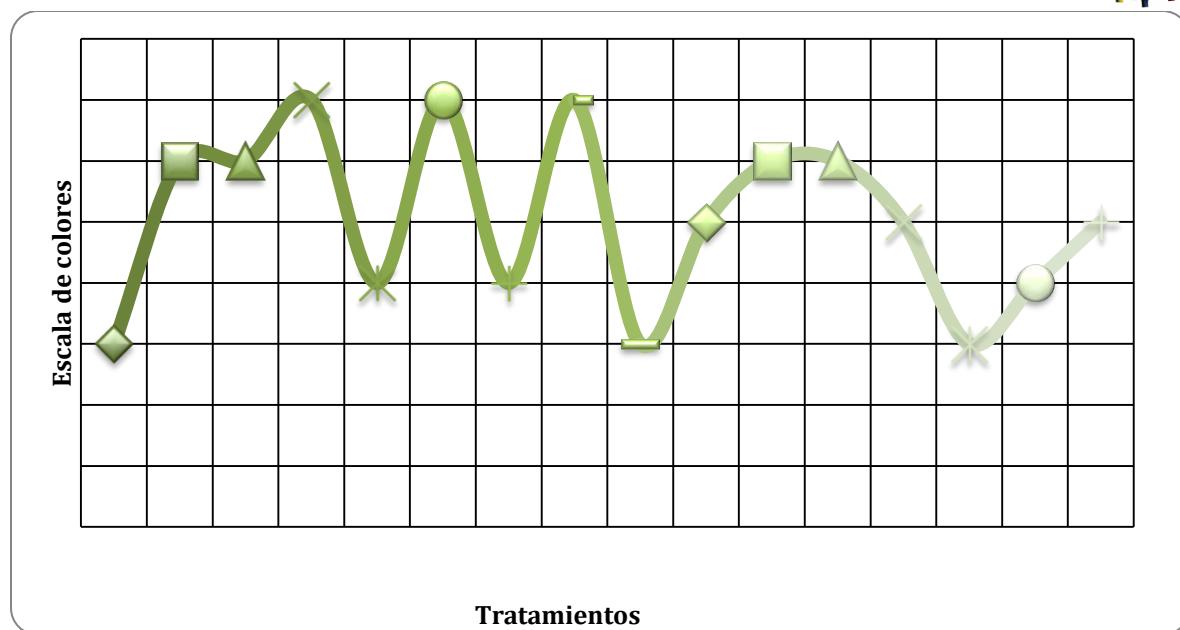
Cuadro 28. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 60 días.

Dosis/Citoq	BA	Promedios	Rango
4	1	6.083	a
2	0.25	5.208	ab
3	0.5	4.875	ab

1	0	3.708	b
---	---	-------	---

Para las Citoquininas tuvimos que el rango “a” ocupa la dosis (BA 1 ppm) con un promedio de 6.083 al comparar con las evaluaciones a los 45 días se notó que el incremento de valor de 0.54 fue importante ya que el valor promedio codificado 5.54 a 6.083 esto nos dio un indicio que el comportamiento de los meristemos ha progresado de verde a verde y cambio de forma, los rangos “ab” comparte las dosis 2 (BA 0.5 ppm) con un promedio de 5.208, se incrementó en 0.758 al comparar con los 45 días este cambio fue debido posiblemente a que las citoquininas contienen esta dosis han pasado de color negro a color verde y la dosis 3 de (BA 0.5 ppm) se mantiene en su promedio se encontraban entre color negro a verde, para la dosis 1 (BA 0 ppm) ocupó el rango “b” con un aumento de 1.37 al comparar con los 45 días.

Gráfico 8. Codificación del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 60 días.



El tratamiento 1 se mantiene en el valor 3 este fue de color blanco marrón, para el tratamiento 5 (ANA 0 – IBA 0; BA 0.25) se mantuvo del color verde y cambió de forma, para el tratamiento 9(ANA 0 – IBA 0; BA 0.5) mantuvo su forma y color, estos datos se muestran en la fotografía 63, el meristemo de este tratamiento se desarrolló mejor en comparación con los otros tratamientos. El tratamiento 13 pasó de color verde y forma a fenolizado. Al concluir el análisis de este grupo de tratamientos podemos decir que las dosis bajas de BA resultaron mejor en las dosificaciones de 0.25 y 0.5 de BA pero sin interacción.

Para los tratamientos subsiguientes de ANA 0.25 y 0.5 de IBA tenemos:

Tratamiento 2 pasó de color blanco a blanco marrón, el tratamiento 6 se encontró fenolizado y se mantuvo de esta forma desde los 45 días. El tratamiento 10 pasó de color verde a color negro, el tratamiento 14 cambió de color verde a fenolizado, por lo que podemos concluir que al aumentar las dosis de auxinas (ANA-IBA) tenemos altos porcentajes de fenolización de los meristemos. Para el tratamiento 3 se mantiene de color blanco marrón, para el tratamiento 7 cambió de forma y se mantiene de color verde, el tratamiento 11(ANA 0.5 – IBA 1; BA 0.5) de blanco marrón paso a verde y cambio de forma, el tratamiento 15 (ANA 0.5 – IBA 1; BA 1) el meristemo cambio de forma y se mantiene de color verde. Al comparar estos tratamientos con la evaluación de los 45 días el tratamiento 3 no cambia de forma ni color posiblemente por la alta concentración de ANA-IBA y la ausencia de BA en su medio de cultivo, para el tratamiento 7 paso de blanco marrón a verde, para el tratamiento 15 el meristemo cambia de forma. Para el último grupo de tratamientos el número 4 pasa de color negro a verde este cambio se produjo probablemente por el cambio de medio que se realizó a los 45 días y el meristemo reaccionó favorablemente pero este cambio no se mantuvo



por un periodo prolongado de tiempo ya que las dosis son muy altas de auxinas y no contiene dosis de citoquininas, al no tener dosis de BA el meristemo no se desarrolló. El tratamiento 8 se mantiene de color blanco marrón posiblemente este cambio se dio a que la dosis de BA no está equilibrado con las dosis de auxinas, el tratamiento 12 se mantiene de color negro esto es debido probablemente a la reducida concentración de BA y para el tratamiento 16 se mantuvo de color verde. En la siguiente tabla podemos observar el comportamiento de cada uno de los tratamientos.

Tabla 5 Escala de colores y ubicación de los tratamientos de acuerdo a las características cualitativas que manifestaron a los 60 días.

Escala	Códigos	Codificación	Tratamientos
1	C/c/b	Cambió de color a blanco	
2	C/c/m	Cambió de color a marrón	
3	C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	1_3_8_
4	C/c/n	Cambio de color a negro	2_12_
5	C/C/v	Cambio de color a verde	4_7_10_16_
6	C/c/f/v	Cambio de color a verde y forma	5_9_11_15_



7	Muerto		6_13_14_
8	Mantiene		

Cuadro 29. ADEVAde la codificación del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) para *Maxillaria grandis* a los 75 días desde la siembra.

F.V.	GI	SC	CM	FC		F	Tab
						0.05%	
						0.01%	
Total	95	446.24	-	-			
Tratamientos	15	117.41	7.827	1.89	*	1.8175	2.31
Auxinas	3	23.698	7.899	1.906	3	NS	2.74
Citoquininas	3	21.365	7.122	1.718	6	NS	2.74
Auxi Vs Cito	9	72.344	8.038	1.939	8	NS	2.02
Repeticiones	5	18.05	3.61	0.871	3	NS	2.74
							3.298

Error	75	310.78	4.144
C.V. = 35.73%			

A los 75 días de desarrollo en medio de cultivo in vitro con diferentes dosis de ANA e IBA, al realizar el ADEVA con los datos originales del anexo 6 nos da como resultado que todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes y por su F. calculado dio significativo.

El C.V. a los 75 días tuvo un valor de 35.73% este fue alto debido a que los meristemos no se consolidan dentro de la escala de desarrollo de los meristemos, pero al comparar el coeficiente de variación con la etapa anterior de evaluación vemos que bajo de 45.37 a 35.73, lo que significa una respuesta más uniforme de cada una de las unidades experimentales.



Cuadro 30. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 75 días desde la siembra.

Tratamiento	Auxin Vs Citoq	Rangos
13	7	a
4	7	a
6	6.833	a
14	6.667	a
2	6.333	a
11	6.167	a
15	6.167	a
16	6.167	a
9	6	a
1	5.833	a
5	5.667	a
10	5	a
7	4.667	a
12	4.667	a



8	4	a
3	3	a

La prueba de Tukey forma 1 solo rango entre los valores promedios de codificación de 3 a 7, esto se debe al efecto que tiene el coeficiente de variación sobre la prueba de Tukey.

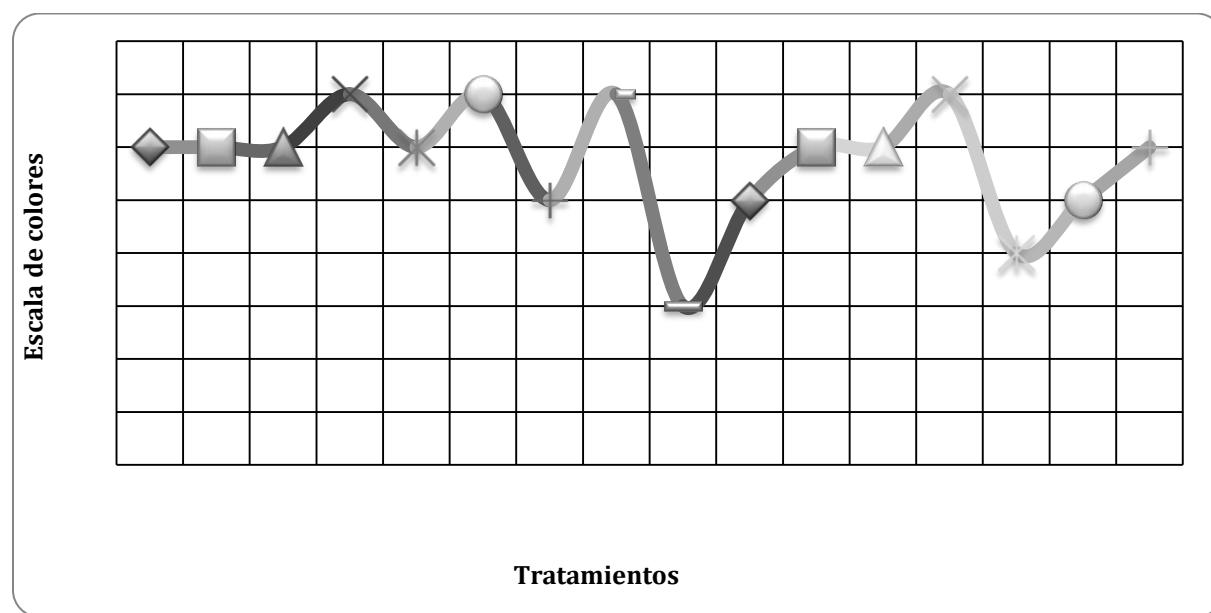
El tratamientos 13 y 4 se encuentran en el valor de la escala de colores es 7 que representa que el meristemo ha muerto parcialmente su tejido.

Del grupo de tratamientos que presentan características favorables para desarrollo y sobrevivencia de los meristemos se encuentran los tratamientos 2, 11, 15, 16, 9, 1, 5 y 1 se encuentra en evolución su promedio se encuentra entre 5 y 6.3 definido entre la escala de viabilidad.

Para el tratamiento 9 es el que se encontró en el rango 6 al comparar con la evaluación anterior se mantiene en este rango al observar cada una de sus repeticiones se detecto un incremento en su desarrollo, además que se tuvo la sobrevivencia del 100% de los meristemos y con un comportamiento homogéneo, entre ellos podemos observar en la fotografía 64.

Para el tratamientos 10 todas sus repeticiones se encontraron de color verde, en forma descendente el resto de tratamientos se encontraron en la escala de color blanco marrón a negro.

Gráfico 9.Codificación del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 75 días desde la siembra.



Como se puede observar el tratamiento 1 cambio de blanco marrón a verde y de forma esta reacción de dio posiblemente ya que se realizó movimientos del meristemo dentro del mismo tubo para una mejor absorción del nutriente, el tratamiento 5 se mantiene de color verde y sigue su división fotografía 64 para el tratamiento 9 se mantiene como el tratamiento 5, en esta etapa se observó que algunos tratamientos han muerto



parcialmente o definitivamente como es el caso del tratamiento 4, 6, 13,14.

Para los otros tratamientos como el 2 este cambió de color negro a verde posiblemente este cambio no sea definitivo ya que este tratamiento ha sido irregular se ubico encontró entre los colores de blanco, negro, verde, los meristemos también ocurrió en el tratamiento 10.

Los tratamientos 3_7 se mantienen en el color blanco marrón a partir de la evaluación de los 60 días estos tratamientos no manifestaron cambios, para el tratamiento 11_15 se mantienen de color verde pero no se continua se desarrollo progresivo de los meristemos.

Para el tratamiento 8 cambió de color de blanco marrón a negro, el tratamiento 12 pasó a color negro a color verde, para el tratamiento 16 pasó de color verde y cambió de forma, estos cambios se dieron probablemente por el movimiento de los meristemos dentro del tubo.

Tabla 6 Escala de colores y tratamientos al que pertenecen a los 90 días

Escala	Códigos	Codificación	Tratamientos
--------	---------	--------------	--------------



1	C/c/b	Cambió de color a blanco	
2	C/c/m	Cambió de color a marrón	
3	C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	3_
4	C/c/n	Cambio de color a negro	8_
5	C/C/v	Cambio de color a verde	7_10_12_
6	C/c/f/v	Cambio de color a verde y forma	1_2_5_9_11_15_16_
7	Muerto		4_6_13_14_
8	Mantien e		

Tabla 6 se ubican los tratamientos de acuerdo a las características cualitativas que manifestaron los tratamientos y de la escala de colores, la mayoría de tratamientos se encuentran en la escala 6.



Cuadro 31. ADEVA de la codificación del comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) para *Maxillaria grandis* a los 90 días desde la siembra.

F.V.	GI	SC	CM	FC		F Tab 0.05%	0.01%
Total	95	15.2 4	-	-			
Tratamientos	15	6.74	0.449	4.17	**	1.8175	2.31
Auxinas	3	2.94 8	0.983	9.129	**	2.74	4.085
Citoquininas	3	1.36 5	0.455	4.225 8	**	2.74	4.085
Auxi Vs Cito	9	2.42 7	0.27	2.505 4	*	2.02	2.68
Repeticiones	5	0.42 7	0.085	0.793 5	NS	2.74	3.298
Error	75	8.07 3	0.108				

C.V. % = 4.82 %



A los 90 días de evaluación con los datos originales del anexo 7 tenemos como resultado que los datos para Tratamientos, Auxinas, Citoquininas, fueron altamente significativos, y la interacción entre auxinas y citoquininas fue significativo.

El C.V. baja a 4.82%, es bajo y aceptable para trabajar dentro del laboratorio debido a la uniformidad de las unidades experimentales.

Cuadro 32. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 90 días desde la siembra.

Dosis/Auxi	Auxinas	Promedios	Rango
4	1 2	7	a
3	0.5 1	6.917	a
2	0.25 0.5	6.75	ab
1	0 0	6.542	b

Para la última etapa de evaluación el rango “a” se encuentra compartido por las dosis 4(ANA 1-IBA 2) con un promedio de 7 y dosis 3(ANA 0.5-IBA 1) con un promedio de 6.917, los tratamientos con estas dosificaciones, los meristemos han



muerto totalmente además han mantenido con estas características desde las anteriores evaluaciones, en la escala de colores con los 2 rangos “ab” se ubicó la dosis 2 (ANA 0.25-IBA 0.5) con un promedio de 6.75 en estas dosis el valor promedio fue afectado con otros comportamientos que determino las auxinas y en último lugar tenemos la dosis 1 (ANA 0-IBA 0) con un promedio de 6.542, promedio que nos manifiesta un alto porcentaje de valores que se encuentran en 7 que corresponde a muerte de meristemos.

Cuadro 33. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 90 días.

Tratamiento	Auxin vs Citoq	Rangos
16	7	a
12	7	a
8	7	a
7	7	a
4	7	a
3	7	a
2	7	a



15	6.833	a
13	6.833	a
11	6.833	a
6	6.833	a
1	6.833	a
10	6.667	a
14	6.5	ab
5	6.5	ab
9	6	c

Al observar los rangos de evaluación para los tratamientos a los 90 días, todos los tratamientos con excepción del 9 se han definido en el rango “a”.

Los tratamientos 14, 5 y 9 son los que manifestaron características adecuadas para el desarrollo de los meristemos.

Cuadro 34. Prueba de Tukey al 5% para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 90 días desde la siembra.

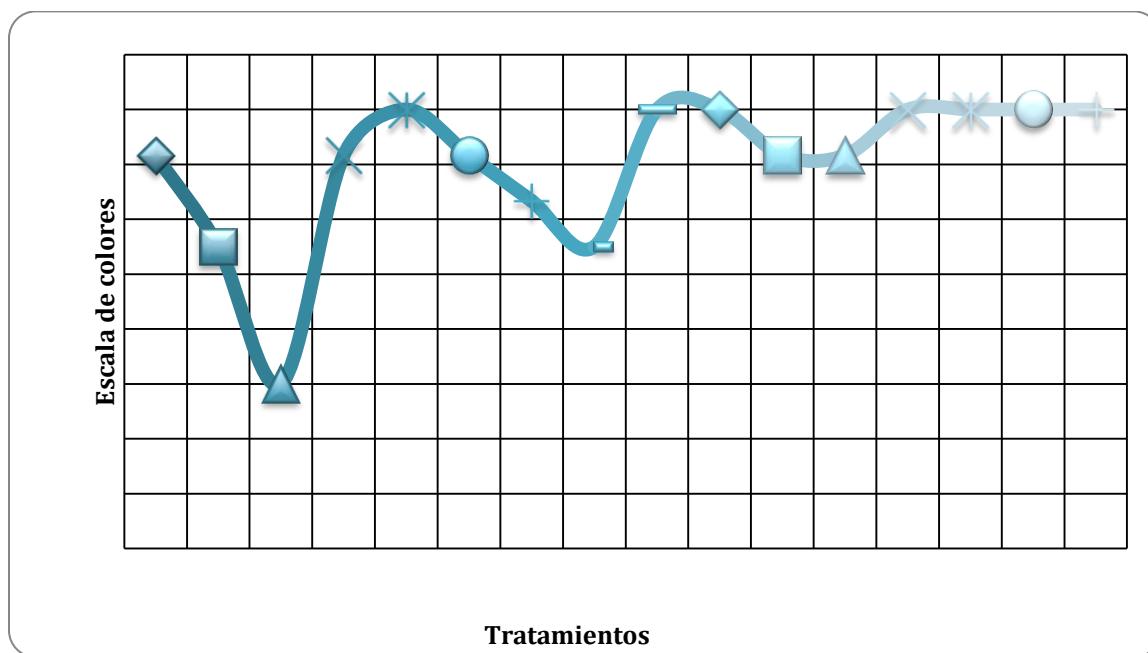
Dosis/Citoq	Citoquininas	Promedios	Rango
-------------	--------------	-----------	-------



1	0	6.958	a
2	0.25	6.833	ab
4	1	6.792	ab
3	0.5	6.625	b

Para los 90 días la dosis de auxinas tuvo el siguiente comportamiento, al incrementar las dosis de BA hasta 3 se pasó a cero etapa de sobrevivencia de meristemos, la dosis 4 determinó una mayor mortandad que la dosis 3.

Gráfico 10. Comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA, IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 90 días desde la siembra.





El tratamiento 9 presentó características favorable para el comportamiento de los meristemos con diferentes dosis de Auxinas (ANA, IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis*.

Tabla 7 Escala de colores y tratamientos al que pertenecen a los 90 días

Escala	Código s	Codificación	Tratamientos
1	C/c/b	Cambió de color a blanco	
2	C/c/m	Cambió de color a marrón	
3	C/c/b/m	Cambio de color a blanco y marrón	
4	C/c/n	Cambio de color a negro	
5	C/C/v	Cambio de color a verde	
6	C/c/f/v	Cambio de color a verde y forma	9_
7	Muerto		1_2_3_4_5_6_7_8_10 _11



			12_13_14_15_16_
8	Mantien e		

En la tabla 7 se ubican los resultados que se obtuvieron dentro de la investigación, el tratamiento 9 con dosis de (ANA 0, IBA 0, BA 0.5) es el tratamiento que dio resultado al 100% de sobrevivencia y su comportamiento fue similar en los 6 repeticiones, para el resto de tratamientos la mayoría de los tratamientos y en sus repeticiones murieron al tomar una coloración negra.

Cabe indicar que se realizó una evaluación sobre las repeticiones que sobrevivieron, sus porcentajes van de 17% al 50%



Gráfico 11. Porcentaje de los meristemos vivos con diferentes dosis de Auxinas (ANA- IBA) y Citoquininas (BA) en *Maxillaria grandis* para los tratamientos a los 132 días.

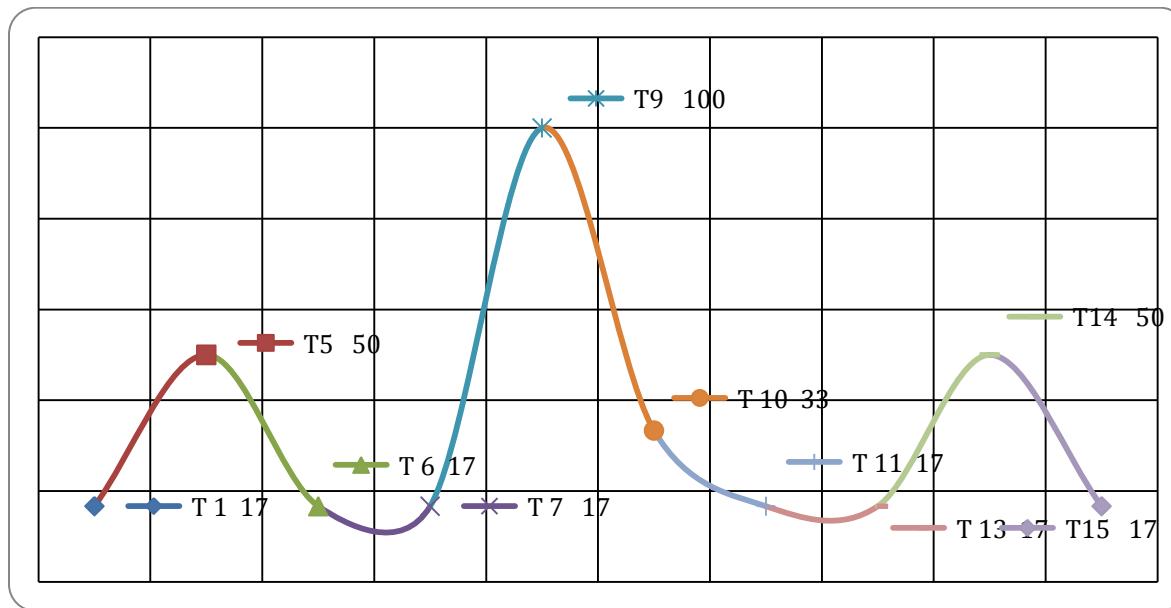


Tabla 8. Porcentaje de sobrevivencia por tratamientos y repeticiones

Tratamientos	ANA	IBA	BA	Porcentaje	Rep
1	0	0	0	17	Rep 3
5	0	0	0.25	50	Rep 1,3,5
6	0.25	0.5	0.25	17	Rep 4
7	0.5	1	0.25	17	Rep 3
9	0	0	0.5	100	Rep 1,2,3,4,5,6

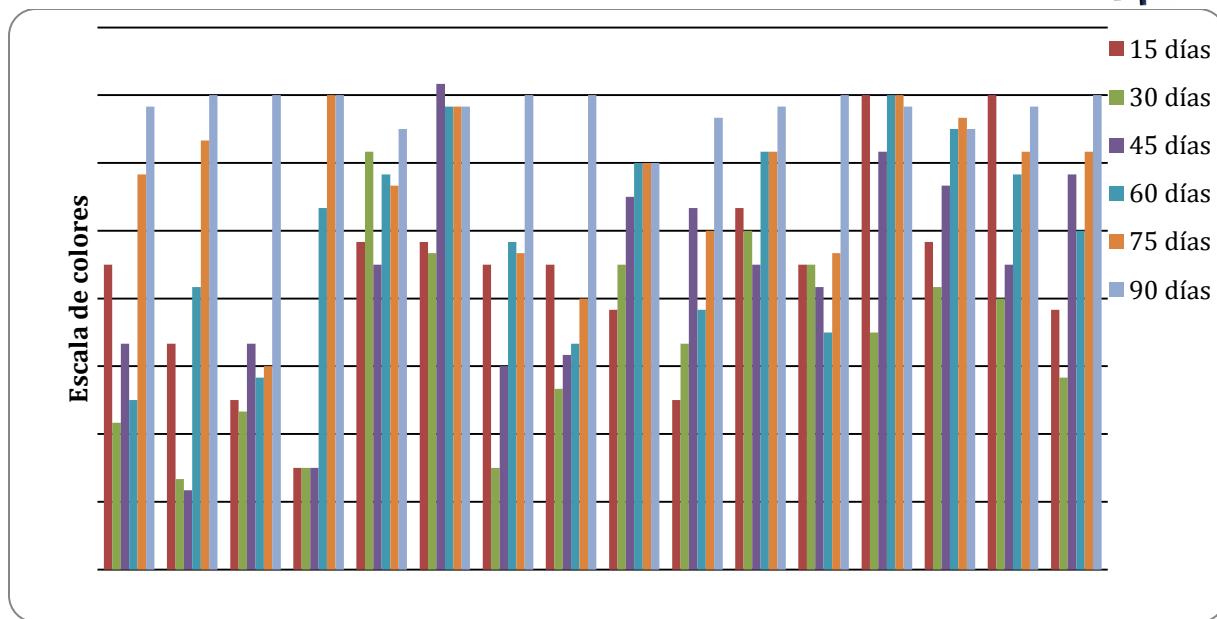


10	0.25	0.5	0.5	33	Rep 4,6
11	0.5	1	0.5	17	Rep 3
13	0	0	1	17	Rep 2
14	0.25	0.5	1	50	Rep 3,5,6
15	0.5	1	1	17	Rep 4

El tratamiento 9 con dosis de (ANA 0 ppm-IBA 0 ppm, BA 0.5 ppm) resulta al 100% en el desarrollo de los meristemos sembrados.

El 50% de sobrevivencia se encuentran en los tratamientos 5 y 14, el tratamiento 10 tuvo un porcentaje del 33%, los tratamientos 1, 6, 7, 11, 13 y 15 comparten el 17%, éstos porcentaje se deben a que dentro de cada una de las unidades experimentales se sembró y manejo 1 meristemo que fue cambiando de ubicación por 10 veces y a medio de cultivo 2 veces que generó daños por la manipulación dentro y fuera del tubo de ensayo y conservados en el cuarto de crecimiento intensivo.

Gráfico 12. Valores codificados para los Tratamientos del comportamiento de los meristemos cada 15 días de *Maxillaria grandis*.



Con los promedios del ADEVA del anexo 8 se realizó el gráfico 11, en el cual los tratamientos con cada uno de los meristemos se comportaron de la siguiente manera: para cada una de las diferentes etapas de evaluación. Desde los 9 a 15 días se realizaron 4 movidas de ubicación de los meristemos dentro del medio de cultivo.

Primera evaluación.- el color de los meristemos se caracterizó por encontrarse dentro de un color marrón, blanco marrón y negro (2, 3, y 4) dentro del rango se encontraron los siguientes tratamientos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 16.

Entre los 15 y 30 días se cambiaron la ubicación de los meristemos 2 ocasiones dentro del tubo de ensayo.



Los meristemos de acuerdo a la escala de colores se manifestaron un descenso de los valores dentro de la escala de colores; los tratamientos formaron 3 grupos, en el primero, los de color blanco y blanco marrón (1, 3) se localizan los tratamientos: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 16 y el otro grupo de los tratamientos 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15 sus meristemos mantuvieron una coloración negro dentro de la escala de colores para el tratamientos 5 manifestó un color verde con cambio de forma del meristemo.

Entre los 30 y 45 días, se realizó 1 movida, además se efectuó a los 45 días el cambio a medio fresco, y manifestaron un incremento de los valores que corresponde a las evaluaciones cualitativas del color de los meristemos, esta característica no manifiesta los tratamientos 2, 5, 11 y 12. Los colores blanco marrón y negro en los meristemos, se presentó en los tratamientos 1, 3, 7, 8, 11, 12 y 15. Otro grupo se encuentra conformada por los tratamientos 6, 9, 10, 13, 14 y 16 pues los meristemos presentaron coloración verdes.

La evaluación realizada a los 60 días, los meristemos se desarrollaron en medio de cultivos frescos, además de su cambio existió el efecto de extracción y exposición a efectos del aire de la cámara de flujo laminar, que se refleja en los tratamientos 1, 3, 6, 10, 16 y se mantuvieron en el mismo valor



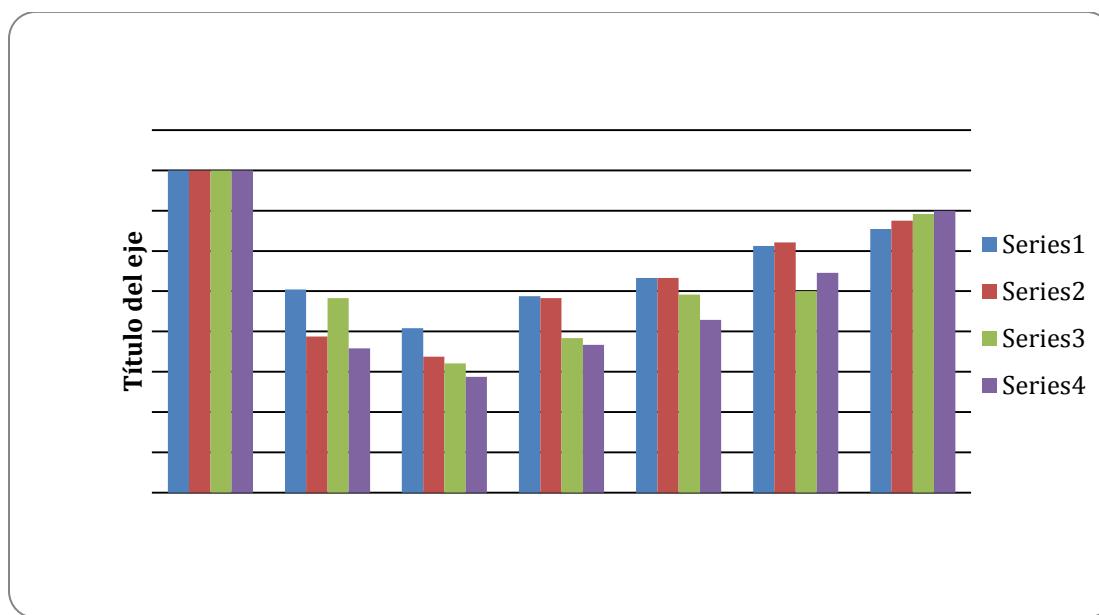
de la escala de colores, en el tratamiento 8 podría ser la causa de muerte de los meristemos como se dio en el caso del tratamiento 13, como consecuencia del nuevo medio de cultivo con la misma dosificaciones de auxinas y citquoininas utilizada para la siembra de meristemos, se encontró un incremento en sus valores de la codificación del color para los tratamientos 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, y 15, los tratamientos 9 y 11 se incrementaron de color verde y con un cambio de forma de los meristemos.

A los 75 días de desarrollo in vitro de los meristemos de *Maxillaria grandis* se encontró el siguiente comportamiento: no se determino cambios en relación a la evaluación de los 60 días los tratamientos 9, 11, 15 y 16 se ubican los meristemos con un color verde además presentaron cambios de forma.

A los 90 días los meristemos presentaron el siguiente comportamiento: los tratamientos 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15 y 16 se ubicaron dentro de la escala de colores en el valor codificado 7 el cual representa muerte. Los tratamientos 4 y 6 se mantuvieron desde la evaluación anterior en la escala 7, con una muerte total, de los meristemos. Los tratamientos 13 y 14 bajan su valor dentro del comportamiento de los meristemos pero al tener un porcentaje alto de mortandad se ubicó dentro de la escala 7. Para el tratamiento 9 con todas

sus repeticiones se ubicaron en el rango 6, el cual determinó el cambio de forma y su desarrollo para el comportamiento de los meristemos.

Gráfico 13. Promedios del Análisis de ADEVA para Auxinas de los meristemos con en *Maxillaria grandis* para los tratamientos.

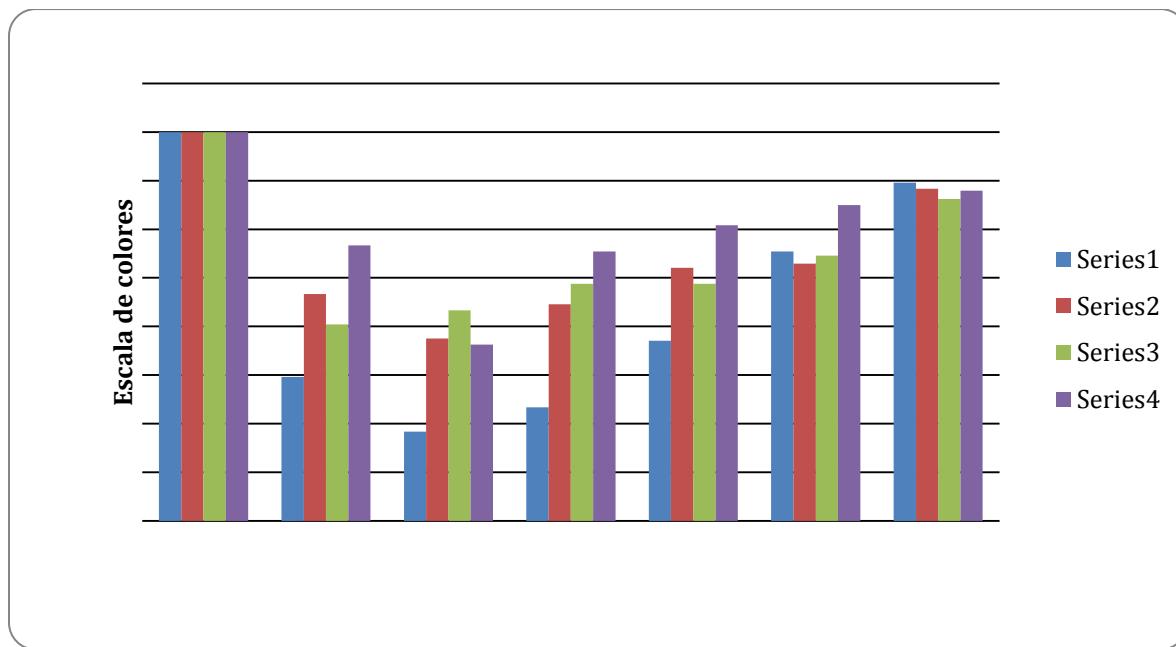


Del gráfico 16, las dosis de auxinas mantuvieron en comportamiento de descenso de los 9 a los 30 días, luego presentaron un incremento hasta la evaluación de los 90 días en sus colores codificados.

A los 15 días los meristemos se caracterizaron por presentar colores entre verde y negro, a los 30 días las dosis de 2, 3 y 4 presentaron un color blanco marrón, a los 45 días las dosis 1 y

2 se ubicó próximo al verde y las dosis 3 y 4 en un valor negro, a los 60 días las dosis 1, 2, y 3 de color verde y dosis de color negro, a los 75 días las dosis 1 y 2 los meristemos están de color verde y cambio de forma y las dosis de 3 y 4 de color verde, a los 90 días próximos a su muerte.

Gráfico 14. Promedios de valores codificados para las dosis de Citoquininas del comportamiento de los meristemos de *Maxillaria grandis* en cada una de las etapas de evaluación.



En el gráfico 17 se define el siguiente comportamiento: de los valores codificados para los 9 días existió un descenso para los 15 días y luego se presenta un incremento, la dosis de citoquininas 3 son las evaluaciones de los 45 y 60 días,



manifestó similitud en sus valores, de igual manera se comportó la dosis 2 entre las evaluaciones a los 60 y 75 días.



V. Conclusiones.

- El tratamiento 9 (ANA 0 – ABA 0 y BA 0.5) se mantuvo con una coloración verde y cambio de forma una sobrevivencia del 100%, con un 50% de sobrevivencia se encontraron los tratamientos 5 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.25) y 14 (ANA 0.25 – ABA 0.5 y BA 1) a los 90 días.
- A los 15 días de evaluación los meristemos tuvieron un descenso de comportamiento según la escala de colores que se ubicó entre blanco marrón y negro.
- A los 30 días el tratamiento 5 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.25) tuvo un cambio de color a verde y forma pero este cambio no se mantuvo.
- A los 45 días los tratamientos 6 (ANA 0.25 – ABA 0.5, BA 0.25), 9 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.5); 10 (ANA 0.25 – ABA 0.5, BA 0.5); 13 (ANA 0 – ABA 0, BA 1); 14 (ANA 0.25 – ABA 0.5 y BA 1); y 16 (ANA 1 – ABA 2, BA 1) presentaron coloración verde.



- A los 60 días los tratamientos se 9 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.5) y 11 (ANA 0.5 – ABA 1 y BA 0.5) manifestaron cambio de color a verde y de forma en sus meristemos.

- A los 75 días posteriores a la siembra los tratamientos 9 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.5) y 11 (ANA 0 – ABA 0 y BA 0.25) mantuvieron y los tratamientos 5 y 16 se ubicaron con un cambio de color y forma.

- Para la investigación se realizó 10 movimientos de los meristemos dentro de cada uno de los tubos, y con 2 medios de cultivos con cada una de las concentraciones y dosificaciones de sales minerales planteadas.



VI. Recomendaciones.

- Utilizar el medio de cultivo Phytamax al 33.3% más ANA 0 – IBA 0 y BA 0.5 ppm que conforma el tratamiento 9 para obtener el 100% de sobrevivencia.
- Se debe mejorar el medio de cultivo para el género *Maxillaria* para obtener plantas vigorosas in vitro; e investigar los efectos a diferentes intensidades de luz y temperatura; dejar en obscuridad hasta los 30 días para evitar fenolizaciones de los meristemos.
- Trabajar con más de un tubo por unidad experimental para conformar una repetición.
- No trabajar con el tratamiento 4 (ANA 1 – IBA 2; BA 0) y 8 (ANA 1 – IBA 2; BA 0.25) debido a que estos tratamientos no cambiaron de color a verde se mantuvieron dentro del los rangos de color blanco a negro.



- Investigar dosis de auxinas y citoquininas para producir callosidades e incrementar los coeficientes de multiplicación in vitro.
- Realizar trabajos similares o diferentes con otras especies de orquídeas.



VII. Resumen

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que se presentan en la familia de las *Orchidaceae* son los virus, que eliminan por completo al cultivo y por ende la producción de la flor cortada. Comprendiendo la importancia económica, medicinal, y de endemismos de las orquídeas, y sabiendo que nuestro país cuenta con una adecuada biodiversidad para el desarrollo de este tipo de plantas, encontramos una gran gama de especies que llaman la atención no sólo por sus atractivos, sino también para la investigación científica. Entre las principales especies de orquídeas tenemos a la *Maxillaria grandis*, la misma que se encuentra en peligro crítico, por ello nos vemos en la obligación de realizar estudios referentes a salvaguardar las especies. Por esta razón la investigación se encamina en desarrollar a nivel in vitro meristemos, con diferentes dosis de Auxinas (ANA-IBA) y Citoquininas (BA) en la especie de *Maxillaria grandis*, así como determinar el comportamiento y variaciones que pudieron tener. Para obtener los resultados planteados se procedió a la recopilación y clasificación de información para determinar las características de la especie en estudio, toda esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias



OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general.

- Desarrollar meristemas de *Maxillaria grandis* a nivel *in vitro*

Objetivos específicos.

- Evaluar el porcentaje de meristemas vivos después de la siembra.
- Evaluar los comportamientos y variaciones de los meristemas *in vitro*

Hipótesis.

- Las diferentes dosis de AUXINAS (IBA y ANA) y CITOQUININA (BA) actúan de manera diferente para el desarrollo de meristemas *in vitro* en la especie *Maxillaria grandis*?
- Las diferentes dosis de AUXINAS (IBA y ANA) y CITOQUININA (BA) no tienen efecto en el comportamiento para el desarrollo de meristemas *in vitro* en la especie *Maxillaria grandis*?

MATERIALES Y MÉTODOS



La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicada en:

Cantón: Cuenca.

Provincia: Azuay

Parroquia: Yanuncay.

Altitud: 2 584 m.s.n.m.

UTM: E 719768 **N** 9677340.

Temperatura Laboratorio (cámara del cultivo): 20 a 25 ° C

Precipitación promedio: 847 mm/año

La metodología de esta investigación fue la misma que se utiliza en el trabajo de laboratorio de la Facultad, esta ha sido impartida por el Ing. Francisco Merchán, resumida así:

Primera fase.-Se preparó los reactivos y soluciones de acuerdo a las dosis y concentraciones del medio de cultivo para la investigación.

Segunda fase.-Se preparó los medios de cultivo de acuerdo a los tratamientos y número de repeticiones; dispensados en tubos.



Tercera fase.-Esterilización de materiales y medio de cultivo (vidriería, papel, agua, medio de cultivo) en auto clave.

Cuarto fase.-Preparación del material vegetal, laboratorio, estufa, cámara de flujo laminar, pinzas, bisturís, papel, para los frascos, flameado, y destapado, eliminación de medios de cultivo no aptos para la siembra.

Quinta fase.- Dentro del material vegetal se identificó los mejores explantes que se encontró en los frascos para la extracción de meristemos.

Sexta fase.- Extracción y siembra de meristemos dentro de la cámara de flujo laminar uso de papel estéril, bisturís, y jeringuillas hipodérmicas de insulina para el corte del meristemo, flameados de tubos, corte del agar para dejar el meristemo en el medio de cultivo, flameado del tubo, tapado, transporte a la cámara de crecimiento cada uno de los tubos, mover los meristemos cada día y cambiar a nuevo medio.

Séptima etapa.-Toma de datos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- El tratamiento 9 (ANA 0 – ABA 0 y BA 0.5) se mantuvo con una coloración verde y cambio de forma una



sobrevivencia del 100%, con un 50% de sobrevivencia se encontraron los tratamientos 5 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.25) y 14 (ANA 0.25 – ABA 0.5 y BA 1) a los 90 días.

- A los 15 días de evaluación los meristemos tuvieron un descenso de comportamiento según la escala de colores que se ubicó entre blanco marrón y negro.
- A los 30 días el tratamiento 5 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.25) tuvo un cambio de color a verde y forma pero este cambio no se mantuvo.
- A los 45 días los tratamientos 6 (ANA 0.25 – ABA 0.5, BA 0.25), 9 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.5); 10 (ANA 0.25 – ABA 0.5, BA 0.5); 13 (ANA 0 – ABA 0, BA 1); 14 (ANA 0.25 – ABA 0.5 y BA 1); y 16 (ANA 1 – ABA 2, BA 1) presentaron coloración verde.
- A los 60 días los tratamientos se 9 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.5)y 11 (ANA 0.5 – ABA 1 y BA 0.5) manifestaron cambio de color a verde y de forma en sus meristemos.



- A los 75 días posteriores a la siembra los tratamientos 9 (ANA 0 – ABA 0, BA 0.5) y 11 (ANA 0 – ABA 0 y BA 0.25) mantuvieron y los tratamientos 5 y 16 se ubicaron con un cambio de color y forma.

- Para la investigación se realizó 10 movimientos de los meristemos dentro de cada uno de los tubos, y con 2 medios de cultivos con cada una de las concentraciones y dosificaciones de sales minerales planteadas.

RECOMENDACIONES

- Se debe mejorar el medio de cultivo para el género *Maxillaria* para obtener plantas vigorosas in vitro; e investigar los efectos a diferentes intensidades de luz y temperatura; dejar en obscuridad hasta los 30 días para evitar fenolizaciones de los meristemos.

- No trabajar con el tratamiento 4 (ANA 1 – IBA 2; BA 0) y 8 (ANA 1 – IBA 2; BA 0.25) debido a que estos tratamientos no cambiaron de color a verde se mantuvieron dentro del los rangos de color blanco a negro.



- Investigar dosis de auxinas y citoquininas para producir callosidades e incrementar los coeficientes de multiplicación *in vitro*. Realizar trabajos similares o diferentes con otras especies de orquídeas.



VIII. Summary

INTRODUCTION

One of the main problems that arise in the family Orchidaceae are viruses, which completely eliminated the crop and hence the production of cut flowers. Understanding the economic, medicinal, and endemic species of orchids, and knowing that our country has an adequate biodiversity for development of these plants, we found a wide range of species that call the attention not only for its attractions, but also for scientific research. Among the main species of orchids have to Maxillaria grandis, the same as critically endangered, so we feel obliged to conduct studies relating to safeguarding the species. For this reason the research is aimed at developing in vitro meristems, with different doses of auxin (NAA, IBA) and cytokinin (BA) in the species of Maxillaria grandis, and to determine the behavior and variations that might have. To get the results raised proceeded to the collection and classification of information to determine the characteristics of the species under study, all this research was conducted in the Tissue Culture Laboratory, Faculty of Science

OBJECTIVES

General objective



- Develop *grandis Maxillaria* meristems in vitro

Specific objectives

- Evaluate the percentage of living meristems after planting.
- Evaluate changes in behavior and in vitro meristems

Hypotheses.

- Different doses of Auxins (IBA and NAA) and cytokinin (BA) to act differently in meristem development in the species *Maxillaria Vitria grandis*?
- Different doses of Auxins (IBA and NAA) and cytokinin (BA) have no effect on the behavior of meristem development in *Maxillaria* species *Vitria* in *grandis*?

MATERIALS AND METHODS

This research was conducted at the Laboratory of Textiles, Faculty of Agricultural Sciences, University of Cuenca, located at:

City: Cuenca.

Province: Azuay

Parish: Yanuncay.



Altitude: 2584 m.s.n.m.

UTM:E 719768 N 9677340.

Temperature Laboratory (crop camera): 20 to 25 ° C

Average rainfall: 847 mm / year.

The methodology of this research was the same as that used in laboratory work at the School, this has been provided by Mr. Francisco Merchan, summarized as follows:

The first phase.- reagents and solutions prepared according to the dose and concentration of the culture medium for research.

Second phase.- Prepared culture media according to treatment and number of repetitions, dispensed into tubes.

Third phase.- Sterilization of materials and culture media (glass, paper, water, culture medium) in an autoclave.

Fourth phase.- Preparation of plant material, lab oven, laminar flow chamber, forceps, scalpels, paper, for bottles, flamed, and uncovered, removal of culture media unsuitable for planting.

Fifth phase of the plant material.- Within identified the best explants was found in the vials for the extraction of meristems.



Sixth phase.- Meristem removal and planting within the laminar flow chamber using sterile paper, scalpels and hypodermic syringes, insulin meristem cutting, flame tubes, cut to leave the meristem agar in the culture medium flame tube , covered, transport to the growth chamber each tube, move the meristems each day and switch to new media.

Seventh phase.- Data collection.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The treatment 9 (ANA 0 - ABA BA 0 and 0.5) was maintained with a green color change is a 100% survival, with 50% survival treatments were 5 (ANA 0 - 0 ABA, BA 0.25) and 14 (ANA 0.25 -0.5 ABA and BA 1) at 90 days.

At 15-day trial meristems had a decrease in behavior that the color scale was between brown and black white.

At 30 days of treatment 5 (ANA 0 - 0 ABA, BA 0.25) had a color change to green, but this change is not sustained.

At 45 days of treatment 6 (ANA 0.25 - ABA 0.5, BA 0.25), 9 (ANA0 - 0 ABA, BA 0.5), 10 (ANA 0.25 - ABA 0.5, BA 0.5), 13 (ANA 0 -ABA 0, BA 1), 14 (ANA 0.25 - 0.5 ABA and BA 1), and 16 (ANA 1- ABA 2, BA 1) is colored green.



At 60 days the treatments were 9 (ANA 0 - 0 ABA, BA 0.5) and 11 (ANA 0.5 - ABA BA 1 and 0.5) showed color change to green and how their meristems.

At 75 days after sowing treatments 9 (ANA 0 - 0 ABA, BA 0.5) and 11 (ANA 0 - ABA BA 0 and 0.25) and kept the treatments 5 and 16 were placed with a change of color and form .

For the research was carried out 10 moves of meristems withineach of the tubes, and 2 medium with each of the concentrationsand dosages of minerals raised.

RECOMMENDATIONS

It should improve the culture medium for the genus Maxillaria vigorous plants for in vitro and investigate the effects of different intensities of light and temperature in the dark leave to 30 days to avoid phenolized of meristems.

We do not recommend working with treatment 4 (ANA 1 - IBA 2;BA 0) and 8 (ANA 1 - IBA 2, BA 0.25) because these treatments do not change color to green remained within the ranges from white to black.

Investigate doses of auxins and cytokinins to produce calluses and increase in vitro multiplication coefficients. Similar work or different orchid species



IX. Bibliografía citada

1. ARDITII JOSEPH y R. ERNST, eds 1992. *Micropropagation of Orchids.* ed. Canada, A Wiley-Interscience publication. 682 p.
2. BANKS DAVID, eds 2006. *Cultivo de Orquídeas propagación y variedades,* ed Barcelona, Tecnilibro, p 72.
3. CASTILLO T. RAÚL; J. ESTRELLA; C. TAPIA, eds 1991. *Técnicas para el manejo y uso de los recursos fitogenéticos -* INIAP. ed, Quito, Ecuador. Porvenir. p 71-76.
4. DODSON H. CALAWAL.eds 2002. *Nativas Ecuadorian Orchids,* ed Dodson trust, Volumen II, U.S.A,
5. DODSON H. CALAWAL .eds 2002. *Nativas Ecuadorian Orchids,* ed Dodson trust, Volumen III, U.S.A, p 570.
6. GUACHIZACA IVAN; eds 2011. *Trasplanté de plántulas. Subcultivos.* III Curso Internacional de Cultivos In vitro y Germoplasma de Orquídeas (Comunicación Personal)



7. HARTMANN T. HUDSON; D. KESTER, eds 1968. Propagación de plantas. ed, 2º México. Continental. p 633-634
8. KIJIMA TAKASHI, eds 1994. Orquídeas. Colores Sugerencias y Fascinación de una flor mítica. ed, Rotolito Lombarda S.p.a. Pioltello (Milan). p 207
9. MERCHAN FRANCISCO, eds 2009. Extracción y Siembra de Meristemo. Ecuador, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Quinto año, clases de Biotecnología, (Comunicación Personal)
10. MÚJIA ERNESTO, R. PEREZ; J.BOCOURT V; P. LÓPEZ; T. RAMOS C, eds 2000. Géneros de Orquídeas Cubana, ed. Felix Varela, p 104.
11. RINGO JOHN, eds2004. Genética Fundamental, ed Acribia S.A., p 179.
12. RIOS MOSERRAT; M. KOZIOL; H. BORGLOFT; yG. Granda, eds 2007. Plantas Útiles del Ecuador Aplicaciones, Retos y Perspectivas. Quito, Abya-Yala, p 198.



13. RIVERO M. MARIA, eds 2007. Agrobiotecnología Cultivo de células y tejidos. Ecuador, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular Universidad de Buenos Aires. Conferencia. (Comunicación Personal).
14. ROCA W. NÚÑEZ; y V. MORNAN, eds 1991. Infraestructura adecuada para el cultivo de tejidos En: En Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones, ed CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Cap. 11: 271 – 294.
15. RODRIGUEZ JULIAN, eds 2005. Agrobiotecnología Cultivo de Tejidos Vegetales Sistema de Micropropagación vegetal Cultivo de Meristemo, Ecuador, Conferencia. (Comunicación Personal)
16. SÁNCHEZ EDUARDO. eds, 2010. Clasificación taxonómica *Maxillaria grandis.*, Profesor de la Facultad de Ciencias químicas de la Universidad de Cuenca, (Comunicación Personal)



17. SEATON PHILIP; M. RAMSAY, eds. 2009. Cultivo de orquídeas por semillas. Traducido por Jorge Warner, ed. Reino Unido, Royal Botanic Gardens. p 32,36.

18. SEATON PHILIP; eds. 2011. Técnicas para cultivar orquídeas *In Vitro*. Técnicas para conservación de semillas. Jardín Botánico de Quito. III Curso Internacional de Cultivos In vitro y Germoplasma de Orquídeas (Comunicación Personal)

19. SIGMA CELL CULTURE REAGENTS, eds 1930. Plant tissue culture. ed. Desconocido, U.S.A.

20. VACA LEONARDO, eds 2011. III Curso Internacional de Cultivos In vitro y Germoplasma de Orquídeas. (Comunicación Personal)

21. WEAVER ROBERT J. eds 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. ed. Trillas, reimpresión 1985, México. p 20.

22. ZELENKO HARRY; P. BERMUDEZ, eds 2009. Orchids species of Perú, ed. Copyright, p 220.



Citas electrónicas

23. A B C GARDEN. Línea de productos para jardinería y Garden centers.sf (sin fecha). LAS ORQUÍDEAS MÁS CULTIVADAS. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS ORQUÍDEAS. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA. GÉNEROS CYMBIDIUM, CATTLEYA Y PHALAENOPSIS, ed Copyright Infoagro System S.L. Disponible en:

<http://www.infoagro.com/flores/flores/orquideas.htm>.

(Consultado 5/10/2010)

24. BASE DE LOS TRÓPICOS. eds 2011. Missouri Botanical Garden- 4344.*Maxillariasanderiana* Rchb. f. ex Sander. ed. Shaw Boulevard – Saint Louis, Missouri 63110. Disponible en:

<http://www.tropicos.org/Name/23507086>. (Consultado 6/02/2011)

25. ENDARA LORENA. eds 2009. ORQUIDEAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR. Museo de Historio Natural de Florida. Herbario Flas Proyectos, ed FLMNH. Disponible en:

<http://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/SNAP.htm>. (Consultado 7/03/2011)



26. LUCAS EMILIO. sf (sin fecha). MORFOGÉNESIS EN EL MERISTEMO APICAL. MULTIPLICACIÓN MASIVA DE VEGETALES. RECUPERACIÓN DE PLANTAS LIBRES DE PATÓGENOS. TERMOTERAPIA. QUIMIOTERAPIA, ed Monografía.com S.A. Disponible en:

<http://www.monografias.com/trabajos12/apicult/apicult.shtml>.

(Consultado 5/10/2010)

27. MIRRO ANGELA. sf. Gráfico de *Maxillaria grandis*, ed. <http://www.angelamirro.com/am-gallery-1.htm>. (Consultado 23/08/2010)

28. PELACHO ANA MARÍA; M. LLUÍS; R. CUEVA; J. SANFELIU LLOP; J. BADÍA; G. ALINS. sf (sin fecha). MEIDOS DE CULTIVOS IN VITRIO, ed. Esta Web ha nacido en la Unidad de Fisiología Vegetal del Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida. Disponible en: www.etsea2.udl.es/invitrio/medios.htm. (Consultado 5/10/2010)



X. Anexos

Anexos 1. Datos originales para realización del análisis de ADEVA para los 9 días de comportamiento de los meristemos.

Tratamientos	Auxinas	Citoquininas	Repeticiones	9 días
1	1	1	1	8
1	1	1	2	8
1	1	1	3	8
1	1	1	4	8
1	1	1	5	8
1	1	1	6	8
2	2	1	1	8
2	2	1	2	8
2	2	1	3	8
2	2	1	4	8
2	2	1	5	8
2	2	1	6	8
3	3	1	1	8
3	3	1	2	8
3	3	1	3	8
3	3	1	4	8



3	3	1	5	8
3	3	1	6	8
4	4	1	1	8
4	4	1	2	8
4	4	1	3	8
4	4	1	4	8
4	4	1	5	8
4	4	1	6	8
5	1	2	1	8
5	1	2	2	8
5	1	2	3	8
5	1	2	4	8
5	1	2	5	8
5	1	2	6	8
6	2	2	1	8
6	2	2	2	8
6	2	2	3	8
6	2	2	4	8
6	2	2	5	8
6	2	2	6	8
7	3	2	1	8
7	3	2	2	8
7	3	2	3	8



7	3	2	4	8
7	3	2	5	8
7	3	2	6	8
8	4	2	1	8
8	4	2	2	8
8	4	2	3	8
8	4	2	4	8
8	4	2	5	8
8	4	2	6	8
9	1	3	1	8
9	1	3	2	8
9	1	3	3	8
9	1	3	4	8
9	1	3	5	8
9	1	3	6	8
10	2	3	1	8
10	2	3	2	8
10	2	3	3	8
10	2	3	4	8
10	2	3	5	8
10	2	3	6	8
11	3	3	1	8
11	3	3	2	8



11	3	3	3	8
11	3	3	4	8
11	3	3	5	8
11	3	3	6	8
12	4	3	1	8
12	4	3	2	8
12	4	3	3	8
12	4	3	4	8
12	4	3	5	8
12	4	3	6	8
13	1	4	1	8
13	1	4	2	8
13	1	4	3	8
13	1	4	4	8
13	1	4	5	8
13	1	4	6	8
14	2	4	1	8
14	2	4	2	8
14	2	4	3	8
14	2	4	4	8
14	2	4	5	8
14	2	4	6	8
15	3	4	1	8



15	3	4	2	8
15	3	4	3	8
15	3	4	4	8
15	3	4	5	8
15	3	4	6	8
16	4	4	1	8
16	4	4	2	8
16	4	4	3	8
16	4	4	4	8
16	4	4	5	8
16	4	4	6	8



Anexo 2. Datos originales para realización del análisis de ADEVA para los 15 días de comportamiento de los meristemos.

Tratamientos	Auxinas	Citoquininas	Repeticiones	15 días
1	1	1	1	8
1	1	1	2	8
1	1	1	3	1
1	1	1	4	1
1	1	1	5	8
1	1	1	6	1
2	2	1	1	1
2	2	1	2	1
2	2	1	3	8
2	2	1	4	1
2	2	1	5	1
2	2	1	6	8
3	3	1	1	1
3	3	1	2	1
3	3	1	3	3
3	3	1	4	1
3	3	1	5	1
3	3	1	6	8



4	4	1	1	2
4	4	1	2	1
4	4	1	3	2
4	4	1	4	1
4	4	1	5	1
4	4	1	6	2
5	1	2	1	1
5	1	2	2	2
5	1	2	3	8
5	1	2	4	1
5	1	2	5	8
5	1	2	6	8
6	2	2	1	2
6	2	2	2	8
6	2	2	3	1
6	2	2	4	8
6	2	2	5	8
6	2	2	6	2
7	3	2	1	8
7	3	2	2	8
7	3	2	3	1
7	3	2	4	1
7	3	2	5	1



7	3	2	6	8
8	4	2	1	8
8	4	2	2	8
8	4	2	3	1
8	4	2	4	1
8	4	2	5	1
8	4	2	6	8
9	1	3	1	8
9	1	3	2	2
9	1	3	3	2
9	1	3	4	2
9	1	3	5	1
9	1	3	6	8
10	2	3	1	2
10	2	3	2	2
10	2	3	3	1
10	2	3	4	1
10	2	3	5	1
10	2	3	6	8
11	3	3	1	8
11	3	3	2	2
11	3	3	3	8
11	3	3	4	8



11	3	3	5	2
11	3	3	6	4
12	4	3	1	8
12	4	3	2	1
12	4	3	3	8
12	4	3	4	8
12	4	3	5	1
12	4	3	6	1
13	1	4	1	8
13	1	4	2	8
13	1	4	3	2
13	1	4	4	8
13	1	4	5	8
13	1	4	6	8
14	2	4	1	1
14	2	4	2	2
14	2	4	3	8
14	2	4	4	8
14	2	4	5	8
14	2	4	6	2
15	3	4	1	8
15	3	4	2	8
15	3	4	3	8



15	3	4	4	8
15	3	4	5	8
15	3	4	6	2
16	4	4	1	8
16	4	4	2	2
16	4	4	3	8
16	4	4	4	2
16	4	4	5	1
16	4	4	6	2



Anexo 3. Datos originales para realización del análisis de ADEVA para los 30 días de comportamiento de los meristemos.

Tratamientos	Auxinas	Citoquininas	Repeticiones	30 días
1	1	1	1	1
1	1	1	2	1
1	1	1	3	1
1	1	1	4	1
1	1	1	5	8
1	1	1	6	1
2	2	1	1	1
2	2	1	2	1
2	2	1	3	2
2	2	1	4	1
2	2	1	5	1
2	2	1	6	2
3	3	1	1	1
3	3	1	2	1
3	3	1	3	2
3	3	1	4	1
3	3	1	5	1
3	3	1	6	8
4	4	1	1	2



4	4	1	2	1
4	4	1	3	2
4	4	1	4	1
4	4	1	5	1
4	4	1	6	2
5	1	2	1	5
5	1	2	2	7
5	1	2	3	8
5	1	2	4	1
5	1	2	5	8
5	1	2	6	8
6	2	2	1	2
6	2	2	2	7
6	2	2	3	2
6	2	2	4	8
6	2	2	5	7
6	2	2	6	2
7	3	2	1	1
7	3	2	2	2
7	3	2	3	1
7	3	2	4	2
7	3	2	5	2
7	3	2	6	1



8	4	2	1	3
8	4	2	2	7
8	4	2	3	1
8	4	2	4	1
8	4	2	5	1
8	4	2	6	3
9	1	3	1	8
9	1	3	2	3
9	1	3	3	3
9	1	3	4	3
9	1	3	5	5
9	1	3	6	5
10	2	3	1	2
10	2	3	2	1
10	2	3	3	1
10	2	3	4	5
10	2	3	5	3
10	2	3	6	8
11	3	3	1	8
11	3	3	2	7
11	3	3	3	1
11	3	3	4	8
11	3	3	5	2



11	3	3	6	4
12	4	3	1	8
12	4	3	2	7
12	4	3	3	2
12	4	3	4	8
12	4	3	5	1
12	4	3	6	1
13	1	4	1	8
13	1	4	2	2
13	1	4	3	3
13	1	4	4	2
13	1	4	5	3
13	1	4	6	3
14	2	4	1	1
14	2	4	2	2
14	2	4	3	5
14	2	4	4	7
14	2	4	5	8
14	2	4	6	2
15	3	4	1	1
15	3	4	2	2
15	3	4	3	8
15	3	4	4	8



15	3	4	5	1
15	3	4	6	4
16	4	4	1	8
16	4	4	2	2
16	4	4	3	3
16	4	4	4	2
16	4	4	5	1
16	4	4	6	1



Anexo 4. Datos originales para realización del análisis de ADEVA para los 45 días de comportamiento de los meristemos.

Tratamientos	Auxinas	Citoquininas	Repeticiones	45 días
1	1	1	1	1
1	1	1	2	1
1	1	1	3	5
1	1	1	4	5
1	1	1	5	7
1	1	1	6	1
2	2	1	1	1
2	2	1	2	1
2	2	1	3	1
2	2	1	4	1
2	2	1	5	1
2	2	1	6	2
3	3	1	1	1
3	3	1	2	1
3	3	1	3	2
3	3	1	4	7
3	3	1	5	1
3	3	1	6	8
4	4	1	1	2



4	4	1	2	1
4	4	1	3	2
4	4	1	4	1
4	4	1	5	1
4	4	1	6	2
5	1	2	1	6
5	1	2	2	7
5	1	2	3	5
5	1	2	4	1
5	1	2	5	6
5	1	2	6	2
6	2	2	1	7
6	2	2	2	7
6	2	2	3	7
6	2	2	4	8
6	2	2	5	7
6	2	2	6	7
7	3	2	1	1
7	3	2	2	2
7	3	2	3	1
7	3	2	4	7
7	3	2	5	6
7	3	2	6	1



8	4	2	1	2
8	4	2	2	7
8	4	2	3	1
8	4	2	4	1
8	4	2	5	1
8	4	2	6	7
9	1	3	1	5
9	1	3	2	5
9	1	3	3	6
9	1	3	4	6
9	1	3	5	5
9	1	3	6	6
10	2	3	1	7
10	2	3	2	1
10	2	3	3	6
10	2	3	4	5
10	2	3	5	7
10	2	3	6	6
11	3	3	1	8
11	3	3	2	7
11	3	3	3	1
11	3	3	4	2
11	3	3	5	2



11	3	3	6	7
12	4	3	1	8
12	4	3	2	7
12	4	3	3	7
12	4	3	4	1
12	4	3	5	1
12	4	3	6	1
13	1	4	1	8
13	1	4	2	2
13	1	4	3	7
13	1	4	4	6
13	1	4	5	7
13	1	4	6	7
14	2	4	1	7
14	2	4	2	2
14	2	4	3	6
14	2	4	4	7
14	2	4	5	7
14	2	4	6	5
15	3	4	1	1
15	3	4	2	7
15	3	4	3	5
15	3	4	4	6



15	3	4	5	1
15	3	4	6	7
16	4	4	1	8
16	4	4	2	7
16	4	4	3	7
16	4	4	4	7
16	4	4	5	1
16	4	4	6	5



Anexo 5. Datos originales para realización del análisis de ADEVA para los 60 días de comportamiento de los meristemos.

Tratamientos	Auxinas	Citoquininas	Repeticiones	60 días
1	1	1	1	1
1	1	1	2	1
1	1	1	3	5
1	1	1	4	6
1	1	1	5	1
1	1	1	6	1
2	2	1	1	1
2	2	1	2	2
2	2	1	3	1
2	2	1	4	7
2	2	1	5	7
2	2	1	6	7
3	3	1	1	2
3	3	1	2	1
3	3	1	3	2
3	3	1	4	7
3	3	1	5	3
3	3	1	6	2



4	4	1	1	7
4	4	1	2	2
4	4	1	3	7
4	4	1	4	7
4	4	1	5	2
4	4	1	6	7
5	1	2	1	6
5	1	2	2	7
5	1	2	3	6
5	1	2	4	7
5	1	2	5	6
5	1	2	6	3
6	2	2	1	7
6	2	2	2	7
6	2	2	3	7
6	2	2	4	6
6	2	2	5	7
6	2	2	6	7
7	3	2	1	4
7	3	2	2	4
7	3	2	3	6
7	3	2	4	7
7	3	2	5	7



7	3	2	6	1
8	4	2	1	3
8	4	2	2	7
8	4	2	3	1
8	4	2	4	1
8	4	2	5	1
8	4	2	6	7
9	1	3	1	6
9	1	3	2	6
9	1	3	3	6
9	1	3	4	6
9	1	3	5	6
9	1	3	6	6
10	2	3	1	7
10	2	3	2	2
10	2	3	3	1
10	2	3	4	5
10	2	3	5	7
10	2	3	6	5
11	3	3	1	8
11	3	3	2	7
11	3	3	3	6
11	3	3	4	7



11	3	3	5	2
11	3	3	6	7
12	4	3	1	4
12	4	3	2	7
12	4	3	3	7
12	4	3	4	1
12	4	3	5	1
12	4	3	6	1
13	1	4	1	8
13	1	4	2	6
13	1	4	3	7
13	1	4	4	7
13	1	4	5	7
13	1	4	6	7
14	2	4	1	7
14	2	4	2	7
14	2	4	3	6
14	2	4	4	7
14	2	4	5	7
14	2	4	6	5
15	3	4	1	1
15	3	4	2	7
15	3	4	3	7



15	3	4	4	6
15	3	4	5	7
15	3	4	6	7
16	4	4	1	7
16	4	4	2	7
16	4	4	3	7
16	4	4	4	7
16	4	4	5	1
16	4	4	6	1



Anexo 6. Datos originales para realización del análisis de ADEVA para los 75 días de comportamiento de los meristemos.

Tratamientos	Auxinas	Citoquininas	Repeticiones	75 días
1	1	1	1	7
1	1	1	2	7
1	1	1	3	6
1	1	1	4	7
1	1	1	5	1
1	1	1	6	7
2	2	1	1	7
2	2	1	2	3
2	2	1	3	7
2	2	1	4	7
2	2	1	5	7
2	2	1	6	7
3	3	1	1	1
3	3	1	2	1
3	3	1	3	7
3	3	1	4	7
3	3	1	5	1
3	3	1	6	1



4	4	1	1	7
4	4	1	2	7
4	4	1	3	7
4	4	1	4	7
4	4	1	5	7
4	4	1	6	7
5	1	2	1	6
5	1	2	2	7
5	1	2	3	6
5	1	2	4	7
5	1	2	5	6
5	1	2	6	2
6	2	2	1	7
6	2	2	2	7
6	2	2	3	7
6	2	2	4	6
6	2	2	5	7
6	2	2	6	7
7	3	2	1	1
7	3	2	2	7
7	3	2	3	6
7	3	2	4	7
7	3	2	5	6



7	3	2	6	1
8	4	2	1	7
8	4	2	2	7
8	4	2	3	1
8	4	2	4	1
8	4	2	5	1
8	4	2	6	7
9	1	3	1	6
9	1	3	2	6
9	1	3	3	6
9	1	3	4	6
9	1	3	5	6
9	1	3	6	6
10	2	3	1	7
10	2	3	2	3
10	2	3	3	1
10	2	3	4	6
10	2	3	5	7
10	2	3	6	6
11	3	3	1	8
11	3	3	2	7
11	3	3	3	6
11	3	3	4	7



11	3	3	5	2
11	3	3	6	7
12	4	3	1	7
12	4	3	2	7
12	4	3	3	7
12	4	3	4	3
12	4	3	5	3
12	4	3	6	1
13	1	4	1	8
13	1	4	2	6
13	1	4	3	7
13	1	4	4	7
13	1	4	5	7
13	1	4	6	7
14	2	4	1	7
14	2	4	2	7
14	2	4	3	6
14	2	4	4	7
14	2	4	5	7
14	2	4	6	6
15	3	4	1	3
15	3	4	2	7
15	3	4	3	7



15	3	4	4	6
15	3	4	5	7
15	3	4	6	7
16	4	4	1	7
16	4	4	2	7
16	4	4	3	7
16	4	4	4	7
16	4	4	5	7
16	4	4	6	2



Anexo 7. Datos originales para realización del análisis de ADEVA para los 90 días de comportamiento de los meristemos.

Tratamientos	Auxinas	Citoquininas	Repeticiones	90 días
1	1	1	1	7
1	1	1	2	7
1	1	1	3	6
1	1	1	4	7
1	1	1	5	7
1	1	1	6	7
2	2	1	1	7
2	2	1	2	7
2	2	1	3	7
2	2	1	4	7
2	2	1	5	7
2	2	1	6	7
3	3	1	1	7
3	3	1	2	7
3	3	1	3	7
3	3	1	4	7
3	3	1	5	7
3	3	1	6	7



4	4	1	1	7
4	4	1	2	7
4	4	1	3	7
4	4	1	4	7
4	4	1	5	7
4	4	1	6	7
5	1	2	1	6
5	1	2	2	7
5	1	2	3	6
5	1	2	4	7
5	1	2	5	6
5	1	2	6	7
6	2	2	1	7
6	2	2	2	7
6	2	2	3	7
6	2	2	4	6
6	2	2	5	7
6	2	2	6	7
7	3	2	1	7
7	3	2	2	7
7	3	2	3	7
7	3	2	4	7
7	3	2	5	7



7	3	2	6	7
8	4	2	1	7
8	4	2	2	7
8	4	2	3	7
8	4	2	4	7
8	4	2	5	7
8	4	2	6	7
9	1	3	1	6
9	1	3	2	6
9	1	3	3	6
9	1	3	4	6
9	1	3	5	6
9	1	3	6	6
10	2	3	1	7
10	2	3	2	7
10	2	3	3	7
10	2	3	4	6
10	2	3	5	7
10	2	3	6	6
11	3	3	1	7
11	3	3	2	7
11	3	3	3	6
11	3	3	4	7



11	3	3	5	7
11	3	3	6	7
12	4	3	1	7
12	4	3	2	7
12	4	3	3	7
12	4	3	4	7
12	4	3	5	7
12	4	3	6	7
13	1	4	1	7
13	1	4	2	6
13	1	4	3	7
13	1	4	4	7
13	1	4	5	7
13	1	4	6	7
14	2	4	1	7
14	2	4	2	7
14	2	4	3	6
14	2	4	4	7
14	2	4	5	6
14	2	4	6	6
15	3	4	1	7
15	3	4	2	7
15	3	4	3	7



15	3	4	4	6
15	3	4	5	7
15	3	4	6	7
16	4	4	1	7
16	4	4	2	7
16	4	4	3	7
16	4	4	4	7
16	4	4	5	7
16	4	4	6	7



Anexo 8. Datos originales de los promedios del comportamiento de los meristemos para cada una de las etapas de evaluación.

Tratamientos	15 días	30 días	45 días	60 días	75 días	90 días
1	4.5	2.16 7	3.333	2.5	5.833	6.833
2	3.333	1.33 3	1.167	4.167	6.333	7
3	2.5	2.33 3	3.333	2.833	3	7
4	1.5	1.5	1.5	5.333	7	7
5	4.833	6.16 7	4.5	5.833	5.667	6.5
6	4.833	4.66 7	7.167	6.833	6.833	6.833
7	4.5	1.5	3	4.833	4.667	7
8	4.5	2.66 7	3.167	3.333	4	7
9	3.833	4.5	5.5	6	6	6
10	2.5	3.33	5.333	3.833	5	6.667



		3					
11	5.333	5	4.5	6.167	6.167	6.833	
12	4.5	4.5	4.167	3.5	4.667		7
13	7	3.5	6.167	7	7	6.833	
14	4.833	4.16 7	5.667	6.5	6.667	6.5	
15	7	4	4.5	5.833	6.167	6.833	
16	3.833	2.83 3	5.833	5	6.167		7



Anexo 9. Datos originales de los promedios del comportamiento de los meristemos para cada una de las dosis de Auxinas para las diferentes etapas de evaluación.

Dosis	9 días	15 días	30 días	45 días	60 días	75 días	90 días
1	8	5.042	4.083	4.875	5.333	6.125	6.542
2	8	3.875	3.375	4.833	5.333	6.208	6.75
3	8	4.833	3.208	3.833	4.917	5	6.917
4	8	3.583	2.875	3.667	4.292	5.458	7

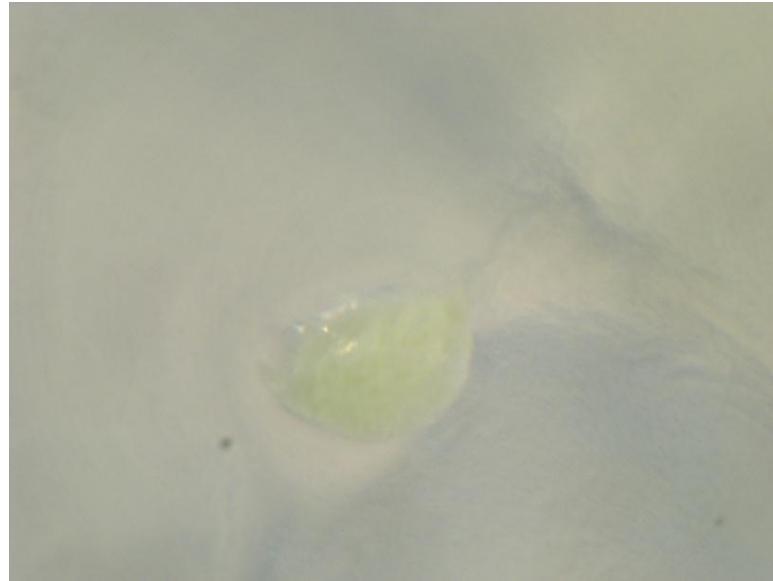


Anexo 10. Datos originales de los promedios del comportamiento de los meristemos para cada una de la dosis de Citoquininas para las diferentes etapas de evaluación.

Dosis	9 días	15 días	30 días	45 días	60 días	75 días	90 días
1	8	2.958	1.833	2.333	3.708	5.542	6.958
2	8	4.667	3.75	4.458	5.208	5.292	6.833
3	8	4.042	4.333	4.875	4.875	5.458	6.625
4	8	5.667	3.625	5.542	6.083	6.5	6.792

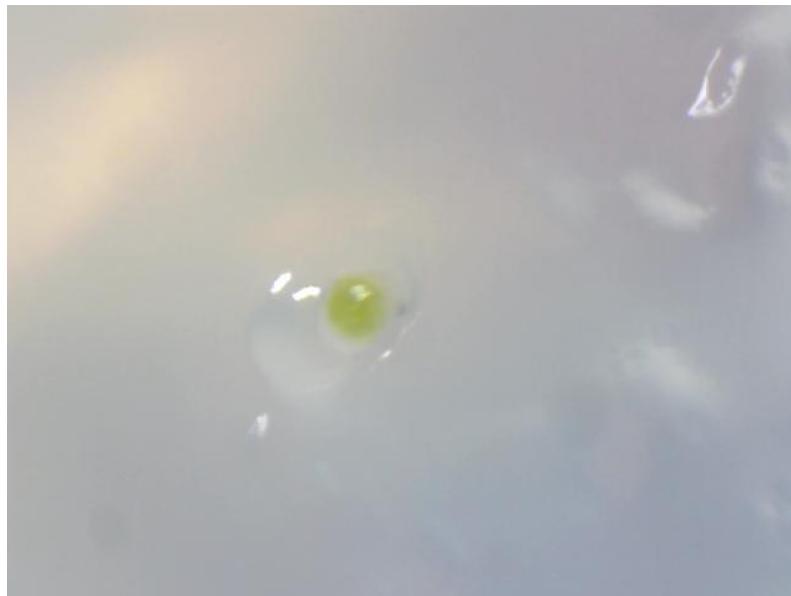


Anexo 11. Fotografías de los resultados obtenidos.



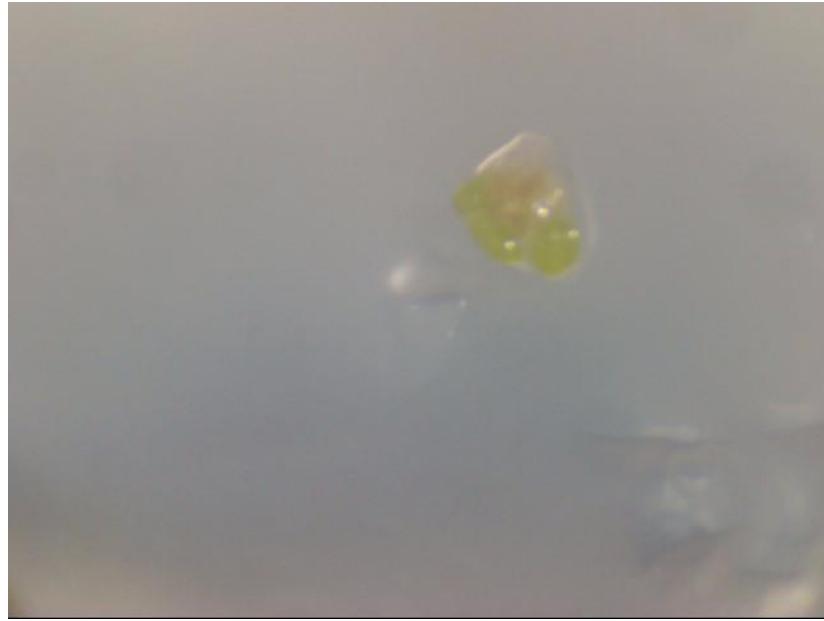
Fotografía 60.- Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandis* a los 9 días.

Fuente: Paola Cruz (2011)





Fotografía 61.-Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandisa* los 15 días
Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 62.- Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandisa* los 30 días.
Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 63.- Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandis* a los 45 días.

Fuente: Paola Cruz (2011)

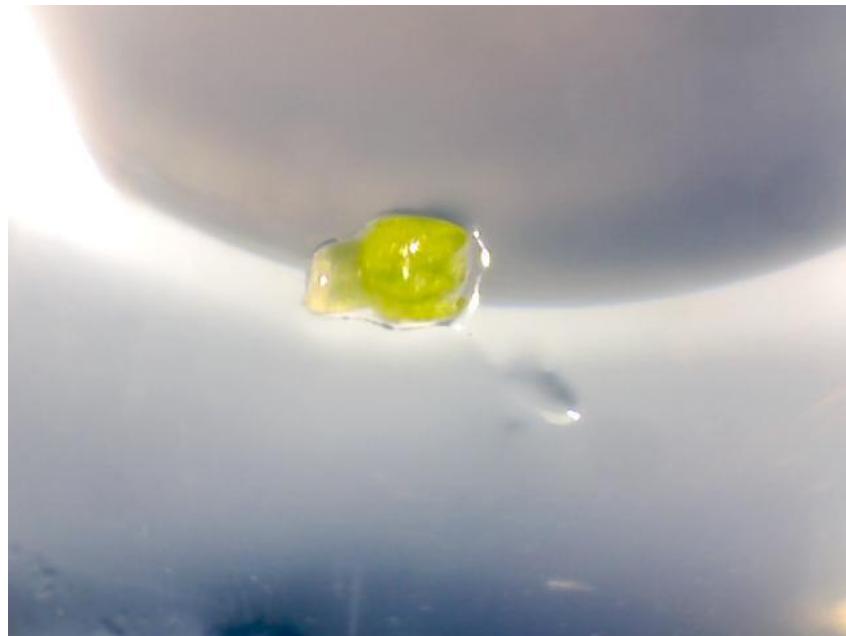




**Fotografía 64.- Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandisa* los 60 días.
Fuente:** Paola Cruz (2011)



**Fotografía 65- Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandisa* los 75 días.
Fuente:** Paola Cruz (2011)



Fotografía 66: División de meristemos para formar protocormos.

Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 67: Segunda etapa de división en los meristemos.

Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 68: Formación de las primeras hojas de los meristemos en *Maxillaria grandis*

Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 69.- Formación de hojas en los meristemos de *Maxillaria grandis*

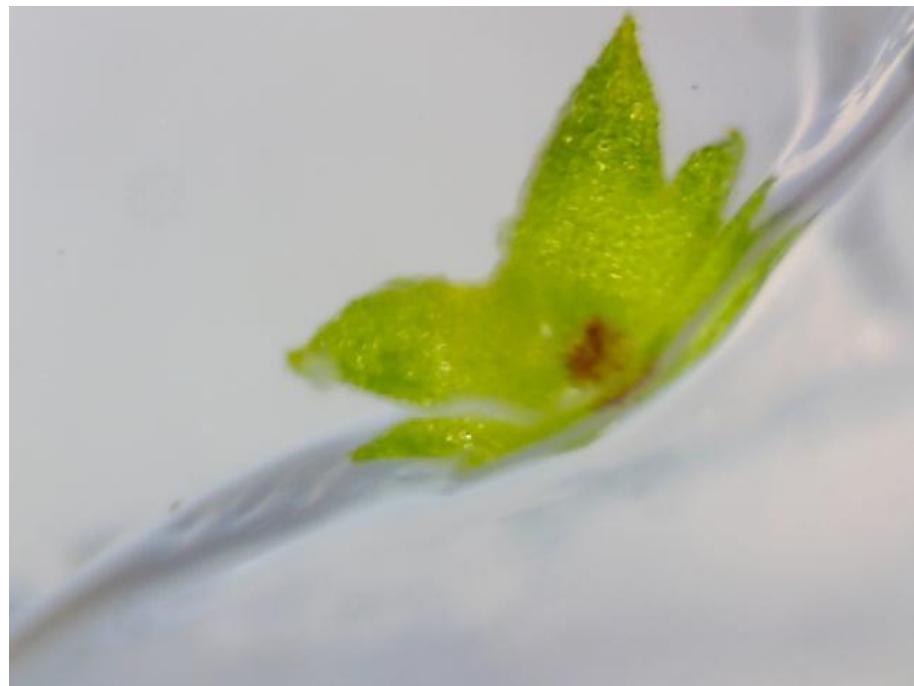
Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 70.- Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandis* los 90 días.



Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 71.-Desarrollo completo de hojas de *Maxillaria grandis*
Fuente: Paola Cruz (2011)



**Fotografía 72.- Desarrollo de los meristemos de *Maxillaria grandis* a los 132 días.
Fuente:**Paola Cruz (2011)





Fotografía 73.- Nivel adecuado del meristemo dentro del medio de cultivo para evitar ahogamientos.

Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 74: Fenolización de los meristemos de *Maxillaria grandis*

Fuente: Paola Cruz (2011)



Fotografía 75.-Coloración de fenolización en otros tratamientos.

Fuente: Paola Cruz (2011)



Anexo 12. Costo de los reactivos por gramo

SALES INORGANICAS	CANTIDAD/GRAMOS	COSTO DE STOCK	COSTO POR GRAMO
Nitrato de amonio	500 gramos	15,55	0,03
Sulfato de amonio	500 gramos	23,65	0,02
Acido bórico	500 gramos	11,15	0,03
Clorhidrato de calcio	500 gramos	22	0,04
Nitrato de calcio 4H ₂ O	500 gramos	17,35	0,02
Clorhidrato de cobalto 6H ₂ O	100 gramos	34,5	0,5
Sulfato cúprico 5H ₂ O	500 gramos	19,45	0,08
Acido, Na, 2H ₂ O (EDTA)	500 gramos	37,85	0,08
Sulfato ferroso 7H ₂ O	100 gramos	4	0,03
Magnesium sulfate Anhydrite	500 gramos	31,05	0,19
Sulfato de magnesio H ₂ O	500 gramos	15	0,04
Molybdicacid	500 gramos	68,05	0,05
Potassiumiodide	500 gramos	61,05	0,29
Nitrato de poatasio	500 gramos	17,85	0,04



MATERIALES	CANTIDAD	UNIDAD	PRECIO	TOTAL
Fosfato de potasio monobásico	500 gramos	24,3	0,11	
Sulfato de zinc 7H2O	500 gramos	19,5	0,02	
Agar	450 gramos	105	0.20	
6 benzylaminopurine	250 gramos	159,9	0,1	
MES (free acid)	250 gramos	100,5	0,09	
myo – inositol	500 gramos	58,75	0,1	
alpha naphthaleneaceticacid	100 gramos	22,45	0,08	
Nicotinicacid (feeacid)	500 gramos	18,2	0,07	
Peptone	500 gramos	42,22	0,16	
Pyridoxine HCL	100 gramos	41,5	0,1	
Sucrose	500 gramos	16,35	0,05	
Thiamine HCL	250 gramos	51,9	1,16	
TOTAL		1082,97	5,236	

(SIGMA C. 1930)

Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas.

Anexo 13.Precios de algunos materiales que se utilizaron en la investigación.

MATERIALES	CANTIDAD	UNIDAD	PRECIO	TOTAL



			UNITARIO (DÓLARES)	
Tubo de ensayos	100	Unidades	0.82	82,00
Alcohol	3	Litro	3,00	9,00
Algodón	1	Funda	2,00	2,00
Marcadores indelebles	2	Unidad	1,00	2,00
Papel aluminio	1	Caja (2.32 m ²)	4.15	4.15
Mandil de laboratorio	1	Unidad	10,00	10,00
Mascarilla	3	Unidad	0.50	1.50
Cubre pelo	3	Unidad	0.50	1.50
TOTAL				112,15



Anexo 14. Croquis de la ubicación del laboratorio de Cultivo de tejido de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca donde se realizó la investigación.

