



“EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*”

RESUMEN

Las orquídeas constituyen una de las especies ornamentales más importantes en el Ecuador por su valor comercial y exotidad en sus flores.

La presente investigación es un aporte y una herramienta útil para la micropropagación in vitro, debido a que se evaluaron cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla de orquídea *Comparettia speciosa Rchb.f.*, la misma que tuvo la finalidad de evaluar el porcentaje de germinación y el comportamiento de protocormos en los diferentes tratamientos determinando así el mejor medio de cultivo con las respectivas dosis de auxina y citoquinina.

Para evaluar los resultados se utilizó el Diseño Experimental Bloques completamente al Azar, se evaluó 50 tratamientos con 3 repeticiones y 3 tubos de ensayo para cada repetición. Los datos obtenidos revelan que el tratamiento Murashige S. con IBA 1ppm BA 1ppm verifico un 6,724% de semilla verde a los 81 días de su evaluación, y a los 96 días posteriores a la siembra se inició la formación de protocormo con un 7,491%.

Para el efecto de medios el mejor tratamiento resultó Murashige S. que generó 5,871% de semilla verde a los 81 días de su evaluación y a los 96 días posteriores a la siembra generó 6,641%.

De acuerdo a la evaluación de costos por tratamiento hubo una diferencia promedio de 1 a 3 centavos entre los medios.

Palabras clave: (Cultivo in vitro, Auxinas, Citoquininas, *Comparettia speciosa*, medios de cultivo)



ÍNDICE

Introducción	9
1. Revisión de literatura.....	17
1.1. DESCRIPCIÓN DE <i>Comparettia speciosa</i>	17
1.1.1. Clasificación taxonómica	17
1.1.2. Etimología	18
1.1.3. Descripción.....	18
1.1.4. Historia y notas.....	20
1.1.5. Polinización	20
1.1.6. Cultivo.....	22
La cascarilla de arroz	23
Cáscara de Coco.....	23
Escorias de carbón.....	24
Piedra pómez	25
1.1.7. Hábitat	26
1.1.8. Distribución.....	27
1.2. PROPAGACION DE ORQUIDEAS.....	27
1.2.1. Medio de cultivo	27
1.2.2. Componentes del Medio	28
a) Fuentes de carbono	29
b) Nutrimentos minerales	30
Macroelementos.....	30
Descripción de las funciones de los macro elementos.....	31
Nitrógeno	32
Fósforo	32
Potasio.....	32
Calcio	33
Magnesio	33
Azufre	33



Microelementos	34
Descripción de las funciones de los microelementos:	35
Hierro	35
Manganeso	35
Cobre	36
Cinc	36
Molibdeno	37
Cobalto	37
Boro	38
Sodio	38
Cloro	38
c) Vitaminas	39
d) Agente gelificante	40
e) Reguladores de crecimiento	41
a) Otros componentes	41
b) pH	42
1.2.3. Introducción a la preparación del medio de cultivo	43
1.2.4. Técnicas de preparación de medios de cultivo	44
1.2.5. Preparación del medio	44
1.2.6. Condiciones ambientales para la incubación	45
Luz	47
Fotoperiodo	49
Irradiancia	50
Composición espectral	52
Temperatura	53
Humedad	54
1.2.7. La semilla de Orquídea	54
1.2.7.1. Tamaño y características	55
1.2.7.2. Tipo de semilla	56



1.2.7.3. Siembra a partir de semillas secas	56
1.2.7.4. La biología de la germinación de semillas de orquídeas	57
Micorriza en orquídeas.....	58
1.2.7.5. Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas.....	59
Hay dos tipos básicos de germinación in vitro.....	60
En la germinación simbiótica	60
La germinación a simbiótica.....	61
1.2.7.6. Letargo de la semilla	62
Causas del letargo de la semilla	63
1.2.7.7. Germinación in vitro de la semilla de orquídea...	64
1.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO	65
1.3.1. Auxinas.....	65
Biosíntesis	65
Acción fundamental.....	66
Efectos característicos	67
Efectos en los tejidos <i>in vitro</i>	68
1.3.1.1. IBA.....	68
1.3.2. Citoquinina	69
Biosíntesis	69
Acción fundamental.....	69
Efectos característicos	70
Efectos en los tejidos <i>in vitro</i>	70
1.3.2.1. BA.....	71
1.4. Efecto de las auxinas y citoquininas en la germinación	72
2. MATERIALES Y METODOS.....	74
2.1. MATERIALES.....	74



2.1.1. Materiales Biológicos	74
2.1.2. Materiales Físicos	74
Equipos.....	74
Herramientas.....	74
Materiales.....	75
2.1.3. Materiales Químicos:	76
2.1.4. Factores en estudio.....	77
Evaluación de cinco medios de cultivo	77
Niveles de Dosificación de reguladores de crecimiento ..	78
• Niveles de dosificación con BA (6-benciladenina)	78
• Niveles de dosificación de IBA (3 ácido indolbutírico) ..	78
• Niveles de dosificación de BA + IBA.....	78
2.2. METODOS	79
2.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRES.....	81
2.2.1.1. Disolución de los medios	81
2.2.1.2. Preparación del medio Casero	81
2.2.1.3. Disolución del IBA	82
2.2.1.4. Disolución del BA	84
2.2.2. Dosificaciones	84
2.2.3. Preparación del medio	85
2.2.4. Siembra	88
2.2.4.1. Limpieza de laboratorio.....	89
2.2.4.2. Lámpara UV	90
2.2.4.3. Esterilización	91
2.2.4.3.1. Esterilización de los instrumentos.....	91
2.2.4.3.2. Esterilización del Sembrador	92
2.2.4.4. Cámara de flujo laminar	92
2.2.4.5. Desinfección de la semilla.....	95
2.2.4.6. Siembra de la semilla en los tubos	98



2.2.4.7. Etiquetado	98
3. RESULTADOS Y DISCUSION	100
3.1. RESULTADOS	100
3.2. Discusión	129
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	134
Conclusiones	135
Recomendaciones	138
RESUMEN	139
Conclusiones	141
BIBLIOGRAFIA	144



UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*”

*Tesis previo a la obtención del
Título de Ingeniera
Agrónoma*

Autora:

Jessibel Carolina Molina Cabrera.

Director:

Ing. Agr. Francisco Merchán B.

CUENCA – ECUADOR
2012

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: “EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*”

INTRODUCCION

La palabra orquídea deriva del griego *ορχίς* (*orchis* = testículo), vocablo que se encontró por primera vez en los manuscritos del filósofo griego Teofrasto que datan aproximadamente del año 375 antes de Cristo. Tal vocablo hace referencia a la forma de los seudobulbos de las especies del género *Orchis*, orquídeas de hábito terrestre cuyos seudobulbos dobles parecen testículos. (Portilla, Diaz, & Salazar)

Las orquídeas desde tiempos inmemoriales, han despertado las más inimaginables pasiones en los hombres. Ya en la antigua Grecia se le atribuían propiedades curativas y afrodisíacas. Existen escritos chinos de 1.500 años de antigüedad donde se hace referencia al cultivo de las orquídeas. (Portilla, Diaz, & Salazar)

Pero su verdadero descubrimiento como flor de gran valor ornamental y al mismo tiempo, el comienzo de su

calvario ocurrió en los albores del siglo XIX, cuando por casualidad llegaron a Europa las primeras plantas de *Cattleya labiata*, una especie brasileña muy parecida a la flor nacional de Venezuela, la *Cattleya mossiae*. (Portilla, Diaz, & Salazar)

Durante muchos años los recolectores profesionales provenientes en su mayoría de Francia e Inglaterra se dedicaron a saquear sin misericordia los bosques americanos para satisfacer el gusto de las damas y la avaricia de los coleccionistas de la época por nuevas y raras especies, a tal punto que muchas de ellas ya se consideran extintas en la naturaleza. (Portilla, Diaz, & Salazar)

El cultivo de las orquídeas por la belleza de sus flores evolucionó lentamente desde un simple pasatiempo hasta la explotación comercial. Las primeras orquídeas ornamentales llegaron a Europa, procedentes del Nuevo Mundo, en 1731. Sin embargo, no fue sino hasta 1821 cuando se inició su

cultivo comercial en invernaderos cerca de Londres. (Portilla, Diaz, & Salazar)

En el siglo XIX se desata una manía por las Orquídeas tropicales en Europa, la demanda de orquídeas era tal que los compradores pagaban desde 500 libras (alrededor de 1000 USD) por una sola planta, se enviaban misiones a los trópicos en busca de orquídeas. (Portilla, Diaz, & Salazar)

Muchos hábitats fueron destruidos para que las plantas colectadas siguieran siendo raras y no bajaran los precios. Se sabía tan poco acerca de los requerimientos de estas extrañas plantas que se intentaron muchas prácticas extremas como ubicarlas en lugares calientes, sin ventilación, y extremadamente húmedos intentando imitar lo que creían que sería un ambiente tropical, con lo que las plantas se morían por miles. (Portilla, Diaz, & Salazar)

Como consecuencia de esto importaban cada vez en cantidades mayores a pedidos de quienes habían quedado



hechizados con las flores de las pocas sobrevivientes. Algunos cultivadores recurrían a los mismos recolectores averiguando las características ambientales del lugar donde habían sido colectadas. (Portilla, Diaz, & Salazar) (Grupo orquideofilo canario, 2004)

Finalmente Joseph Pastón, jardinero de VII Duque de Devonshire, estimulado por John Lindley y basado en esta información mejora las condiciones de ventilación, riego y humedad. En 1830, fue el primero en utilizar invernaderos separados para especies de climas diferentes. (Portilla, Diaz, & Salazar)

En 1885 el botánico A.B. Frank, descubrió que las semillas de las orquídeas germinaban en la naturaleza gracias a su infección por hongos, y que tanto hongos como semillas dependían los unos de los otros para poder sobrevivir y crecer. La semilla de la orquídea, que carece de cualquier reserva de nutrientes, se alimenta del hongo en el momento de la germinación y este a su vez se infiltra en la



semilla con sus filamentos (hifas) alimentando la semilla germinada. (Grupo orquideofilo canario, 2004)

En 1905 Noel Bernhard, un micólogo francés, consiguió aislar y cultivar varios géneros de micorriza e inocular con ellos semillas de orquídeas en cultivos estériles. Publicó sus descubrimientos en "Action des microorganismes sur la germination des orchidees" (La acción de los Microorganismos sobre la Germinación de las Orquídeas). También sospechó que debería ser posible un cultivo estéril sin la presencia de hongos micorrizales, pero nunca llegó a demostrarlo. (Grupo orquideofilo canario, 2004)

El siguiente gran paso en la historia de la propagación fue dado por el americano Lewis Knudson, un fisiólogo de plantas que empezó a interesarse por las teorías de Bernhard y Burgeff y en 1922 Knudson elaboró un medio de cultivo a base de sales minerales esenciales para la germinación, azúcares en forma de glucosa y levulosa (que componen la mayor parte de la solución) y agar, una gelatina

extraída de algas marinas. (Grupo orquideofilo canario, 2004)

Esta composición de nutrientes podría reemplazar la presencia del hongo al proveer de carbohidratos a la planta imitando los efectos del hongo sobre las semillas. (Grupo orquideofilo canario, 2004)

La sencillez del método de germinación asimbiótico revolucionó el comercio de las orquídeas, creando desde entonces un incesante flujo de híbridos genéricos, intergenéricos y multigenéricos a veces de dudosos aspectos y calidades. (Grupo orquideofilo canario, 2004)

En el planeta Tierra, las orquídeas conforman la familia más extensa del reino vegetal de las 280.000 plantas vasculares conocidas, 28.000 son especies de orquídeas; esto sin contar que el hombre las ha hibridizado por 150 años y ha registrado más de 150.000 nuevos cruces. Solamente existen dos ambientes en la tierra donde no



prosperan estas plantas, los polos y los desiertos de arena. Son más diversas en las regiones tropicales, donde frecuentemente son epífitas. (Bhojwani & Razdan, 1996)

De cada 10 especies de plantas en el mundo una es orquídea y de cada 4 plantas en Ecuador una es orquídea. El Ecuador es el país más biodiverso del planeta tomando en cuenta su reducida superficie geográfica que alberga 18.000 especies de plantas. En el Ecuador se han identificado, a la fecha, 4 187 especies (y se estima que sobrepasarán las 5 000), lo que representa cerca del 60% de las especies identificadas en América del Sur y 40% de las especies del continente americano. (Parque Mindo, 2009)

La biología reproductiva de las orquídeas es compleja. Sus flores desarrollan mecanismos de atracción a los polinizadores que les permite producir semillas y perpetuar su especie (Anderson et al., 2005; Huber et al., 2005). La propagación natural de las orquídeas se dificulta porque sus semillas son diminutas y carecen de endosperma. Por esta



razón, requieren de una relación obligada con hongos micorrízicos que permita la germinación de las semillas (Arditti, 1984). Entender esta simbiosis micorrízica es de gran importancia ya que existe una especificidad micorrízica para la germinación de semillas de orquídeas. La disponibilidad de hongos simbiontes para la distribución y diversidad de las orquídeas también es de gran importancia. (Lopez, 2008)

Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro* (Arditti y Ernst, 1993; Serna, 1999; Mckendrick, 2000; Cavalcante et al., 2001; Damon et al., 2004; Pedroza et al., 2005; Yamazaki y Kasumitzu, 2006; Pedroza y Mican, 2006; Haddix et al., 2006; Steele, 2007). Sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes y condiciones ambientales tales como humedad, luz y temperatura para germinar, por lo que hay que investigar cual es el medio de germinación

adecuado para cada una de ellas. Entonces la presente investigación plantea investigar cual es el medio más adecuado para que las semillas de *Comparettia speciosa* germinen de una forma adecuada. (Lopez, 2008)

1. REVISION DE LITERATURA

1.1. DESCRIPCIÓN DE *Comparettia speciosa*

1.1.1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Cymbidieae

Figura N° 1.

Comparettia speciosa Rchb.f.

Subtribu: Oncidiinae (Interceme Technologies)

Género: Comparettia

Especie: *speciosa*

Nombre común: Comparettia Hermosa (Watson, 1992)



Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa* Rchb.f."

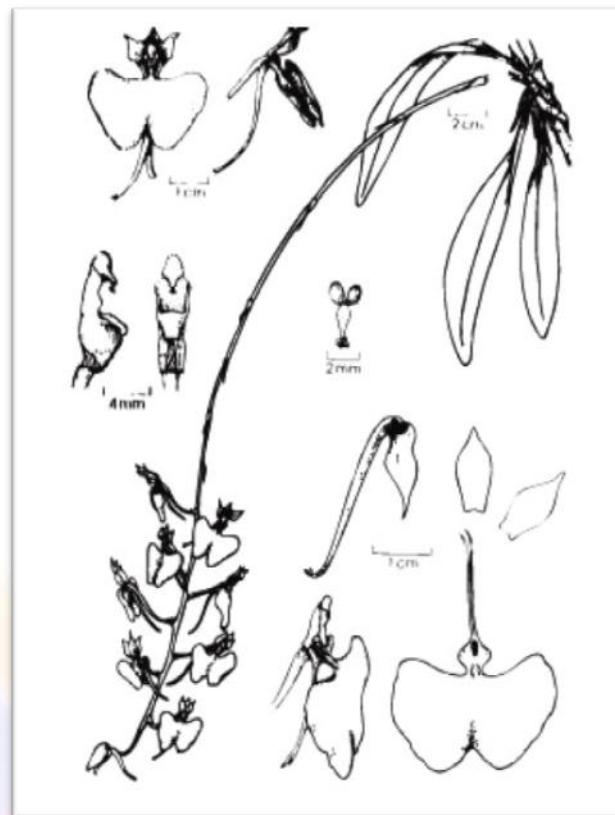
2012

1.1.2. Etimología

Bautizado en honor de Andreo Comparetti, profesor de botánica en Padua, Italia. (Zelenko & Bermudez, Orchids species of Perú, 2009) (Zelenko & Chase, Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium., 2002)

1.1.3. Descripción

Se caracteriza por la presencia de seudobulbos, pequeños, teretes, unifoliados, de un solo entrenudo, sin vainas foliáceas en la base; la inflorescencia nace de la base del seudobulbo; los sépalos con una vaina-espolón, angosta y alargada en la base; el labelo con espolón doble, insertado en la vaina espolón sepalina; dos polinios duros, unidos a un estípite, a su vez adherido a un viscidio. (Zelenko & Bermudez, Orchids species of Perú, 2009) (Zelenko & Chase, Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium., 2002)



**Figura N° 2. Icono de la Orquídea *Comparettia speciosa*
Rchb.f.**

Fuente: (Dodson, 2004)

1.1.4. Historia y notas

El género lo propusieron Poepping y Endlicher en 1836 para *C. falcata*, una especie vistosa. Luego se agregaron al género varias otras especies, de la región andina, siendo la



más llamativa *C. speciosa* Reichb. f., con grandes flores anaranjadas, proveniente del oriente del Ecuador. (Zelenko & Bermudez, Orchids species of Perú, 2009) (Zelenko & Chase, Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium., 2002) (Dodson, 2004)

1.1.5. Polinización

Por colibríes o mariposas. (Zelenko & Bermudez, Orchids species of Perú, 2009) (Zelenko & Chase, Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium., 2002) (Dodson, 2004)

Estudios científicos relacionados a la diversidad de las orquídeas, concluyen en que esa diversidad se debe al proceso de polinización. O sea, el proceso de transferir polen, de la antera de una flor al estigma de otra, que obviamente resulta ser bastante elaborado.

A los polinizadores les atrae el color, la forma, y las fragancias de la flor; ya que muchos dedican su tiempo profesional a los néctares, aceites esenciales y la combinación de ambos. Sabemos que las moscas, los



cacúlos, las abejas, los avispones, las hormigas, las mariposas, los colibríes y las mariposas nocturnas, son polinizadores de las orquídeas. (Ramirez, 2001)

Después que ocurre la polinización, el polen germina y se forma un tubo polínico que crece hacia abajo por el interior de la columna del pistilo hacia el ovario. Esto estimula el desarrollo de los óvulos, que estarán receptivos, para el momento en el que el tubo polínico llegue a su proximidad. (Ramirez, 2001)

Ocurre la fecundación y se inicia el desarrollo del embrión, que tendrá como resultado el desarrollo de la semilla. Semillas microscópicas, que luego son trabajadas en laboratorios de diversas partes del mundo. (Ramirez, 2001)

1.1.6. Cultivo

En condiciones medias, sobre placas de helecho arborescente. (Zelenko & Bermudez, Orchids species of



Perú, 2009) (Zelenko & Chase, Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium., 2002) (Dodson, 2004)

Otros tipos de sustratos para el cultivo como:

La cascarilla de arroz

Este material es un subproducto de la industria molinera, que se produce ampliamente en las zonas arroceras y que ofrece buenas propiedades para ser usado como sustrato. (American Orchids Society, 2003)

Cáscara de Coco

A pesar de ser un material orgánico, su descomposición es muy lenta debido a su elevado contenido de lignina (45 %). Es un material duro de descomponer, sin embargo en el Ecuador en los cultivos donde se ha utilizado se han proyectado para una vida útil de 4 a 6 años. (American Orchids Society, 2003)

La cascara de coco contiene dos clases de material. Uno de aspecto parecido al corcho, pero de poro abierto, de

gran capacidad de absorción de agua y de gran capilaridad.
(American Orchids Society, 2003)

La cáscara de coco dado su origen en regiones costeras suele ser un material rico en sales, especialmente Sodio y Cloruros. Estos deben ser evacuados previamente a su utilización como sustrato, lo cual es una práctica relativamente fácil ya que estas sales no se encuentran fuertemente retenidas por el sustrato. (American Orchids Society, 2003)

Escorias de carbón

Las escorias son residuos de la quema de carbón mineral provenientes de hornos y calderas, muy utilizados por floricultores y viveristas para el enraizamiento. Es un buen sustrato, mientras se cuide su granulometría, pues cuando es muy fina, produce encharcamientos y cuando es gruesa tiene los mismos problemas de las gravas de muy

baja retención de humedad. (American Orchids Society, 2003)

Como sustrato tiende a degradarse físicamente hasta convertirse en polvo aunque en general es de muy buena estabilidad física. Puede presentar problemas químicos como fijación de fósforo y excesos de boro. El lavado, el suministro de estos elementos y la corrección de la acidez o alcalinidad (pH) son prácticas obligadas cuando se utilizan estos sustratos. En este sentido es bueno hacer ensayos antes de proceder en escalas mayores. Es un sustrato con muy buena retención y distribución de humedad, de peso medio y de suministro irregular en algunos sitios. (American Orchids Society, 2003)

Piedra pómez

La piedra pómez es un material de origen volcánico, muy parecido a la escoria de carbón mineral, la cual se encuentra disponible en diversas zonas volcánicas. Posee



muy buena retención de humedad y muy buenas condiciones físicas de estabilidad y durabilidad.

A veces puede presentar problemas químicos por excesos de azufre y boro, pero estos pueden ser eliminados mediante un cuidadoso lavado con agua caliente. No trae ninguna clase de enfermedades y desde el punto de vista biológico es completamente estéril, siempre que se extraiga de vetas profundas y no contenga mezcla de tierra. En la actualidad este sustrato ha dado muy buen resultado en el cultivo de orquídeas en macetas especialmente el *Cimbydium*. (American Orchids Society, 2003)

1.1.7. Hábitat

Plantas epífitas que se encuentran a menudo en árboles de guayaba, en alturas de 800 a 1500 m.s.n.m. (Zelenko & Bermudez, Orchids species of Perú, 2009) (Zelenko & Chase, Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium., 2002) (Dodson, 2004)



Figura N° 3. Orquídea *Compsettia speciosa Rchb.f.*

1.1.8. Distribución

Género de once especies, la mayoría nativas de los Andes, y una de amplia distribución en la América tropical. Para el Ecuador se citan dos especies y un híbrido natural. (Zelenko & Bermudez, Orchids species of Perú, 2009) (Zelenko & Chase, Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium., 2002)(Dodson, 2004)

1.2. PROPAGACION DE ORQUIDEAS



1.2.1. Medio de cultivo

Un medio para el cultivo in vitro de orquídeas, está compuesto básicamente por: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas y en algunos casos reguladores de crecimiento. Además hace falta un elemento que de consistencia al medio que suele ser agar o gelatina simple. En los laboratorios convencionales existen medios de cultivos ya preparados previamente por industrias encargadas de la rama. (Mendieta, 2002)

Una vez definido el objeto perseguido con el cultivo in vitro, es necesario elegir un Medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no solo sus componentes si no también su preparación. (Mendieta, 2002)

1.2.2. Componentes del Medio

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran.

- c) Carbono
- d) Nutrimentos minerales
- e) Vitaminas
- f) Agente gelificante en caso de los Medios semi sólidos
- g) Sustancias reguladoras del crecimiento
- h) Otros componentes. (Roca & Mroginski, 1991)

a) Fuentes de carbono

Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al Medio una fuente de carbono, la sacarosa en concentraciones de 2% a 5% que actúa como una fuente de energía para las semillas hasta que ellas produzcan clorofila y sean independientes; el azúcar es el que más se utiliza, y en algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa.



También myo-inositol (100 mg / litro) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos. (Roca & Mroginski, 1991)

b) Nutrimentos minerales

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micro nutrimentos) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. (Roca & Mroginski, 1991)

En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato.

También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado conjuntamente con un agente quelante (Na2EDTA), lo que lo hace disponible en un amplio rango de pH. (Mroginski, Rubinstein, & Echenique, 2004)



Macroelementos

El prefijo macro aplica a elementos (o nutrientes) refiriéndose al hecho que estas sustancias se necesitan relativamente en grandes cantidades. Ellos incluyen calcio (Ca), magnesio (Mg), nitrógeno (N, suplementado como nitrato de amonio o raramente urea), fosforo (P, mayormente como PO₄), potasio (K) y azufre (S, usualmente como SO₄). (Arditti & Ernst, 1993)

Dependiendo del medio ciertas sales pueden ser usadas para suplementar cada mineral (potasio puede ser proveído como KNO₃ KH₂PO₄, K₂HPO₄, o KCl, así como otros; nitrógeno puede ser agregado como KNO₃, NH₄NO₃, Ca (NO₃)₂, (NH₄)₂ SO₄, otras sales, o urea). Las combinaciones de sales son designadas para proveer un apropiado balance de nutrientes en adecuadas concentraciones. (Arditti & Ernst, 1993)

Descripción de las funciones de los macro elementos:

31

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012



Según Navarro, a continuación se describe la función de los siguientes macro elementos:

Nitrógeno: componente esencial para todos los seres vivos, además es un compuesto específico de las proteínas, está presente en la mayor parte de las combinaciones orgánicas, es necesario para la síntesis de tejidos, el nitrógeno se encuentra en moléculas tan importantes como las purinas, pirimidinas, porfirinas, vitaminas, alcaloides y enzimas. (Navarro, 2000)

Fósforo: forma parte de los elementos plásticos de la planta, es constituyente esencial de numerosas coenzimas, forma parte en la biogénesis de glúcidos, el proceso de la fotosíntesis, en la biosíntesis de lípidos, la síntesis de la clorofila y en la glucólisis. (Navarro, 2000)

Potasio: El papel del potasio en la planta es variado, pero aún no se conoce bien ciertos aspectos del mismo. La acción del potasio en la fotosíntesis ha sido



fundamentalmente puesta en manifiesto en las algas, aumenta la actividad fotosintética asegurando una mejor utilización de la energía luminosa, actúa como regulador de la presión osmótica celular, hace disminuir la transpiración y contribuye a mantener la turgencia celular. (Navarro, 2000)

Calcio: Una de las principales funciones del calcio en la planta es la de actuar, formando parte de la estructura de la protopectina, como agente cementante para mantener las células unidas. También es muy importante para el desarrollo de las raíces en las cuales ejerce una triple función: multiplicación celular, crecimiento celular y neutralización de los hidrogeniones. (Navarro, 2000)

Magnesio: Desempeña funciones importantísimas y esenciales en la planta. Sin este elemento no sería posible la vida sobre la Tierra, ya que entra en la composición de los pigmentos verdes, utilización de la energía solar y la síntesis de los constituyentes orgánicos. (Navarro, 2000)



Azufre: La mayor parte de SO₄ absorbido se reduce en la planta a compuestos sulfídricos (-SH), y así, en este estado, se integra a los compuestos orgánicos. Solo una pequeña parte se incorpora sin ningún cambio redox, y como tal ion inorgánico contribuye a la regulación osmótica celular. (Navarro, 2000)

Microelementos

En el medio puede variar ampliamente en el uso y contenido de microelementos o nutrientes (los términos no están basados en su importancia pero si en las pequeñas cantidades que se necesitan). Las razones para esta variación son (1) la utilización de fórmulas existentes, (2) imprecisa información acerca de los requerimientos de las orquídeas, y (3) la presencia de muchos de estos elementos como impurezas en otros componentes del medio. Sus concentraciones e incluso su presencia o ausencia no parece ser crítico. Es simple hacer substituciones, y/o alterar las concentraciones de micro elementos que la de macroelementos porque las concentraciones del primero son

bajas, y diferencias en la insignificante parte de la molécula (usualmente sulfato o cloruro) no son importantes. (Arditti & Ernst, 1993)

Es muy importante mantener presente que muchos microelementos pueden ser tóxicos a altos niveles; por ejemplo, la diferencia entre 1 mg y 10 mg puede parecer pequeño (9 mg), pero el incremento es 10 veces el doble y esto puede resultar en toxicidad. Como los macroelementos, los microelementos son estables al calor y pueden ser ingresados a la autoclave sin ningún problema. (Arditti & Ernst, 1993)

Descripción de las funciones de los microelementos:

Según Navarro, a continuación se describe la función de los siguientes microelementos:

Hierro: El elemento es requerido por las enzimas mitocondriales; y es en las hojas, concretamente en los



cloroplastos, en donde se encuentra la mayor parte del hierro. Numerosos hechos experimentales demuestran de modo convincente la influencia que el hierro ejerce en la síntesis clorofílica. (Navarro, 2000)

Manganese: Aunque muchas de las funciones del manganeso son aún desconocidas, si se sabe que interviene en numerosos procesos metabólicos que realizan las plantas. Tiene influencia en el proceso fotosintético, así como es activador de procesos de transformación de las hexosas fosforiladas, glucolisis y metabolismo de los ácidos orgánicos. (Navarro, 2000)

Cobre: Es requerido por las plantas en muy pequeña cantidad. Su contenido medio oscila generalmente entre 2 a 30 ppm en peso seco. Las funciones del cobre en la planta están asociadas con un buen número de enzimas, ya sea como activador o formando parte de ellos como grupo prostético. Al igual que el hierro, su capacidad de experimentar reducción reversible, le permite intervenir en



una gran variedad de procesos redox. Esta característica del cobre representa, posiblemente, su función más importante, pero no es la única. Se debe indicar, finalmente, que el cobre es un micronutriente esencial en el balance de bioelementos que en la planta regulan un proceso tan trascendental como es la transpiración. (Navarro, 2000)

Cinc: Las funciones que el cinc realiza en la planta son variadas, pero no todas suficientemente conocidas. En su gran mayoría son consecuencia de su participación en la formación y funcionamiento de diversos sistemas enzimáticos que intervienen en procesos vitales para la planta. (Navarro, 2000)

Molibdeno: El principal papel fisiológico del molibdeno se fundamenta en el hecho de que es componente de dos enzimas que catalizan procesos importantes en la planta: nitrogenada y nitrato reductasa. (Navarro, 2000)



Cobalto: La importancia que actualmente se concede al cobalto deriva, en parte, del hecho de ser un componente de la vitamina B12, la cual, a su vez, es necesaria para la formación de hemoglobina que se requiere para que la fijación se efectúe. (Navarro, 2000)

Boro: Se atribuye al boro un importante papel en la circulación de los azúcares en el interior de la planta. La influencia del boro en la formación de las paredes celulares es un aspecto altamente importante. El boro está implicado en el metabolismo del fosforo en la planta por su capacidad complejante en forma de boratos con los ésteres glucídicos. La síntesis de vitaminas del complejo B está influenciado igualmente por el contenido de boro. La síntesis de tiamina y niacina se favorece cuando aumenta el boro. (Navarro, 2000)

Sodio: La función específica que el sodio puede desempeñar en la planta no se conoce. Algunos investigadores han señalado recientemente su posible acción como activador de la enzima carboxilasa

fosfoenolpirúvica, primer enzima de carboxilación en la fotosíntesis de plantas. (Navarro, 2000)

Cloro: Presenta una gran movilidad, y una vez absorbido emigra fácilmente hacia las partes en actividad fisiológica. La función del cloro, en el momento actual, no es perfectamente conocida. Diversas investigaciones señalan que en cloroplastos aislados, el Cl^- es un cofactor esencial en la fotosíntesis, situado su lugar de actuación junto al Mn^{+2} en la fotolisis del agua, a partir de la cual el fotosistema II se reduce por captura de los electrones liberados. (Navarro, 2000)

c) Vitaminas

Niacina (ácido nicotínico), Piridoxina (vitamina B6) y Tiamina (vitamina B1) son comúnmente usados como parte del medio de cultivo.

Biotina, ácido fólico y ácido pantoténico (como pantotenato de calcio) son también usados en algunos



medios. No está claro si todos o algunos de ellos son requeridos, pero las formulaciones de los medios no deben ser cambiados sin antes realizar una prueba preliminar. Las vitaminas no son resistentes al calor y no deben ser esterilizados en la autoclave. Igualmente, los medios que contienen vitaminas son generalmente esterilizados al calor. (Navarro, 2000)

d) Agente gelificante

Debergh, 1982 decía en los Medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y concentraciones del agar pueden alterar las respuestas in vitro de los cultivos. (Roca & Mroginski, 1991)

El agar-agar es una gelatina vegetal de origen marino que se obtiene a partir de diversas especies de algas rojas (división Rhodophyceae) de los siguientes géneros:



Geltdium, Gracilaria, Pterocleda, Ceramium, Glgartína.
(SIGMA, 1990)

e) Reguladores de crecimiento

En la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o citoquininas.

Las auxinas que más se utilizan son: ácido 2,4 – Dicloro-fenoxiacético, ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (IBA); las citoquininas que más se emplean son: Kinetina (KIN), Benciladenina (BA) y Zeatina (ZEA). (Roca & Mroginski, 1991)

i) Otros componentes

Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como



fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Entre ellos esta agua de coco, AC, (5% a 15%, v/v) el jugo de frutos de tomate, el extracto de la levadura, y el extracto e tubérculos de papa. El carbón activado (0.1% a 5%), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente para absorber metabólicos tóxicos. (Roca & Mroginski, 1991)

j) pH.

Es importante, porque afecta la disponibilidad de los nutrientes para las plantas en crecimiento o semillas.

Para medir el pH de un medio apropiadamente, lo mejor es usar un pH metro. Si no tiene disponible uno utilice papel indicador de pH. El pH de un medio debe estar alrededor del valor deseado, si es muy alcalino debe ser ajustado con unas cuantas gotas de ácido (ácido clorhídrico, ácido nítrico, o ácido sulfúrico). Cuando el pH es bajo del requerido, el medio es muy acido debe ser ajustado con una base (alcalino) tales como el

hidróxido de amonio, hidróxido de potasio o hidróxido de sodio. Ácidos o bases concentradas cambian el pH rápidamente y debe ser agregado lentamente y con mucho cuidado. (Arditti & Ernst, 1993)



Figura N° 4. pH meter utilizado para medir el pH de los medios.

1.2.3. Introducción a la preparación del medio de cultivo

El medio puede ser preparado ya sea utilizando ingredientes básicos o comprarlo en polvo a sus proveedores. Hay diferentes tipos de medios disponibles



para la venta así como otros específicos para ciertas especies diseñados por expertos profesionales. Cuando se inicia el proceso de germinación de una nueva especie es aconsejable probar con diferentes medios a una concentración total y parcial para determinar cuál es el mejor medio para dicha especie. El nivel de pH es también importante. (McKendrick, 2000)

1.2.4. Técnicas de preparación de medios de cultivo

Es necesario preparar el medio utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada o agua desmineralizada-destilada (H_2O , DD). Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la estimulación de contaminantes, todas las sustancias químicas usadas para su preparación deben ser de un alto grado de pureza. El procedimiento para la preparación de los medios dependerá, en primera instancia, del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. (Roca & Mroginski, 1991)

1.2.5. Preparación del medio

Para su preparación se sugieren las siguientes operaciones:

- Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (tanto los del MB como los reguladores de crecimiento u otros compuestos). Ajuste del pH.
- Adición y disolución del agar.
- Esterilización en la autoclave.
- Incorporación (Operando en la cámara de transferencia) de la(s) sustancia(s) termolábil(es), previamente esterilizada(s) se deben mantener a una temperatura entre 40 y 50°C.
- Distribución (operando en la cámara de transferencia) del medio en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, caja petri, frascos de vidrio, etc.) previamente esterilizados en el autoclave. (Roca & Mroginski, 1991)



Figura N° 5. Balanza analítica y agar utilizado para los medios.

1.2.6. Condiciones ambientales para la incubación

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en los que se refiere a la luz y temperatura; estos dos factores están relativamente poco estudiados, y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria.

Las respuestas morfogenéticas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Martín, 1980; Hughes, 1981), así como por la calidad, intensidad y duración de la



luz (Seibert et al., 1980; Hughes, 1981). (Roca & Mroginski, 1991)

Luz

Los cultivos in vitro se incuban bajo condiciones controladas de luz, temperatura, humedad. Lo normal es agrupar en una misma cámara todos los cultivos que muestren unos requerimientos similares en cuanto a luz y temperatura.

Un microambiente controlado puede promover un adecuado crecimiento y desarrollo de los cultivos. (Perez, 2006)

La luz puede afectar al crecimiento y desarrollo de las plantas de tres maneras:

- Como fuente de energía para la fotosíntesis.
- Como fuente de calor.

- Como fuente de información para el desarrollo de las plantas y que conduce a los procesos de fotomorfogénesis. (Perez, 2006)

Las lámparas fluorescentes blancas son muy utilizadas para suministrar la iluminación necesaria para los cultivos. El espectro luminoso de los tubos fluorescentes cubre normalmente los requerimientos de los cultivos. (Perez, 2006)

La instalación de los tubos fluorescentes puede realizarse de diferentes maneras. Puede colocarse debajo de cada estante para que los cultivos reciban la luz desde la parte superior. Otra alternativa es la iluminación lateral de los recipientes por colocar los tubos fluorescentes entre ellos. El primer método puede promover una iluminación más uniforme. De todos modos, la luz que reciben los cultivos dependerá, no solo del tipo de fuente luminosa utilizado, sino también del tipo de recipiente y de su tapa. (Perez, 2006)

Además, a medida que los cultivos van creciendo, las partes superiores recibirán más luz que las partes inferiores. La iluminación lateral puede tener sus ventajas pudiendo los cultivos recibir una mayor cantidad de luz.

El control de la luz en las cámaras de cultivo in vitro debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Fotoperiodo
- Irradiancia
- Composiciónpectral (Perez, 2006)

Fotoperiodo

Aunque en algunos casos es necesario mantener los cultivos en completa oscuridad, como es el caso de algunas semillas de orquídeas, lo normal es que estén sometidos a un fotoperiodo o en condiciones de luz continua. La luz continua se utiliza por ejemplo, para la producción de sustancias cuya biosíntesis requiera la presencia de luz. (Perez, 2006)



Muchos tipos de cultivos in vitro son sometidos a un fotoperiodo. Ejemplos de fotoperiodos son: 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad o 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad. Este último fotoperiodo es utilizado en muchos protocolos de micropropagación. (Perez, 2006)

Irradiancia

La irradiancia es una medida de la intensidad de luz y es otro factor de gran importancia en cultivo in vitro. Es definida como la cantidad de luz (flujo de fotones) que incide sobre una superficie por unidad de tiempo.

En términos generales, la intensidad de luz adecuada para un cultivo in vitro es 4 a 5 veces menor que en condiciones de campo. (Perez, 2006)

Para propósitos generales se sugiere utilizar en establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (tipo luz de día) y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de foto



periodo/es corto periodo de 16/8 horas. (Roca & Mroginski, 1991)

TABLA N° 1. Iluminación en pies candela desde 2 lámparas fluorescentes sobre una superficie que reflejante blanca (Downs, 1966) y 2 lámparas Gro-Lux (Mpelkas, 1965) medidas a diferentes distancias. (Arditti & Ernst, 1993)

Distancia de las lámparas, cm	INTENSIDAD			
	Lámparas blancas frías			Gro-lux lam, uW cm ² e
	Dos lamps ^{bc}	Cuatro lamp ^{bc}	Cuatro lamp ^{bd}	
2,5	1100	1600	1800	
5	860	1400	1600	
7,6	680	1300	1400	
10,2	570	1100	1300	
12,7	500	940	1150	
15,2	420	820	1000	
17,8	360	720	900	
20,3	330	660	830	
22,9	300	600	780	
25,4	280	560	720	
27,9	260	510	660	
30,5	240	480	600	775

45,7	130	320	420	
61	100	190	260	328
91,4	159			
121,92				

Lux (lx, 1 cd sr m⁻² ó 0,0929 pies candela).

^b Distancia de centro a centro entre las lámparas = 5 cm

^c Lámparas usadas aproximadamente 200 horas antes de realizar la toma de medidas.

^d Lámparas nuevas

^e Dos lámparas de 40 watts Gro-Lux de 40 watt de rápido encendido, separadas a 8,9 cm entre ellas con un reflector de 29,21 cm.

Composición espectral

Las cámaras de cultivo utilizan normalmente tubos fluorescentes con una proporción alta de luz rojo-naranja.

Aparte del efecto de la irradiancia y el fotoperiodo, la dirección de la fuente luminosa y su composición espectral, pueden producir efectos importantes en el desarrollo de los cultivos in vitro. Estos efectos son posibles, por la existencia



de fotoreceptores que son moléculas que modifican su estructura en función de la luz que incide sobre ellas, desencadenando entonces una serie de procesos que permiten a la planta modular su crecimiento y desarrollo. (Perez, 2006)

Temperatura

En la mayoría de las cámaras de cultivo la temperatura se mantiene entre 24-25°C que es adecuada para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de cultivos in vitro.

Puede ser necesario un termo período, con temperaturas diferentes para los periodos de luz y oscuridad o fases del cultivo con temperaturas por encima o por debajo del óptimo. (Perez, 2006)

La temperatura en el interior de un recipiente de cultivo in vitro es aproximadamente 1°C mayor que en el exterior bajo condiciones de cultivo convencionales. (Perez, 2006)

Humedad

Las cámaras de cultivo suelen mantenerse a una humedad relativamente baja (50-60%).

La humedad en el interior de los recipientes de cultivo es generalmente alta, lo que puede conducir, en ciertos casos, a un desarrollo anormal de las hojas, la aparición de hiperhidridicidad en los tejidos y la supresión de la transpiración. La alta humedad en el interior de los recipientes es la causa de la disminución en la transpiración de los cultivos.

Una excesiva humedad ambiental puede aumentar de forma peligrosa los niveles de contaminación de la cámara de cultivo. (Perez, 2006).

1.2.7. La semilla de Orquídea



1.2.7.1. Tamaño y características

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas 1,0-2,0 mm de largo y 0,5-1,0 mm de ancho. Se producen en elevadas cantidades por capsula: 1300-4000000 semillas. Las semillas constan de una testa gruesa (cubierta seminal), que encierra un embrión de alrededor de 100 células. La cubierta tiene un aspecto exterior característico, en forma de red, que es diferente para cada especie. La testa está formada por un tejido muerto, compuesto hasta en un 96% de aire; de forma que cada semilla de orquídea puede ser considerada como un auténtico globo. El embrión tiene una forma redondeada o esférica. La mayor parte de las semillas de orquídea están escasamente diferenciadas: no se distinguen cotiledones ni raíces y no tiene endospermo. En el extremo distal del embrión existe un punto de crecimiento potencial no identificable en el estado de semilla. Las células del embrión presentan una estructura simple, son isodiamétricas y escasamente diferenciadas. (Pierik, 1990)



1.2.7.2. Tipo de semilla

La semilla de orquídea es una semilla del tipo ortodoxa. Una semilla ortodoxa es aquella semilla que son tolerantes a la desecación cuando son capaces de mantener su viabilidad tras ser desecadas a menos de 5-10 % de contenido en humedad. Pueden ser almacenadas a bajas temperaturas y humedad sin perder su poder germinativo. (Iriondo, 2001)

1.2.7.3. Siembra a partir de semillas secas

Una vez que la cápsula es abierta, las semillas dejan de ser estériles y requieren de un proceso de esterilización.

Comúnmente, se utiliza una solución de hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio o peróxido de hidrógeno. Las semillas se agitan dentro de la solución que además contiene una gota de detergente para “humedecerlas”, luego se las enjuaga con agua estéril y se las siembra en el medio preparado.

La ventaja de este método es que las semillas pueden ser colectadas, secadas al aire, almacenadas por varios meses en el refrigerador y utilizadas cuando sea necesario. (McKendrick, 2000)

1.2.7.4. La biología de la germinación de semillas de orquídeas

Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas de polvo porque son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento.

Usualmente estas semillas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento. (McKendrick, 2000)

Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su



crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas, los protocormos de las orquídeas epifitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento. (McKendrick, 2000)

Micorriza en orquídeas

Bernard (1909) descubrió de forma accidental que los hongos juegan un papel importante en la germinación de las semillas de orquídea. De hecho las orquídeas viven en una relación simbiótica con algunos hongos desde el momento de la germinación. Se llama simbiosis a la asociación de dos organismos con ventajas mutuas. Las asociaciones simbióticas entre hongos y raíces reciben el nombre de micorrizas; lo que literalmente significa hongo-raíz. Quedó establecido, alrededor de 1900 que las hifas (filamentos fúngicos) penetran en los protocormos y las raíces de las plantas y son “digeridas”, suministrando a las orquídeas nutrientes y otros materiales.



Se sabe que hay dos tipos diferentes de células huésped en las orquídeas; células huésped subepidérmicas, en las que el hongo permanece “intacto” y sano, y células huésped más profundas, en las que el hongo es “digerido”, para convertirse en una masa amorfa (Hadley, 1975; Harley, 1969). Los hongos más importantes que tienen relaciones simbióticas con las orquídeas, pertenecen al género *Rizoctonia*. (Pierik, 1990)

Otros hongos que participan en la simbiosis son basidiomicetos, algunos patógenos como *Armillaria*, *Fomes*, *Marasmius* (Gianinazzi-P & Gianinazzi, 1983; Sylvia, 2000). (Garcia & Estrelles, 2002)

1.2.7.5. Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas

Mediante la germinación in vitro, se reproducen semillas en tubos o frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar, nutrientes, azúcares y minerales necesarios

para que las semillas germinen y crezcan. (McKendrick, 2000)

Hay dos tipos básicos de germinación in vitro: simbiótica y no simbiótica.

En la germinación simbiótica: las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo micorriza apropiada

- El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que éste produzca hojas y se vuelva autotrófico. (McKendrick, 2000)
- Esta técnica es ampliamente usada para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas. (McKendrick, 2000)
- Tiene la ventaja de usar un medio simple (uno de los más comúnmente usados consiste en avena en polvo con una pequeña cantidad de extracto de levadura), y

como resultado las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas a simbióticamente. (McKendrick, 2000)

- Sin embargo, la desventaja es que se necesita seleccionar el tipo de hongo micorriza adecuada para que se origine la simbiosis y prevenir parasitismo y la consecuente muerte de las semillas. (McKendrick, 2000)

La germinación a simbiótica: es usualmente usada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes en zonas templadas. (McKendrick, 2000)

- El medio usado para la germinación a simbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo. (McKendrick, 2000)

- La germinación a simbiótica es un método empleado actualmente en el programa de germinación in vitro. En caso de disponer del hongo a partir de siembras in situ, abría la posibilidad de usar técnicas simbióticas en el futuro. (McKendrick, 2000)

Se debe considerar que lo que se siembra está determinado por la disposición de cualquiera de las dos formas de encontrar las semillas de acuerdo a la época en que se colectan. (McKendrick, 2000)

1.2.7.6. Letargo de la semilla

Aun cuando las condiciones ambientales sean adecuadas para la germinación de semillas, muchas de ellas no lo hacen, aunque permanezcan viables. La no germinación de las semillas, también se conoce como latencia o letargo, y está ligada a causas intrínsecas de las semillas o frutos, pero también a efectos ambientales. (Enciclopedia US, 2004)



Causas del letargo de la semilla

El hecho de que las semillas aparentemente maduras no germinen puede deberse a un factor o una combinación de factores (Amen, 1968; 1965). Las causas principales de las semillas son:

- Embriones rudimentarios.
- Embriones fisiológicamente inmaduros.
- Cubiertas o integumentos de semillas mecánicamente resistentes.
- Cubiertas impermeables de semillas.
- Presencia de inhibidores de la germinación. (Weaver, 1967)

El letargo causado por embriones rudimentarios se encuentra en las orquídeas, el ginko y el acebo. (Weaver, 1967)

En esas especies, los embriones aún se encuentran imperfectamente desarrollados, cuando se desprenden las

semillas, y no pueden producirse ninguna germinación en tanto no se complete el desarrollo de le embrión.

(Weaver, 1967)

1.2.7.7. Germinación in vitro de la semilla de orquídea

De acuerdo con Arditti (1967), Harley (1969), y Pierik *et al.* (1982a, 1983), la germinación de las semillas de orquídea tiene lugar de la siguiente forma: El embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen. Despues se inicia la división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células, y sobre aquel puede distinguirse un meristemo del vástago. Tan pronto como se inicia la diferenciación de órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comienza un período de crecimiento intenso. Si el protocormo está a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrollan hojas. Como resultado de la formación de la clorofila la planta se vuelve autótrofa. Más tarde las primeras raíces auténticas se forman endógenamente; el protocormo y los

rizoides (pelos radicales) pierden su misión nutritiva y desaparecen. (Pierik, 1990)

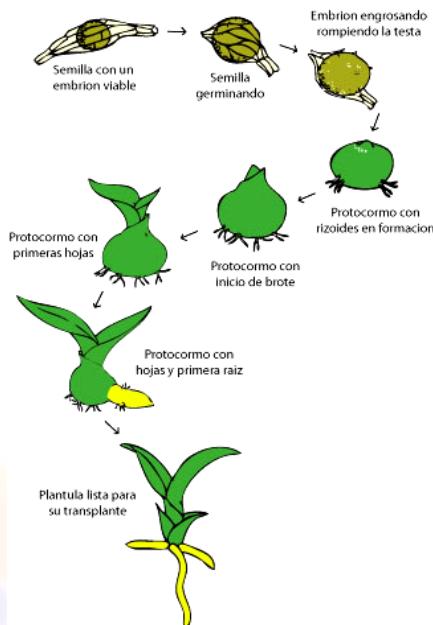


Figura N° 6. Proceso de germinación In Vitro de la semilla de orquídea.

Fuente. (Seaton & Ramsay, 2009)

1.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO

1.3.1. Auxinas

Biosíntesis: el término auxina designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico pero a menudo se usa como sinónimo del ácido indolacético (IAA) que es la

principal auxina natural que posiblemente se sintetiza a partir del aminoácido triptófano.

La auxina se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes, en las yemas y hojas jóvenes y en general en los meristemos. (Rojas & Ramirez, 2000)

Acción fundamental: Se ha propuesto varios mecanismos acerca de la acción del ácido indol acético (IAA) sobre los ácidos nucléicos. Según uno de ellos actúa removiendo la capa de histonas que envuelve a la cadena de DNA y descubre mensajes que, sin su acción, quedarían reprimidos. (Rojas & Ramirez, 2000)

Es una característica de las auxinas el que a concentraciones bajas estimula el metabolismo y desarrollo, y a concentraciones altas lo deprimen. (Rojas & Ramirez, 2000)



Efectos característicos: En muchos casos las diversas hormonas induce efectos parecidos, y además, la interacción hormonal dificulta el reconocimiento de efectos típicos para cada hormona. (Rojas & Ramirez, 2000)

Las auxinas generalmente produce: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración de auxina predomina la formación de raíces mientras con altas concentraciones de auxina no se produce raíces, y tiene lugar, en cambio, la formación de callo. (Pierik, 1990)

A veces la adición de auxinas estimula el crecimiento de plántulas. Pierik *et al.* (1984) mostraron como el ANA promueve la formación de raíces en plántulas de algunas Bromeliáceas, lo que traduce en la estimulación del crecimiento de las plantas recién germinadas. (Pierik, 1990)

Efectos en los tejidos *in vitro*

- Promueve el crecimiento del callo, de las suspensiones celulares, de órganos (meristemos y ápices)
- Regula la morfogénesis, especialmente en asociación con las citoquininas.
- Inducción de raíces. (Cabrera, 2003)

1.3.1.1. IBA

Ácido indolbutírico (IBA) es usado en la misma manera como el ácido indol acético (IAA) y es aceptado alrededor del mundo como una hormona de propagación y enraizador para plantas ornamentales. (Interceme Technologies)

El ácido indolbutírico parece ser el más práctico de la serie del ácido indol y es especialmente efectivo por iniciar el enraizamiento y brote de hojas.

Se relaciona con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo *in vitro* las



auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción del callo. El IBA y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. (Cabrera, 2003)

IBA es un polvo blanco más o menos cristalino sólido que exhibe las reacciones características de un ácido orgánico. Este es insoluble en agua pero soluble en solventes orgánicos. (Interceme Technologies)

1.3.2. Citoquinina

Biosíntesis: Las citoquininas se sintetizan principalmente en la raíz, y su presencia en las yemas del tallo, donde tienen efecto hormonal puede ser por transporte de la raíz pero hay informes de su síntesis en las hojas. Por tener adenina en su molécula, se cree que provenga parcialmente de productos de hidrólisis de fracciones de ácidos nucléicos. (Rojas & Ramirez, 2000)

Acción fundamental: Se ha demostrado en cultivo de tejido que cuando se dan citoquininas “marcadas” estas aparecen en la cadena de RNA a la que se incorporan por



llover adenina en su molécula; esta incorporación es muy probable que tenga un efecto de expresión fisiológica de los genes pero realmente no se ha demostrado. (Rojas & Ramirez, 2000)

Efectos característicos: En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas generalmente son diluidas con hidróxido de sodio 1N. *In vitro* inhibe las auxinas-oxidadas (mediante el nivel de auxina en los tejidos). Está también implicado en el metabolismo de los carbohidratos, en la actividad enzimática de las vías glucolítica y oxidativa de las pentosas fosfato. (Cabrera, 2003)

Efectos en los tejidos *in vitro*

- Estimulación de la división celular. En su ausencia la metafase de la mitosis es considerablemente afectada.

- Involucradas en la síntesis de proteína.
- La proliferación de callo proveniente de tejidos de dicotiledóneas requiere la presencia tanto de auxina como de citoquinina, pero la aplicación en forma secuencial es más provechosa.
- Modificación de la dominancia apical. (Cabrera, 2003)

1.3.2.1. BA

6-BA o 6-benciladenina es la primera citoquininas sintéticas. Se puede inhibir la degradación de la clorofila, ácidos nucléicos y proteínas, promover la entrega de los aminoácidos, sales inorgánicas y reguladores del crecimiento.

Ayuda a mantener la planta verde y retardar el envejecimiento. Puede ser utilizado en la agricultura, la horticultura, las plantas en diferentes etapas, desde la germinación hasta la cosecha. (Interceme Technologies)



1.4. Efecto de las auxinas y citoquininas en la germinación

Cuando la planta germina, comienzan a actuar algunas sustancias hormonales que regulan su crecimiento desde esa temprana fase: las fitohormonas, llamadas giberelinas, son las que gobiernan varios aspectos de la germinación; cuando la planta surge a la superficie, se forman las hormonas llamadas auxinas, las que aceleran su crecimiento vertical, y, más tarde, comienzan a aparecer las citocininas, encargadas de la multiplicación de las células y que a su vez ayudan a la ramificación de la planta.

La manera en que las auxinas hacen crecer a la planta es por medio del aumento del volumen celular provocado por absorción de agua.

Conociendo la existencia de auxinas que hacen crecer a la planta por agrandamiento de sus células y la presencia de citocininas que favorecen la división celular, tendríamos la posibilidad de lograr plantas con crecimiento ilimitado, pero esto no sucede así, la planta contiene también inhibidores,

sustancias que actúan cuando las condiciones dejan de ser favorables para el crecimiento ya sea por escasez de agua o por frío.

Las citocininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos.
(Docencia.itz, 2009)

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, la cual se encuentra ubicada al Sureste de la ciudad de Cuenca provincia del Azuay.

Altitud: 2584 m.s.n.m.

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

Precipitación promedio: 847 mm/año

UTM: E 719768 N 9677340



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES:

2.1.1. Materiales Biológicos

- Semillas de *Comparettia speciosa*
- Maicena
- Guineo
- Agua de coco
- Tomate riñón

2.1.2. Materiales Físicos

Equipos

- Balanza analítica
- Autoclave
- Extintor
- Cámara de flujo laminar
- Roseador para el etanol
- Estéreo microscopio

- pH
- Conductímetro
- Reverbero eléctrico
- Refrigerador y congelador a – 20°C
- Cuarto de crecimiento (20°C a 25°C, 10 horas de luz, 14 horas de oscuridad) y repisas a 50 cm con lámparas fluorescentes de 40 watts.

Herramientas

- Azas
- Pinzas
- Mangos de bisturí (hoja #11)

Materiales

- Cajas petri
- Probeta 100 cc
- Tubos VACUN TAINER para las semilla
- Tubos de ensayo de 18 mm, con tapas
- Algodón
- Erlenmeyer de 500 1000 cc



- Vasos de precipitación de, 50 100 150 250 500 y 1000 cc
- Jeringuillas hipodérmicas de 20 - 50 cc
- Mecheros
- Mandil de laboratorio
- Lápices
- Papel de aluminio
- Papel periódico
- Toalla pequeña para manos
- Mascarilla
- Tamiz de 18 u
- Cobertor de cabello

2.1.3. Materiales Químicos:

- Alcohol (etanol al 70%)
- NaOH y HCl 1N para ajustar el pH.
- Agar-Agar Bacto-agar (SIGMA, 1990)
- Agua destilada
- Agua estéril

- Azúcar
- BA
- IBA
- CIO Na
- Mioinositol
- Piridoxina
- Tiamina
- Acido nicotínico
- Peptona
- Sucrosa
- Sales para los preparados de los medios de cultivo
Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y
Casero.

2.1.4. Factores en estudio

Evaluación de cinco medios de cultivo:

- Phytamax 6793 (SIGMA, 1990)
- Murashige Skoog 8280 (SIGMA, 1990)
- Knudson 4003 (SIGMA, 1990)

77

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012



- Lindemann 0270 (SIGMA, 1990)
- Casero (Sevillano, 2007)

Niveles de Dosificación de reguladores de crecimiento

- - **Niveles de dosificación con BA (6-benciladenina)**
 - on 1 ppm de BA
 - on 1.5 ppm de BA
 - on 2 ppm de BA
 - in 0 ppm de BA
- - **Niveles de dosificación de IBA (3 ácido indolbutírico)**
 - on 1 ppm de IBA

- C
on 1.5 ppm de IBA
- C
on 2 ppm de IBA
- S
in 0 ppm de IBA
- N
iveles de dosificación de BA + IBA
 - C
on 1 ppm de BA + IBA
 - C
on 1.5 ppm de BA + IBA
 - C
on 2 ppm de BA + IBA
 - S
in 0 ppm de BA + IBA

2.2. METODOS



Se utilizó los medios de cultivo Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann al 35% de concentración cada uno y Casero con diferentes macro y micro elementos al mismo que se le añadió vitaminas, azúcar, con dosis de BA, IBA y BA + IBA, a esta se ajustó el pH. 5.5 - 5.6 se adicionó agar y se aforo, a la mezcla se la calentó para que el agar se mezcle completamente y en caliente se lo colocó en cada uno de los tubos para su posterior solidificación.

GRUPOS

		MS 8280 0,5%	Phytamax 6793 0,5%	Knudson 003 35%	Lindemann 0270 0,5%
Grupo 1	NO3(N)	0	288,75	175	0
	NO3K	665	332,5	0	0
	NO3Na	612,8			

Grupo 2	SO4Mg	63,24	31,6225	42,743	20,517
	SO4Mn	5,915	2,9575	1,989	0,018
	SO4Zn	3,01	1,855	0,1158	0,1978
	SO4Cu	0,00875	0,004375	0,02184	0,00665



\Grupo 3	IK	0,290 5	0,14525	0	0,03465
	CICo	0,008 75	0,00437 5	0	0
	Cl2Ca	116,2	58,1	243,04	0

Grupo 4	PO4H2	59,5	29,75	87,5	47,25
	BO4H3	2,17	1,085	0,0196	0,3549
	MoO4	0,087	0,04375	0	0

Grupo 5	SO4Fe	9,73	9,7475	8,75	0
	EDTA	12,95	13,034	0	0

Vitamin as	Thiamin	0,35	0,35	0,35	0,35
	Glicina	0	0	0	0
	Piridoxi na	0,175	0,175	0,175	0,175
	A.	0,175	0,175	0,175	0,175

Varios	Al Cl3				0,0196
	SO4NH4			175	350
	NO3Ca			243,04	121,52
	MoO3			0,0056	
	ClK				367,5



	Ni Cl ₂ 6H ₂ O			0,010906
	Citrato férrico			1,54

Los pesos están en miligramos/litro. (SIGMA, 1990)

2.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRES

2.2.1.1. Disolución de los medios

Se procedió a pesar en la balanza analítica, uno por uno los reactivos que forma los diferentes grupos compatibles químicos para el medio de cultivo Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann, una vez pesados para 10 o 100 litros se le aforo a 100 cc y se tomo la cantidad necesaria para un litro (proceso utilizado para cantidades que la balanza analítica no es capaz de pesar cantidades demasiado pequeñas) y se colocó en frascos con tapa con su respectiva identificación, para cantidades normales se peso, se diluyo y aforo a 100cc luego se coloco en su respectivo frasco con etiqueta para su posterior

utilización. Una vez terminado la preparación de los grupos químicos, se tomó el volumen correspondiente de los grupos químicos se mezcló y aforo a 1000 cc.

De esta manera se lo hizo para los cuatro medios de cultivo agrupando para cada uno los diferentes grupos compatibles.

2.2.1.2. Preparación del medio Casero

Basado en información obtenida del Grupo Orquideófilo Canario, ellos recomiendan en uso de este medio de cultivo casero, el cual tiene los siguientes ingredientes:

- Maicena 80 g.
- Guineo maduro 100 gramos por litro
- Agua de coco 50cc
- Tomate riñón 100 gramos por litro
- Abono foliar 1cc
- Azúcar 20 gramos por litro (Sevillano, 2007)

Cocinar por 15 minutos en 400 cc de agua el tomate riñón y guineo maduro, licuar y tamizar. Cocinar por 5

minutos la maicena en 500 cc poner todos los ingredientes en el erlenmeyer y aforar a 1 litro. Homogenizar o licuar. (Sevillano, 2007)

Ajustar el pH con cinta para pH, agregando hidróxido de sodio para subir el pH, o ácido cítrico y/o vinagre para bajar el pH. Se colocará en los tubos 5 cc de medio de cultivo. (Sevillano, 2007)

Dejar reposar, etiquetarlos y se procede a colocar en la autoclave o olla de presión a 15 lb/p2 por 15 minutos para su esterilización.

Sacar de la autoclave y se deja enfriar. (Sevillano, 2007)

2.2.1.3. Disolución del IBA:

Se preparó IBA a 100 ppm, se procedió a pesar 10 mg y a disolver en un vaso de precipitación con hidróxido de sodio NaOH 1N luego diluir y aforar con agua destilada en

un balón volumétrico de 100 cc se etiquetó y se guardó en refrigeración a 5°C de temperatura hasta su uso.

2.2.1.4. Disolución del BA:

Se preparó BA a 100 ppm, se procedió a pesar 10 mg y a disolver en un vaso de precipitación con hidróxido de sodio NaOH 1N luego diluir y aforar con agua destilada en un balón volumétrico de 100 cc se etiquetó y se guardó en refrigeración a 5°C de temperatura hasta su uso.



Figura N° 7. Materiales utilizados para la disolución de hormonas y dosificación.

2.2.2. Dosificaciones

A continuación, las dosificaciones que se aplicaron para cada uno de los medios:

PHYTAMAX

Tratamiento	Medio	Dosis en	
		IBA	BA
T1	Phytamax	1	0
T2	Phytamax	1.5	0
T3	Phytamax	2	0
T4	Phytamax	0	1
T5	Phytamax	0	1.5
T6	Phytamax	0	2
T7	Phytamax	1	1
T8	Phytamax	1.5	1.5
T9	Phytamax	2	2
T10	Phytamax	0	0

MURASHIGE SKOOG

Tratamiento	Medio	Dosis en	
		IBA	BA



T11	Murashige	1	0
T12	Murashige	1.5	0
T13	Murashige	2	0
T14	Murashige	0	1
T15	Murashige	0	1.5
T16	Murashige	0	2
T17	Murashige	1	1
T18	Murashige	1.5	1.5
T19	Murashige	2	2
T20	Murashige	0	0

KNUDSON

Tratamiento	Medios	Dosis en	
		IBA	BA
T21	Knudson	1	0
T22	Knudson	1.5	0
T23	Knudson	2	0
T24	Knudson	0	1
T25	Knudson	0	1.5
T26	Knudson	0	2
T27	Knudson	1	1
T28	Knudson	1.5	1.5
T29	Knudson	2	2
T30	Knudson	0	0

LINDEMANN

Tratamiento	Medios	Dosis en	
		IBA	BA
T31	Lindemann	1	0
T32	Lindemann	1.5	0
T33	Lindemann	2	0
T34	Lindemann	0	1
T35	Lindemann	0	1.5
T36	Lindemann	0	2
T37	Lindemann	1	1
T38	Lindemann	1.5	1.5
T39	Lindemann	2	2
T40	Lindemann	0	0

CASERO

Tratamiento	Medios	Dosis en	
		IBA	BA
T41	Casero	1	0
T42	Casero	1.5	0
T43	Casero	2	0
T44	Casero	0	1
T45	Casero	0	1.5
T46	Casero	0	2
T47	Casero	1	1



T48	Casero	1.5	1.5
T49	Casero	2	2
T50	Casero	0	0

- De la solución a 100 ppm se tomó 10 cc para litro de medio de cultivo, para tener en 1 ppm.

2.2.3. Preparación del medio

Una vez llevado a cabo las dosificaciones de las soluciones madres e identificado cada erlenmeyer anteriormente especificadas, se agitó y seguidamente se reguló el pH al 5.5, se añadió el agar luego calentamos a baño maría para su disolución, se adicionó las respectivas dosis de IBA y BA.

Una vez obtenida esta solución se dispensó 5 cc en los tubos y se etiquetó lo sobrante se colocó en los frascos de 250 ml se los tapo y se procedió a esterilizar en la autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Fuera del autoclave, una vez que se solidificó el medio de los tubos estos fueron llevados al cuarto de cultivo de tejidos donde fueron roseados con alcohol y ubicados dentro de la cámara de flujo laminar, para realizar la siembra.

2.2.4. Siembra

Para realizar una correcta siembra se debe tomar en cuenta principalmente una desinfección y esterilización completa del lugar donde se va a trabajar a continuación enumeraremos algunos pasos que se deben realizar antes de la siembra.

2.2.4.1. Limpieza de laboratorio

Antes de realizar la siembra, el laboratorio debe ser limpiado y desinfectado por completo, la limpieza del laboratorio se realizó con cloro diluido (200 cc en 800 cc de agua), con la ayuda de algodón se moja con ClONa y se lo pasa por todos los mesones y en el piso con escoba con el fin de desinfectar el laboratorio y así reducir el porcentaje de contaminación.

2.2.4.2. Lámpara UV

Un paso muy importante en el proceso de la siembra es la desinfección del medio ambiente, esto se realiza por medio de la utilización de la lámpara UV, se prende 24 horas antes de la siembra y permanecer prendida hasta el momento del ingreso al laboratorio, para así desinfectar el medio ambiente del área de trabajo, eliminando esporas de hongos y otros patógenos del medio ambiente.

2.2.4.3. Esterilización

Una de las obligaciones básicas dentro del laboratorio es el tener conocimiento sobre técnicas de esterilización, para un mejor manejo de los materiales dentro del laboratorio y así evitar contaminaciones.

2.2.4.3.1. Esterilización de los instrumentos

Lo más conveniente para trabajar dentro de la cámara de flujo laminar es recomendable tener dos sets de

instrumentos, colocando los instrumentos en alcohol etílico al 70% durante 3 a 4 minutos e invertir la posición de los mismos, luego colocarlos en dos cajas petri con alcohol y “flamearlos” teniendo las precauciones necesarias, dejándolo que se enfrié y colocándolos en un vaso con alcohol etílico los instrumentos, los mismos en contra de la corriente de aire de la cámara de flujo para evitar contaminaciones.

También se debe flamear obligatoriamente la boca de cada tubo y tapa antes y después de la siembra.



Figura N° 8. Esterilización de los instrumentos a usar en la siembra.

2.2.4.3.2. Esterilización del Sembrador

92

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: “EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*”

2012

La esterilización del sembrador es un factor muy importante para evitar la contaminación de las semillas ya que este pasa en contacto directo con las mismas.

Es esencial que la persona encargada de la siembra lave sus manos y antebrazos con abundante agua y jabón posteriormente a esto se debe roscar manos y antebrazos con alcohol etílico al 70% y con aplicación constantes cada 10 a 15 minutos; o cada vez que se saque las manos fuera de la cámara de flujo laminar.

Antes de ejecutar la siembra utilice mandil, mascarilla, protector de cabello, etc.

2.2.4.4. Cámara de flujo laminar

Se debe prestar atención a ciertas reglas básicas al usar la cámara de flujo laminar:

1. Prender la cámara de flujo laminar de 15 a 20 minutos antes de realizar la siembra.



2. Siempre desinfectar por completo usando alcohol etílico al 70% de concentración (tener mucho cuidado si se utiliza alcohol antiséptico que contiene metanol). Usar un roceador y limpiar todas las superficies de la cámara con un algodón empapado de alcohol (incluyendo las paredes laterales, superior y filtro). Se debe desinfectar tanto antes como después de utilizar la cámara. Tener cuidado de no inhalar cuando se rosee el etanol para utilizar la cámara.
3. Todo lo que ingresará en la cámara debe estar esterilizado. Si se usa guantes, desinféctelos completamente antes de usarlos, roceando alcohol y guardándolos en la cámara hasta que el alcohol se haya secado. Es posible en lugar de usar guantes, lavarse las manos y fregarse las uñas usando un jabón antibacterial, secarse y esterilizar con alcohol.

Cualquier nota escrita con marcador sobre el vidrio será borrada por el etanol. Los instrumentos pueden ser autoclavados antes de su uso, envolviéndolos previamente



en papel de aluminio o papel de empaque café sellado con cinta adhesiva. Una vez en la cámara, la esterilización es asegurada sumergiéndola en etanol al 70% y flamear. Despues de flamear los instrumentos éstos deben ser ubicados rápidamente sobre una caja petri esterilizado y para continuar con su uso el flameado, déjelos enfriar antes de utilizar.

4. Cualquier espora de bacteria u hongo dentro de la cámara flotará hacia el exterior y en dirección a su operador. Nunca poner las manos, mangas u otro objeto sobre o en dirección de algo desinfectado (como el medio). Mantener movimientos leves y evitando crear turbulencia de aire que pueda ocasionar contaminación. No hablar, toser o estornudar dentro de la cámara. Trabajar en lo posible por la parte externa de la cámara y minimice el tiempo de exposición de los medios en cuando sea posible.
5. Mantener las condiciones de esterilización mediante la limpieza regular de la cámara con alcohol, desinfectar

nuevamente los instrumentos luego de su uso y alcohol de nuevo las manos después de haber tenido contacto con cualquier objeto fuera de la cámara. De manera especial, no se toque el cabello o la cara. (McKendrick, 2000)



Figura N° 9. Cámara de flujo laminar.

2.2.4.5. Desinfección de la semilla

La desinfección se puede realizar de 2 maneras:

La cápsula todavía cerrada en este caso la desinfección es muy simple, se baña la capsula en alcohol al

96% y posteriormente se flamea. La cápsula que contiene las semillas esta generalmente estéril en su interior.

La cápsula abierta en el cual se esteriliza las semillas una por una y es de esta manera es como se desinfecto las semillas en la presente investigación, la desinfección de las semillas se la realizo de la siguiente manera:

Se preparó una solución del 1 a 1.5% de concentración de cloro, se tomo 20 cc aforando a 100cc con agua destilada y se sacudió por un tiempo corto. Luego se puso las semillas en una jeringuilla hipodérmica de 10 ml con unos 5 ml de la solución de cloro preparada anteriormente y se procedió a sacudir rigurosamente y crear el vacío para que la semilla no forme grumos y tenga contacto con la solución y se realice una buena esterilización; se realizó 3 vacíos esto durante 2 minutos.

Pasado este periodo de tiempo se colocó las semillas en un filtro estéril dentro de una caja petri en la cámara de

flujo laminar y se realizó 3 cambios de agua cada 3 minutos cada uno utilizando agua esterilizada para la eliminación del cloro; finalmente se vierte la semilla en una caja petri debidamente esterilizada, se adicionó agua para poder dosificar y distribuir uniformemente la semilla sobre los tubos que contienen el medio de cultivo.



Figura N° 10. Esterilización de la semilla.

2.2.4.6. Siembra de la semilla en los tubos

Se tomó la semilla de la caja petri con la pipeta pasteur esterilizada, para sembrar en los tubos que se encontraban dentro de la cámara de flujo laminar, se colocó 2 gotas de la semilla mezclada con el agua luego se flameó la boca del

tubo y la tapa, sin ocasionar turbulencias, este procedimiento se realizó de una manera rápida y con el mechero muy cerca del área de trabajo para evitar la contaminación en la cámara de crecimiento, se le cubrió la tapa con papel parafilm.



Figura N° 11. Siembra de las semillas en los tubos.

2.2.4.7. Etiquetado

Antes de ingresar los tubos a la cámara de flujo laminar estos fue etiquetado. La etiqueta contenía las iniciales del tratamiento, así como las dosis de hormonas y el número de repetición a la cual pertenece el tubo. Una vez terminado la siembra estos tubos fueron llevados a la cámara de crecimiento donde permanecerán hasta que se desarrollen sus primeros órganos que le permitan una autosuficiencia.



Figura N° 12. Etiquetado de los tubos.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se presenta los resultados obtenidos en la investigación de acuerdo a los objetivos planteados. Para determinar la influencia de los medios de cultivo y el efecto de las hormonas BA (6 benciladenina) e IBA (ácido indolbutírico) en las semillas *Comparettia speciosa* se observó y evaluó con la ayuda del estéreo microscopio el desarrollo de las semillas hasta la formación del protocormo.

3.1. RESULTADOS

Incidencia de los medios de cultivo, las hormonas (auxinas y citoquininas) en el proceso de germinación de *Comparettia speciosa*.

- Número de días para el incremento del volumen en el embrión al 80% de las semillas.



- Número de días para la pérdida de la envoltura del embrión al 80% de las semillas.
- Número de días para el inicio de brotación al 80%.
- Número de días para inicio de formación de la primera hoja al 80% de las semillas.
- Número de días para detección bajo estéreo microscopio de cambio de color.
- Porcentaje de germinación (3 campos por tubo para la evaluación, diámetro de 2 mm de los protocormos en número de días).
- Número de días para detección visible del color verde de las semillas.

Para la evaluación se procedió a evaluar con la ayuda del estéreo microscopio, en el campo de enfoque se contabilizó el número de semillas y se contabilizó las que manifestó cambios.

Cada semana se realizó una observación y su evaluación.

102

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012

TABLA Nº 2. ADEVA de los datos de los porcentajes de semilla hinchada transformados a $\sqrt{x+0,5}$ a los 53 días desde la siembra.

F de V	gl	SC	CM	FC	F tab	
					0,05	0,01
Total	149	218,789				
Tratamientos	49	186,784	3,812	12,622**	1,48	1,74
Medios	4	169,429	42,357	140,0763**	2,46	3,51
Dosis	9	5,052	0,561	1,8564 NS	1,97	2,59
Medios x Dosis	36	12,303	0,342	1,1302 NS	1,52	1,80
Repeticiones	2	2,371	1,185	3,9198*	3,09	4,82
Error	98	29,634	0,302			

CV% = 28.01%

El análisis de variancia ADEVA de los datos del ANEXO N. 3 presentó hinchamiento de semilla a los 53 días de la siembra en la semilla de *Comparettia speciosa*, el efecto de los tratamientos y de los medios con diferencias altamente significativas, en lo que respecta al efecto de Dosis, Medios



x Dosis y repeticiones dio resultados no significativos. Dosis y Medios x Dosis no tuvo efecto en el hinchamiento de la semilla. (Tabla Nº 2)

Tratamientos

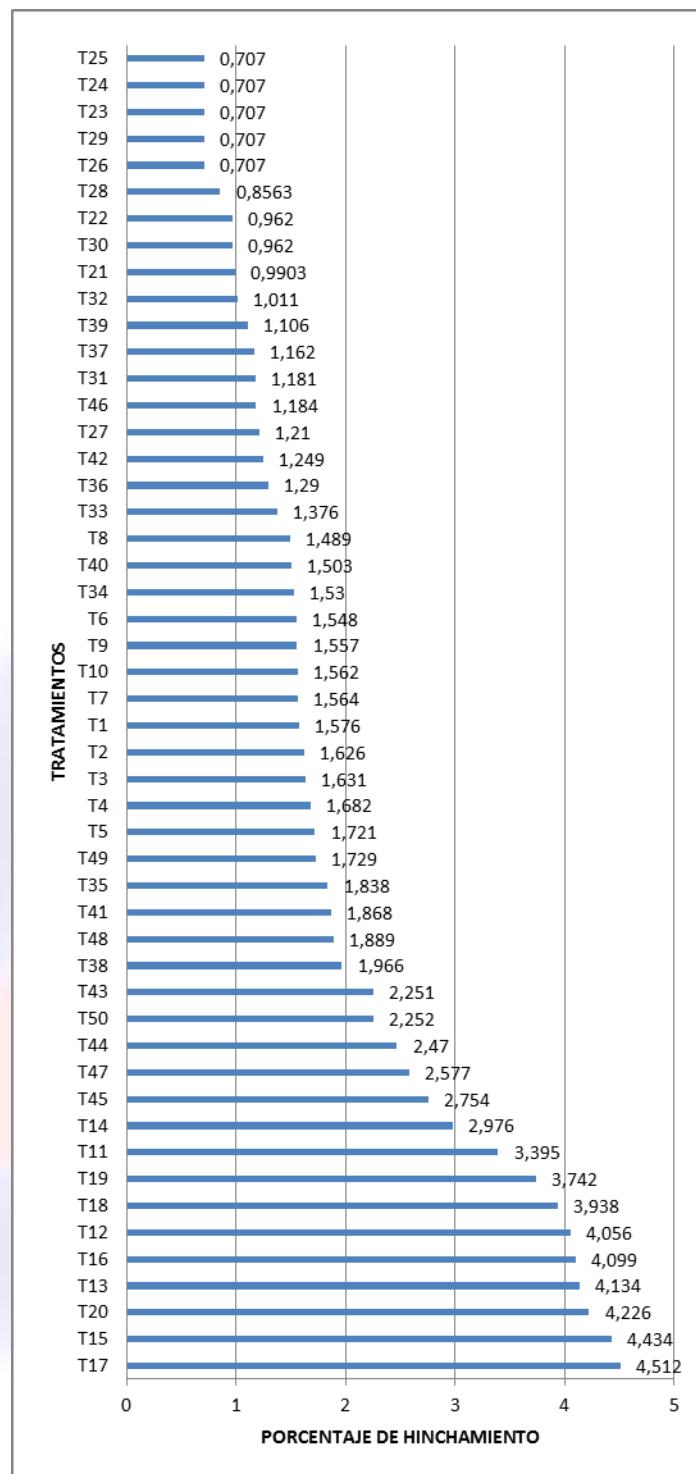
De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% al cumplir los 53 días desde la siembra, el tratamiento **T17** con el 4,512% fue el que obtuvo el mayor porcentaje de semilla hinchada, por lo cual se ubica en el rango “a”, seguido por los tratamientos **T15** y **T20** con el 4,434% y 4,226% de semilla hinchada respectivamente ubicándose en el rango “ab”, luego viene los tratamientos **T13**, **T16**, **T12** y **T18** con el 4,134%, 4,099%, 4,056% y 3,938% de semilla hinchada respectivamente ubicándose en el rango “abc”, sigue el tratamiento **T19** con 3,742% de semilla hinchada respectivamente ubicándose en el rango “abcd”. Sigue el tratamiento **T11** con el 3,395% de semilla hinchada ubicándose en el rango “abcde”, a continuación el tratamientos **T14** con el 2,976%, de semilla hinchada ubicándose en el rango “abcdef”, seguido del tratamiento



T45 con el 2,745% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**abcdefg**”, a continuación el tratamiento **T47** con el 2,577% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**abcdefgh**”, sigue el tratamiento **T44** con el 2,47% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**bcdefgh**”, seguido de los tratamientos **T50** y **T43** con el 2,252% y 2,251% de semilla hinchada respectivamente ubicándose en el rango “**cdefgh**”, a continuación los tratamientos **T49, T5, T4, T3, T2, T1, T7, T10, T9, T6, T34, T40** y **T8** se ubican en el rango “**efgh**”, seguido por los tratamientos **T33, T36, T42, T27, T46, T31, T37** y **T39** ubicándose en el rango “**fgh**”, sigue los tratamientos **T32, T21, T30, T22** y **T28** se ubican en el rango “**gh**”, el resto de tratamientos se ubican en el rango “**h**”.

(ANEXO N° 7)

Figura N° 13. Porcentaje de semilla hinchada por tratamiento a los 53 días.



Medio

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5 % al cumplir los 53 días desde la siembra, el medio Murashige Skoog con el 3,951% de semilla hinchada fue el que obtuvo mayor porcentaje por lo cual se ubica en el rango “a”, a continuación se ubica el medio Casero con el 2,022% de semilla hinchada ubicándose en el rango “b”, seguido por los medios Phytamax, Lindemann, Knudson, con un porcentaje de semilla hinchada de 1,596%, 1,396% y 0,851% respectivamente ubicándose todos estos medios en el rango “c”. (ANEXO N° 11)

El Coeficiente de variación es del 28,01% esto posiblemente se debe a la falta de homogeneidad en el proceso de hinchar la semilla.

Figura N° 13.1 Promedios generales de la semilla hinchada en porcentaje para medios de cultivo durante los primeros 53 días desde la siembra, datos de (Tabla N° 2.2)

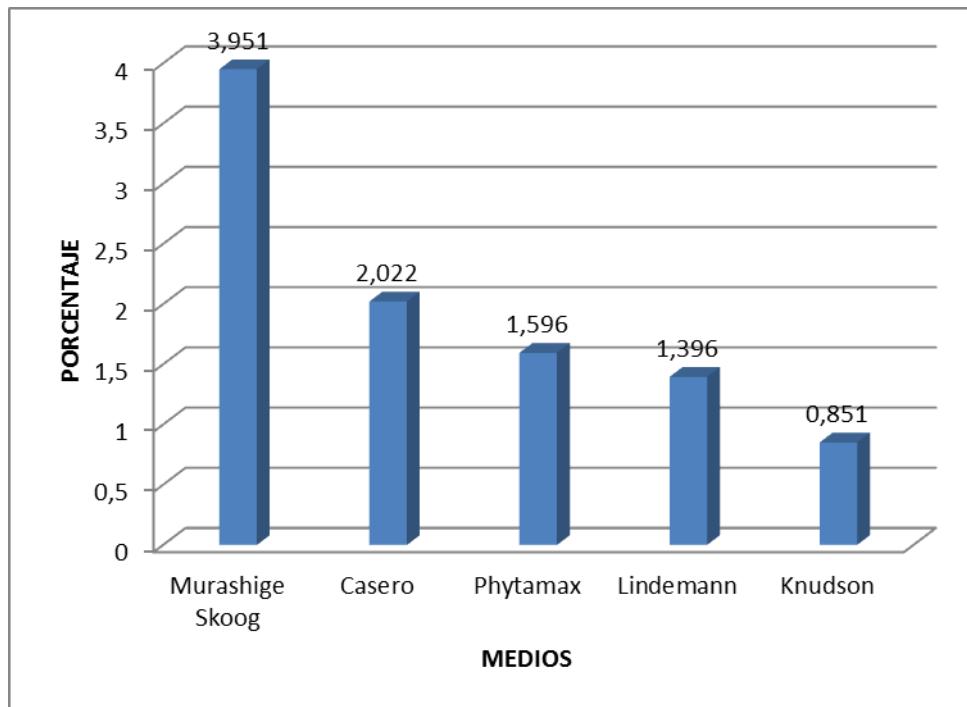


TABLA Nº 3. ADEVA de los datos de porcentajes de semilla hinchada transformados a $\sqrt{x}+0,5$ a los 67 días desde la siembra.

F de V	gl	SC	CM	FC	F tab	
					0,05	0,01
Total	149	244,523				
Tratamientos	49	201,961	4,122	9,860**	1,48	1,74
Medios	4	178,876	44,719	107,021**	2,46	3,51



Dosis	9	6,558	0,729	1,7438 NS	1,97	2,59
Medios x Dosis	36	16,527	0,459	1,0986NS	1,52	1,80
Repeticiones	2	1,613	0,807	1,9303*	3,09	4,82
Error	98	40,949	0,418			
CV %		26,71%				

El análisis de variancia ADEVA de los datos del ANEXO N. 4 en porcentajes de semilla sembrada hinchada a los 67 días desde la siembra, el efecto de los medios y tratamientos presentaron diferencias altamente significativas, en lo que respecta al efecto de Dosis, Medios x Dosis y repeticiones dio resultados no significativos. Dosis y Medios x Dosis no tuvo efecto en el hinchamiento de la semilla (Tabla Nº 3). Las semillas sembradas comenzaron a presentar cambio de color.

Tratamientos

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% al cumplir los 67 días desde la siembra, el tratamiento **T15** con el 5,08% fue el que obtuvo el mayor porcentaje de semilla hinchada, por lo cual se ubica en el rango “**a**”, a continuación el tratamiento **T17** con el 5,044% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**ab**”, seguido por los tratamientos **T18, T13 y T20** con el 4,798%, 4,775% y 4,741% de semillas hinchada ubicándose en el rango “**abc**”, luego viene los tratamientos **T16 y T12** con el 4,565% y 4,52% respectivamente de semillas hinchada ubicándose en el rango “**abcd**”, sigue el tratamiento **T19** con 4,337% de semilla hinchada respectivamente ubicándose en el rango “**abcde**”. Sigue el tratamiento **T11** con el 3,959% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**abcdef**”, a continuación los tratamientos **T47, T14, T45 y T48** con 3,314%, 3,227%, 3,043% y 2,939% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**abcdefg**”, seguido del tratamiento **T44** con el 2,769% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**bcdefg**”, sigue el tratamiento **T50 y T43** con el 2,754% y 2,598% de semilla

hinchada ubicándose en el rango “**cdefg**”, seguido por el tratamiento **T41** con el 2,435% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**defg**”, a continuación el tratamiento **T49** con el 2,057% de semilla hinchada ubicándose en el rango “**efg**”, sigue los tratamientos **T35, T40, T1, T5, T7, T9, T3, T34, T33, T8, T23, T38, T10, T29, T21, T6, T46, T31** y **T4** ubicándose en el rango “**fg**”, seguido del restante de tratamientos todos ellos ubicándose en el rango “**g**”. (ANEXO N° 8).

Figura N°14. Porcentaje de semilla hinchada por tratamiento a los 67 días.

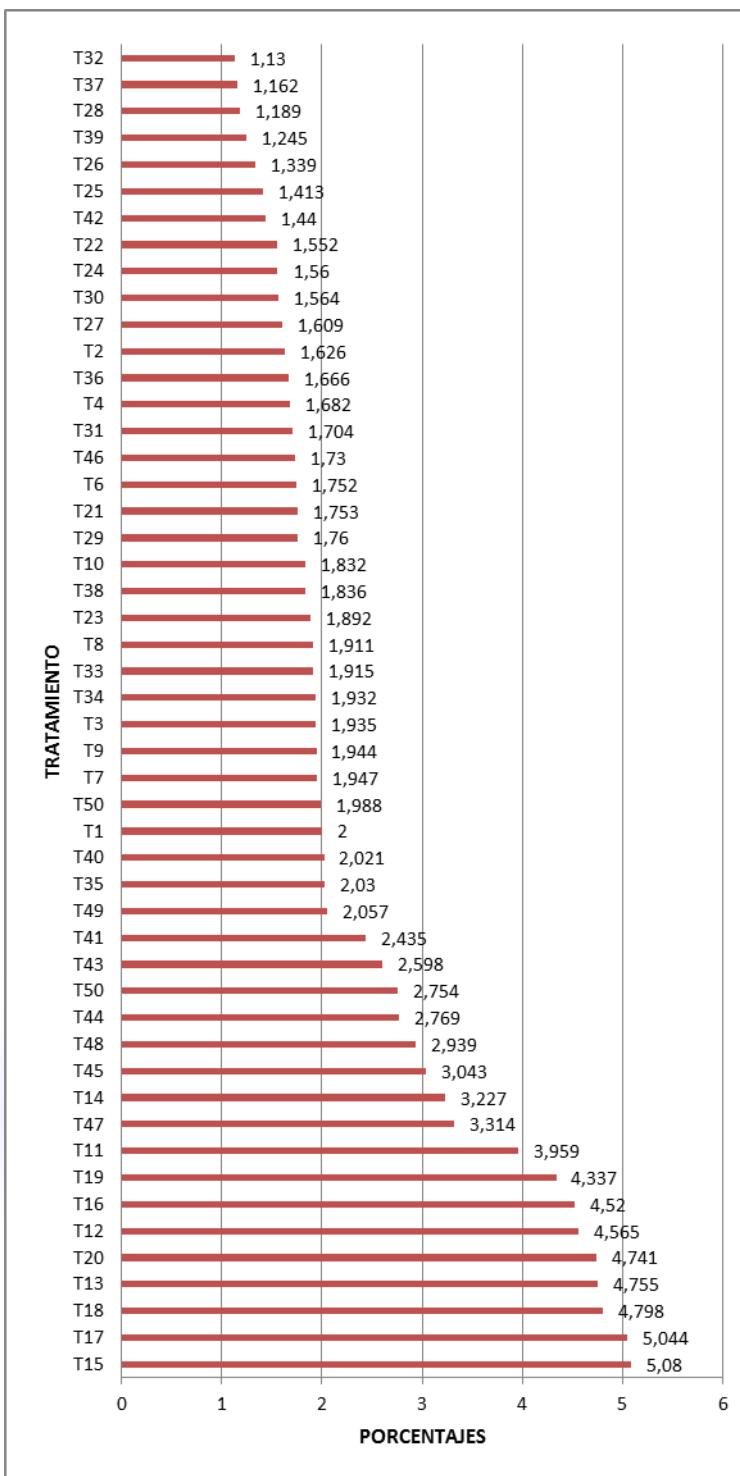


112

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012



Medio

Al cumplir los 67 días desde la siembra se obtuvo los siguientes datos: el medio Murashige Skoog con el 4,503% fue el que obtuvo mayor porcentaje de semilla hinchada hasta la fecha, por lo cual se ubica en el rango “a”, a continuación se ubica el medio Casero con el 2,508% de semilla hinchada ubicándose en el rango “b”, seguido por los medios Phytamax, Lindemann, Knudson, con un porcentaje de semilla hinchada de 1,862%, 1,664% y 1,563% respectivamente ubicándose todos estos medios en el rango “c”.(ANEXO Nº 12)

El Coeficiente de variación es del 26,71% esto posiblemente se debe a la falta de homogeneidad en el proceso de hinchamiento.

Figura Nº 14.1. Promedios generales de la semilla hinchada a los 67 días desde la siembra, datos de (Tabla Nº 2.2)

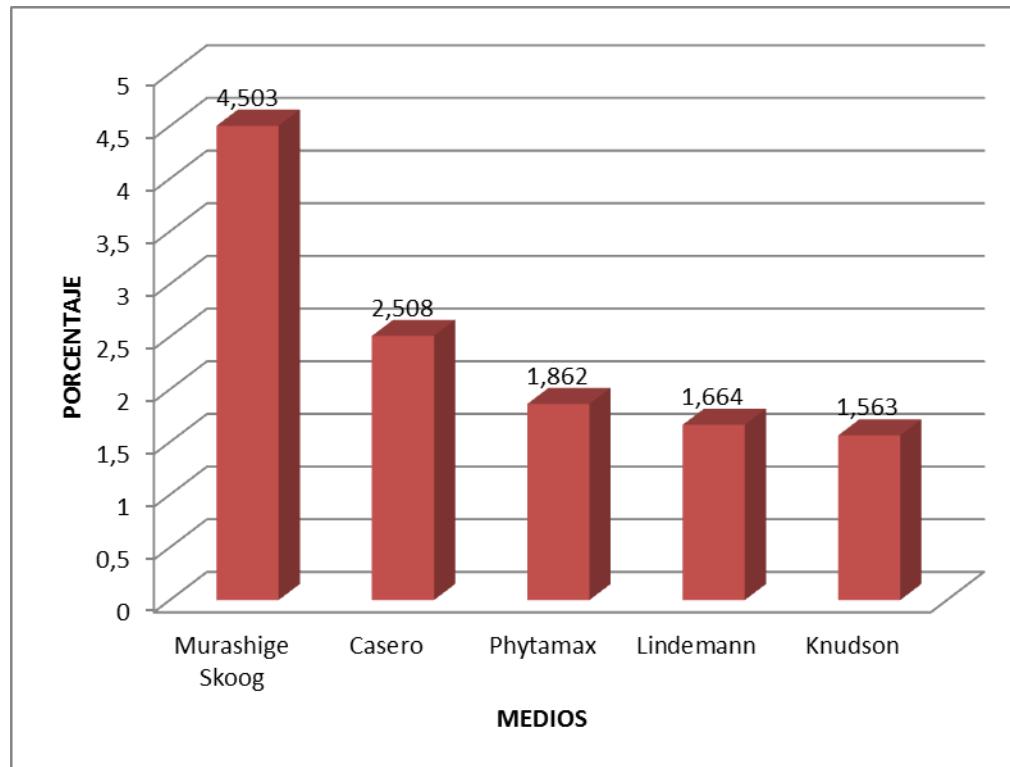


TABLA Nº 4. ADEVA de los datos de porcentajes de semilla de color verde (germinación) transformados a $\sqrt{x}+0,5$ a los 81 días desde la siembra.

F de V	gl	SC	CM	FC	F tab	
					0,05	0,01
Total	149	467,247				
Tratamientos	49	397,666	8,116	11,711**	1,48	1,74
Medios	4	361,328	90,332	130,288**	2,46	3,51
Dosis	9	9,737	1,082	1,5604	1,97	2,59



				NS		
Medios x Dosis	36	26,601	0,739	1,0658	1,52	1,80
Repeticiones	2	1,635	0,818	NS	3,09	4,82
Error	98	67,946	0,693			
CV %		28,57%				

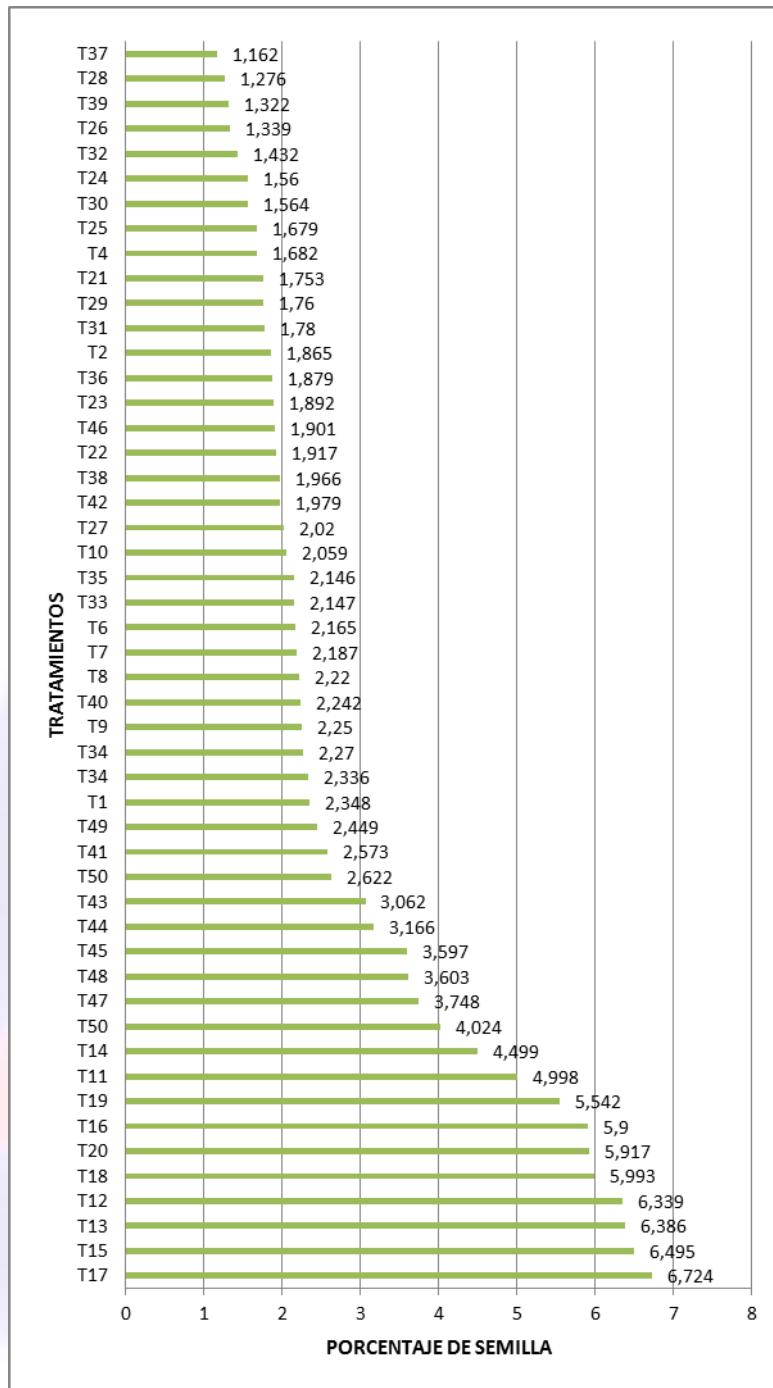
El análisis de variancia ADEVA de los datos del ANEXO N. 5 en porcentajes de semilla sembrada que presenta cambio de color visible a los 81 días desde la siembra en la semilla de *Comparettia speciosa* sembrada en los tubos de ensayo, el efecto de los medios y tratamientos con diferencias altamente significativas, en lo que respecta al efecto de Dosis, Medios x Dosis y Repeticiones dio resultados no significativos. Dosis y Medios x Dosis no tuvo efecto en el cambio de color de la semilla (Tabla N° 4). Se detectó pérdida de la envoltura del embrión.

Tratamientos

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% al cumplir los 81 días desde la siembra, el tratamiento **T17** con el 6,724% fue el que obtuvo el mayor porcentaje de semilla verde, por lo cual se ubica en el rango “**a**”, seguido por los tratamientos **T15, T13 y T12** con 6,495%, 6,386% y 6,339% de semillas verde ubicándose en el rango “**ab**”, luego viene los tratamientos **T18, T20 y T16** con el 5,993%, 5,917% y 5,9% de semilla verde ubicándose en el rango “**ab50c**”, sigue el tratamiento **T19** con 5,542% de semilla verde ubicándose en el rango “**abcd**”. Sigue el tratamiento **T11** con el 4,998% de semilla verde ubicándose en el rango “**abcde**”, a continuación el tratamiento **T14** con el 4,499% de semilla verde ubicándose en el rango “**abcdef**”, seguido del tratamiento **T50** con 4,024% de semilla verde ubicándose en el rango “**abcdefg**”. Sigue los tratamientos **T47, T48 y T45** con 3,748%, 3,603% y 3,597%, de semilla verde ubicándose en el rango “**bcd**”, seguido de los tratamiento **T44** con 12,59% ubicándose en el rango “**fg**”, a continuación el tratamiento **T44 y T43** con 3,166% y 3,062% de semilla

verde ubicándose en el rango “**cdefg**”, sigue el tratamiento **T5** con 2,622% de semilla verde ubicándose en el rango “**defg**”, a continuación los tratamientos **T41, T49, T1, T34, T3, T9, T40, T8, T7, T6, T33 y T35** y se ubican en el rango “**efg**”, seguido de los tratamientos **T10, T27, T42, T38, T22, T46, T23, T36, T2, T31, T29, T4, T25 y T30** ubicándose en el rango “**fg**” y por último en el rango “**h**” se ubican el restante de los tratamientos. (ANEXO N° 9)

Figura N° 15. Porcentaje de semilla verde (germinación) a los 81 días desde la siembra



Medio

Al cumplir los 81 días desde la siembra se obtuvo los siguientes datos: el medio Murashige Skoog con el 5,879% fue el que obtuvo mayor porcentaje de semilla verde, por lo cual se ubica en el rango “a”, a continuación se ubica el medio Casero con el 3,01% de semilla verde ubicándose en el rango “b”, seguido por los medios Phytamax, Lindemann y Knudson con un porcentaje de semilla verde de 2,167%, 1,841% y 1,676% respectivamente ubicándose todos estos medios en el rango “c”. (ANEXO Nº 13)

El Coeficiente de variación es del 28,57% se debe a la falta de homogeneidad en el cambio de color de la semilla posiblemente por el efecto heterogéneo en el hinchamiento de la semilla.

Figura Nº 15.1. Promedios generales de la semilla verde (germinación) en porcentaje por medios de cultivo a los 81 días desde la siembra, datos del (Tabla Nº 4.2)

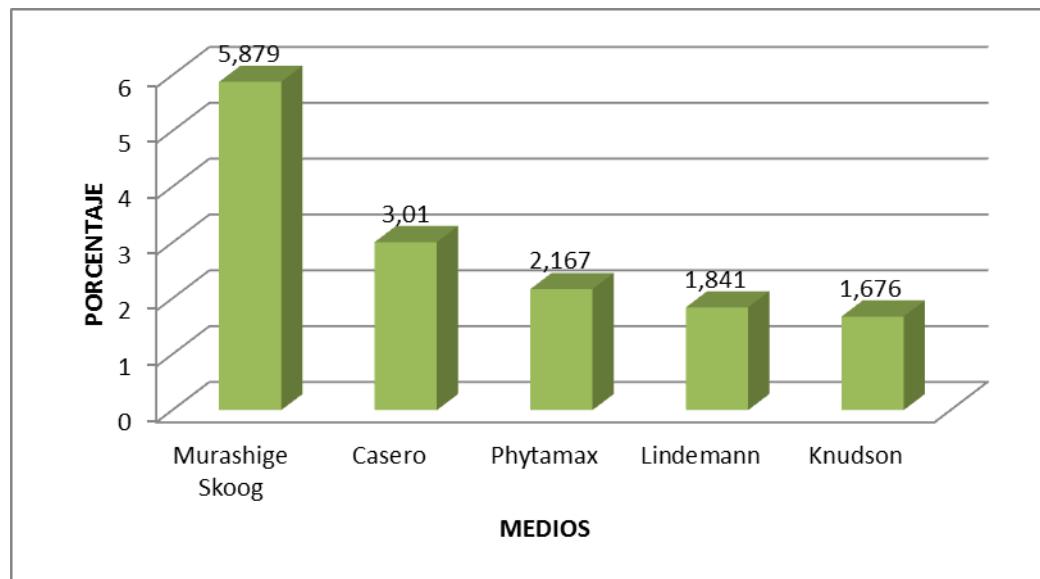


TABLA Nº 5. ADEVA de los porcentajes de semilla que presenta formación de protocormos transformados a $\sqrt{x}+0,5$ a los 96 días desde la siembra.

F de V	gl	SC	CM	FC	F tab	
					0,05	0,01
Total	149	545.363				
Tratamientos	49	462,245	9,434	11,504**	1,48	1,74
Medios	4	418,365	104,591	127,604**	2,46	3,51
Dosis	9	12,081	1,342		1,97	2,59



				1,6377NS		
Medios x Dosis	36	31,799	0,883	1,0777 NS	1,52	1,80
Repeticiones	2	2,792	1,396	1,7031 *	3,09	4,82
Error	98	80,326	0,820			
CV %		26,43%				

El análisis de variancia ADEVA de los datos del ANEXO N. 6 en porcentajes de semilla sembrada con formación de protocormo a los 96 días desde la siembra en la semilla de *Comparettia speciosa*, el efecto de los medios y tratamientos con diferencias altamente significativas, en lo que respecta al efecto de Dosis, Medios x Dosis y repeticiones dio resultados no significativos. (Tabla Nº 5)

Tratamientos

Al cumplir los 96 días desde la siembra, se obtuvo para tratamientos los siguientes datos:



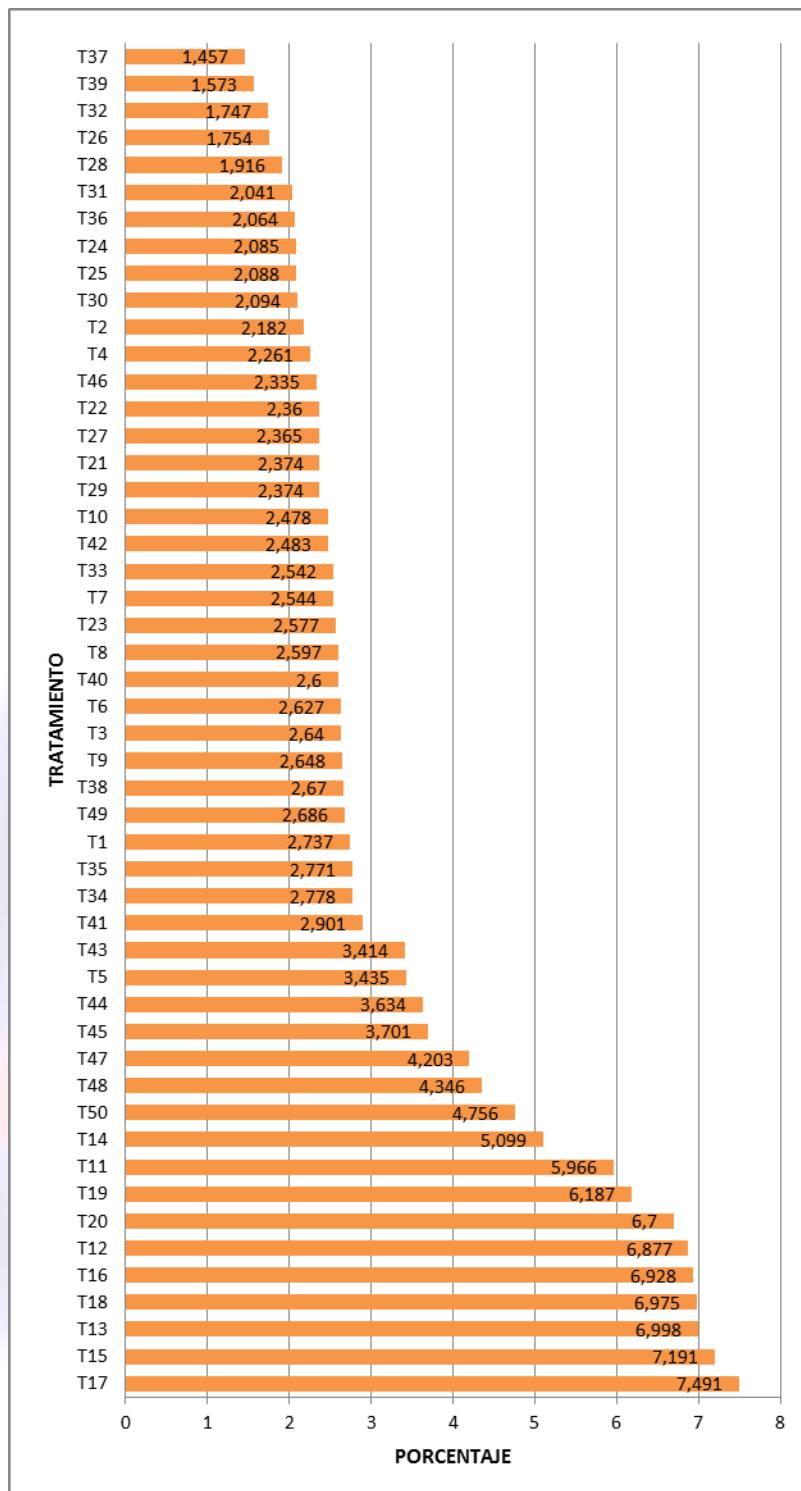
El tratamiento **T17** con el 7,491% fue el que obtuvo el mayor porcentaje de formación de protocormo, por lo cual se ubica en el rango “a”, seguido por el tratamiento **T15, T13, T18 y T16** con el 7,191%, 6,998%, 6,975% y 6,928% de semillas que presentan formación de protocormo respectivamente ubicándose en el rango “ab”, luego viene el tratamiento **T12** con 6,877% de semilla con formación de protocormo respectivamente ubicándose en el rango “abc”, sigue el tratamientos **T20** con 6,7% de formación de protocormo ubicándose en el rango “abcd”. Sigue el tratamiento **T19** con el 6,187% de formación de protocormo ubicándose en el rango “abcde”, a continuación el tratamiento **T11** con el 5,099% de semilla que presenta formación de protocormo ubicándose en el rango “abcdef”, seguido del tratamiento **T14** con 5,099% de semilla con formación de protocormo ubicándose en el rango “abcdefg”. Sigue el tratamiento **T50** con 4,756%, de semilla con formación de protocormo ubicándose en el rango “abcdefgh”, seguido del tratamiento **T48** con 4,346% ubicándose en el rango “abcdefghi”, a continuación el



tratamiento **T47** con 4,203% de semilla con formación de protocormo ubicándose en el rango “**bcd^efghi**”, sigue el tratamiento **T45** con 3,701% de semilla verde ubicándose en el rango “**cdefghi**”, seguido del tratamientos **T44** con 3,634% ubicándose en el rango “**defghi**”, a continuación los tratamientos **T5** y **T43** con 3,435% y 3,414% de semilla con formación de protocormo respectivamente ubicándose en el rango “**efghi**”, seguido de los tratamientos **T41** y **T34** con 2,901% y 2,778% respectivamente ubicándose en el rango “**fghi**”. Sigue los tratamientos **T35**, **T1**, **T49**, **T38**, **T9**, **T3**, **T6**, **T40**, **T8**, **T23**, **T7**, **T33**, **T42**, **T10**, **T29**, **T21**, **T27**, **T22**, **T46**, **T4**, **T2**, **T30**, **T25**, **T24**, **T36**, **T31** y **T38** ubicándose en el rango “**ghi**”. En el rango “**hi**” se encuentran los tratamientos **T26**, **T32** y **T39**. Por último en el rango “**i**” se ubican el restante de los tratamientos. (ANEXO N° 10)

Figura

N° 16.



125

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012

Porcentaje de semilla que presenta formación de protocormo por tratamiento a los 96 días desde la siembra.

Medios

Al cumplir los 96 días desde la siembra se obtuvo los siguientes datos: el medio Murashige Skoog con el 6,641% fue el que obtuvo mayor porcentaje de semilla con formación de protocormo, por lo cual se ubica en el rango “a”, a continuación se ubica el medio Casero con el 3,446% ubicándose en el rango “b”, seguido por los medios Phytamax, Lindemann y Knudson con de 2,615%, 2,224% y 2,199% respectivamente ubicándose todos estos medios en el rango “c”. (ANEXO Nº 14)

El Coeficiente de variación es del 26,43% esto se debe a la falta de homogeneidad en el crecimiento de los protocormos debido a la heterogeneidad del hinchamiento de la semilla que se presentó en las etapas iniciales de la semilla.

126

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: “EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*”

2012

FIGURA Nº 16.1. Promedios generales de la semilla que presenta formación de protocormo en porcentaje por medios de cultivo a los 96 días desde la siembra, datos de (Tabla Nº 5.2)

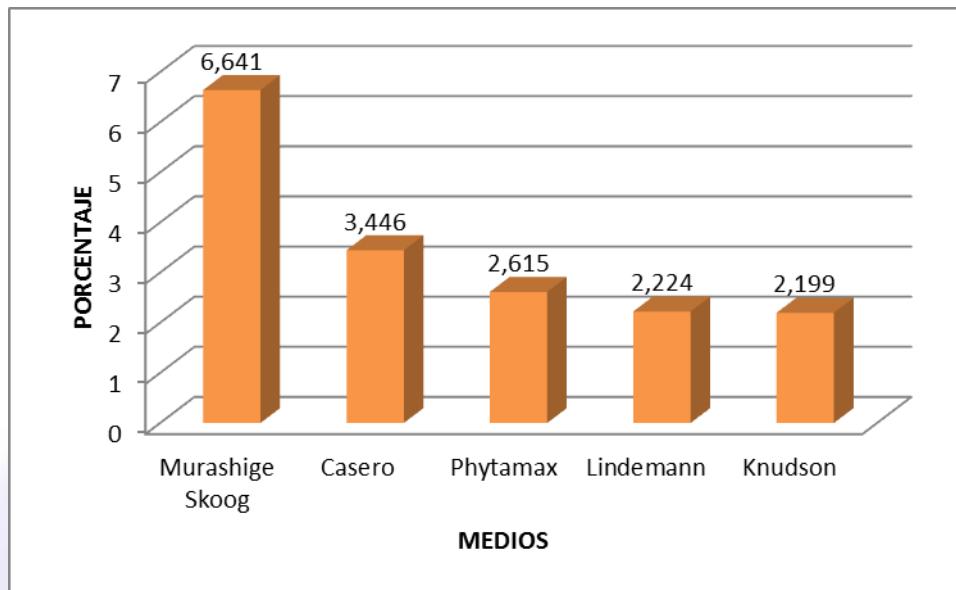


TABLA Nº 6. Toma de datos de protocormos que presentan primera brotación de hoja a los 136 días desde la siembra.

Tratamiento	IBA	BA	I			II			III		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3



T31	1	0						1
T32	1,5	0	1				1	1
T33	2	0				1		
T34	0	1						
T35	0	1,5						
T36	0	2						
T37	1	1						
T38	1,5	1,5						
T39	2	2						
T40	0	0	1	2			1	

Datos en número de hojas.

La toma de datos se realizó a los 136 días desde la siembra, se tomaron datos de los protocormos que presentaron brotación, únicamente se obtuvo datos de los tratamientos del medio Lindemann ya que fueron los únicos que presentaron brotes, los tratamientos de los medios Murashige Skoog, Knudson, Phytamax y Casero no desarrollaron brotes por lo cual no se tomaron en cuenta los datos en esta etapa de la investigación.

TABLA Nº 7. Análisis de costos por tratamiento.

Costos Variables			Costos totales					
IBA	BA	Costos	Phytamax (\$13,49*)	Knudson (\$13,51)	Murashige S (\$13,45*)	Lindemann (\$13,45*)	Casero (1,80*)	
1	0	0,005	13,495	13,515	13,455	13,455	1,495	
1,5	0	0,008	13,498	13,518	13,458	13,458	1,498	
2	0	0,011	13,501	13,521	13,461	13,461	1,501	
0	1	0,009	13,499	13,519	13,459	13,459	1,499	
0	1,5	0,014	13,504	13,524	13,464	13,464	1,504	
0	2	0,018	13,508	13,528	13,468	13,468	1,508	
1	1	0,015	13,505	13,525	13,465	13,465	1,505	
1,5	1,5	0,022	13,512	13,532	13,472	13,472	1,512	
2	2	0,029	13,519	13,539	13,479	13,479	1,519	
0	0	0,000	13,490	13,510	13,450	13,450	1,490	

Costos para la preparación de 1000 ml de medio de cultivo

*costos fijos (Anexo N. 8)

129

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera**Tema.:** "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012

De acuerdo al análisis de costos por tratamiento, se pudo observar que no hubo mayores diferencias de costos entre los tratamientos ya que estos varían con 3 centavos de dólar entre uno y otro, a excepción del medio casero los cuales tienen un costo promedio por tratamiento de 1,49 dólares existiendo una gran diferencia de este medio con relación a los otros medios entre los otros medios.

3.2. Discusión

Para la investigación se utilizó semilla de *Comparettia speciosa* la cual se encuentra en congelación desde el 25 de enero del 2008, la capsula fue obtenida de una planta de que se encuentra en el orquideario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. La semilla es parte del banco germoplásmico y tiene por código CCA 0194.

El efecto de los medios utilizados en la investigación (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) fue determinante para la germinación de las semillas



de *Comparettia speciosa*; se inició el proceso de hinchamiento de la semilla a los 53 días y se generó los mejores resultados con el medio Murashige Skoog al 35% con el 3,951 % de semilla hinchada ubicándose en el rango “a”, coincidiendo con lo que sugiere Knudson que el medio Murashige Skoog puede ser utilizado para el cultivo de diferentes especies, el segundo lugar está ocupado por el medio Casero con el 2,022% es un medio a base de agua de coco, banano y tomate, hay poca experiencia literaria acerca de este cultivo pero su uso se ha difundido mucho en los últimos años, se ubica en el rango “b”. En lo que respecta a tratamientos, generó mejores resultados el tratamiento T17 (Murashige, IBA 1 ppm, BA 1 ppm).

A los 67 días de la siembra de la semilla hubo un incremento en el porcentaje de semilla hinchada generándose los mejores resultados en lo que respecta a efecto de medios al medio Murashige con el 4,503% ubicándose en el rango “a”, en segundo lugar se encuentra el medio Casero con 2,508% ubicándose en el rango “b”. El



tratamiento que genero mejores resultados de porcentaje de semilla hinchada fue el tratamiento T17 (Murashige, IBA 1 ppm, BA 1 ppm). En esta etapa de la investigación se detectó el comienzo de cambio de color de las semillas sembradas.

A los 81 días desde la siembra de la semilla se tomó datos del porcentaje de semilla sembrada que presenta cambio de color a verde indicando esto que la semilla ya a germinado, dio mejores resultados en lo que respecta a efecto de medios al medio Murashige Skoog con el 5,879 % ubicándose en el rango “a”, en segundo lugar se encuentra el medio Casero con el 3,01% y se ubica en el rango “b”. Para efecto de tratamientos se genero mejores resultados de semilla verde con el tratamiento T17 (Murashige, IBA 1 ppm, BA 1 ppm). Se detectó perdida de la envoltura del embrión.

A los 96 días desde la siembra se evaluó el proceso formación de protocormo, en lo que respecta a efecto de medios se obtuvo mejores resultados con el medio Murashige con un 6,641% ubicándose en el rango “a”

seguido por el medio Casero con un 3,446% ubicándose en el rango “b. En lo que respecta a efecto de tratamientos se el tratamiento T17 (Murashige, IBA 1 ppm, BA 1 ppm) es el que mejor resultado genero.

No hubo mayores diferencias en los costos entre los medios Murashige Skoog, Phytamax, Lindemann y Knudson los cuales presentaron una diferencia promedio de 3 centavos de dólar, no así el medio casero que es el que más bajo costo de preparación genero existiendo una diferencia promedio de 1,49 dólares con respecto a los otros medios, pero este no tuvo buenos resultados en hinchamiento de semilla.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De la investigación realizada en siembra de semilla de *Comparettia speciosa* en tubos de ensayo, utilizando 5 diferentes medios de cultivo al 35% de concentración y diferentes dosis de BA e IBA, se obtuvo las siguientes conclusiones.

Conclusiones:

- A los 53 días desde la siembra se produjo el hinchamiento de la semilla de *Comparettia speciosa*, se generó el 4,512% de semilla hinchada con el tratamiento Murashige con IBA 1 ppm BA 1 ppm siendo este el mejor, en el efecto de medios fue Murashige Skoog el que generó 3,951% de semilla hinchada. A los 67 días desde la siembra el tratamiento Murashige Skoog IBA 0 ppm BA 1,5 ppm generó un 5,08% de semilla hinchada; a efecto en medios, Murashige Skoog dio 4,503% de semilla hinchada.
- A los 67 días desde la siembra se inició el cambio de color de las semillas sembradas. A los 81 días desde la siembra se evaluó el porcentaje de semilla verde y el tratamiento Murashige Skoog IBA 1 ppm BA 1 ppm dio 6,724% de semilla verde siendo el mejor, para efecto de medios Murashige Skoog generó 5,874% de semilla verde. A los 81

días desde la siembra se inició la pérdida de la envoltura del embrión.

- A los 96 días desde la siembra, se inició la formación de protocormos, el tratamiento Murashige Skoog IBA 1 ppm BA 1 ppm fue el que generó un 7,491% de formación de protocormo siendo este el de mejores resultados, para efecto de medios se generó un 6,641% en el medio Murashige Skoog.
- Para el efecto de hormonas (BA e IBA) en el ensayo de las semillas no hubo efectos ya que fueron significativamente iguales.
- Los tratamientos con el medio casero tuvo un costo de preparación promedio de 1,80 dólares siendo este el más barato frente a los otros medios de cultivo, el porcentaje de hinchamiento de semilla con este medio es del 2,508% a los 67 días desde la siembra y el porcentaje de formación de protocormo fue del 3,446%

- A los 136 días desde la siembra se detectó brote de hoja en los protocormos, en el tratamiento T32 con un brote y el tratamiento T40 con un brote.
- Los costos de preparación de los medios Murashige Skoog, Phytamax, Knudson y Lindemann no tuvieron diferencias en costos, hubo una diferencia promedio de 2 a 3 centavos entre los medios.
- El 4,503% de semilla hinchada, el 5,879% de semilla verde y el 6,641% de formación de protocormo, entre otras causas puede deberse al medio de cultivo o al tiempo que la semilla estuvo en ClO₂ al 1,5% por 3 minutos para la desinfección.

Recomendaciones:

- Utilizar el tratamiento Murashige Skoog, IBA 1 ppm, BA 1 ppm que generó 5,08% de hinchamiento de semilla, 6,724% de semilla verde y 7,491% formación de protocormo.
- Para llegar a desarrollo de hojas, utilizar tratamientos Lindemann, IBA 1,5 ppm, BA 0 ppm o el tratamiento Lindemann, IBA 0 ppm, BA 0 ppm, ya que solo los tratamientos llegaron a desarrollar hojas.
- No utilizar los tratamientos con los medio Knudson y Phytamax, tuvieron un porcentaje 1,563% y 1,862% de semilla hinchada respectivamente.
- Utilizar o probar nuevos medios de cultivos y tiempos de desinfección para la semilla de esta especie.
- En costos de tratamiento se recomienda utilizar el medio Murashige Skoog o los tratamientos T32 o

T40, los costos de reactivos químicamente puros presentan diferencias de 2 a 3 centavos de dólar.

RESUMEN

La presente investigación sobre “Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann, y Casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Comparettia speciosa*” se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca durante el año 2010 – 2011.

Con la finalidad de evaluar el porcentaje de germinación de las semillas de *Comparettia speciosa Rchb.f.* y la formación de protocormos determinando así el mejor medio de cultivo como también dosis de auxinas y citoquininas. Para la ejecución del mismo, se utilizó tubos de ensayo (unidades experimentales) en donde se colocó los diferentes medios de cultivo y las semillas de la

139

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: “EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*”

2012



orquídea. Debido a la dificultad que tiene las semillas de orquídeas para germinar en forma natural ya que cada especie de orquídeas tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar bajo condiciones *in vitro*, y de esta manera aportar conocimientos sobre la germinación de semillas y propagación *in vitro*.

El Diseño Experimental utilizado es un Diseño de Bloques completamente al Azar, donde se evaluó 50 tratamientos con 3 repeticiones y cada repetición tubo 3 tubos de ensayo, se realizó la prueba de significación de Tukey al 5% y los resultados se evaluaron en base al porcentaje de germinación y otros que se detectaron.

Conclusiones:

- A los 53 días desde la siembra, el tratamiento Murashige S. con IBA 1ppm, BA 1ppm genero un 4,512% de semilla hinchada. A los 67 días desde la siembra el tratamiento Murashige S. con IBA 0ppm, BA 1,5ppm genero 3,951% de semilla hinchada. El medio Murashige S. generó un
- A los 67 días desde la siembra inicio cambio de color. A los 81 desde la siembra el tratamiento Murashige IBA 1 ppm BA 1 ppm genero 6,724% de semilla verde. El medio Murashige S. genero 6,724% de semilla verde. A los 81 días desde la siembra inicio perdida de envoltura del embrión.
- A los 96 días desde la siembra, se inició la formación de protocormos, el tratamiento Murashige Skoog IBA 1 ppm BA 1 ppm fue el que generó un 7,491% de formación de protocormo siendo este el de mejores resultados, para efecto

de medios se generó un 6,641% en el medio Murashige Skoog.

- Para el efecto de hormonas (BA e IBA) en el ensayo de las semillas no hubo efectos ya que fueron significativamente iguales.
- Los tratamientos con el medio casero tuvo un costo de preparación promedio de 1,80 dólares siendo este el más barato frente a los otros medios de cultivo, el porcentaje de hinchamiento de semilla con este medio es del 2,508% a los 67 días desde la siembra y el porcentaje de formación de protocormo fue del 3,446%
- A los 136 días desde la siembra se detectó brote de hoja en los protocormos, en el tratamiento T32 con un brote y el tratamiento T40 con un brote.
- Los costos de preparación de los medios Murashige Skoog, Phytamax, Knudson y Lindemann no tuvieron diferencias en costos, hubo una diferencia promedio de 2 a 3 centavos entre los medios.

- El 4,503% de semilla hinchada, el 5,879% de semilla verde y el 6,641% de formación de protocormo, entre otras causas puede deberse al medio de cultivo o al tiempo que la semilla estuvo en ClONa al 1,5% por 3 minutos para la desinfección.

BIBLIOGRAFIA

- American Orchids Society. (2003). Complete Guide to Orchids. Canada: Meredith. p 66-67
- Arditti, J.; Ernst, R. 1993. Micropropagation of orchids. New York. Wiley.
- Bhojwani, S.; Razdan, M. 1996. Plant Tissue Culture. Ámsterdam. Elsevier Science.
- Cabrera, A. 2003. Propagación de Orquídeas (en línea). Guatemala. Consultado el 22 de junio del 2011. Disponible
http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2045.pdf
- Dodson, C. 2004. Native Ecuadorian orchids. Ecuador. Dodson Trust.
- Docencia izt. 2009. Reguladores de crecimiento (en línea). PAIS. Consultado el 01 de mayo del 2011. Disponible
http://docencia.itz.uam.mx/elbm/233248/material_adicional/regscrecim.pdf

144

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012

- Enciclopedia US. 2004. Latencia de la semilla (en línea). PAIS. Consultado el 1 de abril del 2011.
Disponible
http://enciclopedia.us.es/index.php/Latencia_de_la_sevilla
- García, R.; Estrelles, E. 2002. La evolución de la simbiosis micorrítica (en línea). España. Consultado el 6 de junio del 2011.
Disponible
<http://www.euita.upv.es/variros/bioLOGIA/Temas%20PDF/La%20evoluci%C3%B3n%20de%20symbiosis%20micorr%C3%A3cica.pdf>
- Grupo Orquideófilo Canario. 2004. Breve Historia de propagación de las orquídeas (en línea). España. Consultado el 12 de diciembre del 2010. Disponible
<http://www.lanzarote.net/ogro/gocarticulobrevehistoriapropagacion.htm>
- Interceme Technologies. IBA (en línea). Consultado el 25 de octubre del 2009.

- Iriondo, J. 2001. INIA. PAIS. Consultado el 22 de junio del 2011. Disponible http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf
- López, V. 2008. Germinación In Vitro de semilla de *Encyclia adenocaula* (en línea). Argentina. Consultado el 22 de diciembre del 2010. Disponible <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sciarttext&pid=S185156572008000100017&Ing=es&nrm=iso>
- McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación In Vitro de orquídeas (en línea). Ecuador. Consultado el 22 de octubre del 2011. Disponible [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf)
- Mendieta, M. 2002. Propagación de orquídeas (en línea). Costa Rica. Consultado el 01 de abril del 2011. Disponible <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/98051.pdf>
- Mroginski, L., Rubinstein, C., Echenique, V. 2004 Biotecnología y mejoramiento vegetal. Argentina. INTA
- Navarro, G. 2000. Química Agrícola. España. Mundiprensa.

- Pérez, J. 2006. Cultivo In Vitro de plantas y sus aplicaciones en la agricultura. La laguna. Arte y comunicación Visul S.L.
- Pierik, R. 1990. In Vitro Culture of higher plants. Holanda. Kluwer Academic Publishers. P 149-152
- Portilla, J., Diaz, A., & Salazar, L. Manual de cultivo de orquideas. S.C.O.
- Ramirez, D. (2009). Le chateau orchids by Dolinda Ramirez. Recuperado el 29 de 11 de 2011, de www.lechateauorchids.blogspot.com/2009/06/ciclo-de-vida-de-las.html.
- Mroginski, L., Rubinstein, C., & Echenique, V. (2004). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Argentina: INTA.
- Roca, W.; Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Colombia. CIAT N 151.
- Rojas, M.; Ramírez, H. 2000. Control hormonal del desarrollo de las plantas. México. Limusa Noriega.

- Seaton, P.; Ramsay, M. 2009. Cultivo de orquídeas por semilla. Richmond. Kew Publishing. p 65
- Sevillano, J. 2007. In Vitro. España. Consultado del 20 de junio del 2011. Disponible <http://www.lazarote.net/ogro/gocarticuloinvitrojmsv.htm>
- SIGMA. 1990. Media culture. USA. Sigma. p 31, 76, 77
- Weaver, R. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. México. Trillas S.A
- Watson, L. 1992. The families of flowering plants: description, Illustration, Identifycation.
- Zelenko, H.; Bermudez, P. 2009. Orchids species of Perú. Ecuador. ZIA publications.
- Zelenko, H.; Chase, M. 2002. Orchids the pictorial encyclopedia of oncidium. Ecuador. ZIA publications.

ANEXOS

ANEXO Nº 1. Elementos utilizados por cada medio de cultivo utilizados en la Tesis.

(Concentraciones en mg/l)

SALES INORGANICAS	P 6793		K 4003		M 8280		L 0270	
	100%	35%	100%	35%	100%	35%	100%	35%
Clorhidrato de aluminio							0.05611	0.0196385
Nitrato de amonio	825.0	288.75						
Sulfato de amonio			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 de calcio	166.0	58.1			332.2	116.27		
Nitrato de calcio 4H ₂ O			694.4	243.04			347.2	121.52
Clorhidrato de cobalto	0.0125	0.004375			0.025	0.00875		
Sulfato cúprico 5H ₂ O	0.0125	0.004375	0.0624	0.02184	0.025	0.00875	0.019	0.00665
Acid, Na, 2H ₂ O (EDTA)	37.24	13.034			37.3	13.055		
Citrato férrico							4.4	1.54
Sulfato ferrosos 7H ₂ O	27.85	97.475	25.0	8.75	27.8	9.73		
Magnesium sulfate	90.35	316.225	122.125	427.437	180.7	63.245	58.62	20.517
Sulfato de magnesio	8.45	29.575	5.682	1.9889	16.9	5.915	0.0515	0.018025
Trióxido de molibdeno			0.016	0.0056				
Molybdicacid (sodium)	0.125	0.04375			0.25	0.0875		
Clorhidrato de níquel							0.03116	0.010906
Clorhidrato de potasio							1050.0	367.5
Potassium Iodide	0.415	0.14525			0.83	0.2905	0.099	0.03465
Nitrato de potasio	950.0	332.5			1900	665		
Fosfato de potasio	85.0	29.75	250.0	87.5	170	59.5	135.0	47.25
Nitrato de sodio					1751	612.85		
Sulfato de zinc 7H ₂ O	5.3	1.855	0.331	0.1158	8.6	3.01	0.565	0.19775



ORGANICOS							
Agar		6,5		6,5		6,5	
MES (free acid)	1000.0	1000.0		1000.0		1000.0	
myo-inositol		100		100		100	
Nicotinic acid (free acid)		0,5		0,5		0,5	
Peptone	2000.0	2000.0		2000.0		2000.0	
Pyridoxine HCl		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

Nota: La concentración de trabajo para la germinación es del 35% en los medios de cultivo, a todos los medios de cultivo se les adiciono 6,5 g de agar, 0,5 mg de mioinositol, 0,5 mg de Acido nicotínico, 0,5 mg de Piridoxina y 1 mg de Tiamina.

ANEXO Nº 2. Distribución de los tratamientos en el laboratorio

TRATAMIENTO	MEDIOS	DOSIS EN ppm	
		IBA	BA
T1	Phvtamax	1	0
T2	Phvtamax	1.5	0
T3	Phvtamax	2	0
T4	Phvtamax	0	1
T5	Phvtamax	0	1.5
T6	Phvtamax	0	2
T7	Phvtamax	1	1
T8	Phvtamax	1.5	1.5
T9	Phvtamax	2	2
T10	Phvtamax	0	0
T11	Murashige	1	0
T12	Murashige	1.5	0
T13	Murashige	2	0
T14	Murashige	0	1
T15	Murashige	0	1.5

150

Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa Rchb.f.*"

2012



T16	Murashige	0	2
T17	Murashige	1	1
T18	Murashige	1.5	1.5
T19	Murashige	2	2
T20	Murashige	0	0
T21	Knudson	1	0
T22	Knudson	1.5	0
T23	Knudson	2	0
T24	Knudson	0	1
T25	Knudson	0	1.5
T26	Knudson	0	2
T27	Knudson	1	1
T28	Knudson	1.5	1.5
T29	Knudson	2	2
T30	Knudson	0	0
T31	Lindemann	1	0
T32	Lindemann	1.5	0
T33	Lindemann	2	0
T34	Lindemann	0	1
T35	Lindemann	0	1.5
T36	Lindemann	0	2
T37	Lindemann	1	1
T38	Lindemann	1.5	1.5
T39	Lindemann	2	2
T40	Lindemann	0	0
T41	Casero	1	0
T42	Casero	1.5	0
T43	Casero	2	0
T44	Casero	0	1
T45	Casero	0	1.5
T46	Casero	0	2
T47	Casero	1	1
T48	Casero	1.5	1.5
T49	Casero	2	2
T50	Casero	0	0

ANEXO Nº 3. Datos en porcentajes de semilla hinchada obtenidos el (09-11-2010) a 53 días desde la siembra y datos transformados.

Datos Originales					
	I	II	III	E	X
T1	5,00	9,68	6,67	21,34	7,11

Datos Transformados					
	I	II	III	E	X
T1	2,35	3,19	2,68	8,212	2,737



T2	6,67	5,00	1,82	13,48	4,49
T3	8,89	7,89	3,33	20,12	6,71
T4	4,00	1,74	9,52	15,26	5,09
T5	12,86	20,00	4,00	36,86	12,29
T6	10,00	7,69	2,67	20,36	6,79
T7	2,86	11,43	5,00	19,29	6,43
T8	4,00	2,50	15,00	21,50	7,17
T9	5,71	13,33	2,50	21,55	7,18
T10	12,50	1,43	5,45	19,38	6,46
T11	52,00	34,29	22,11	108,39	36,13
T12	46,40	40,00	54,55	140,95	46,98
T13	37,33	49,41	60,00	146,75	48,92
T14	56,67	17,14	12,00	85,81	28,60
T15	36,67	62,00	56,84	155,51	51,84
T16	72,00	30,00	45,00	147,00	49,00
T17	52,00	60,00	55,00	167,00	55,67
T18	40,00	40,00	66,67	146,67	48,89
T19	33,85	29,23	52,00	115,08	38,36
T20	35,56	54,29	44,29	134,13	44,71
T21	3,85	8,00	4,00	15,85	5,28
T22	10,00	1,74	5,00	16,74	5,58
T23	9,09	3,33	6,67	19,09	6,36
T24	1,74	6,45	4,00	12,19	4,06
T25	2,22	5,71	4,00	11,94	3,98
T26	2,86	1,67	3,33	7,86	2,62
T27	4,21	5,00	6,15	15,36	5,12
T28	2,86	3,33	3,33	9,52	3,17
T29	10,00	1,43	5,71	17,14	5,71
T30	2,86	5,71	3,33	11,90	3,97
T31	2,11	2,86	6,67	11,63	3,88
T32	4,00	2,50	1,43	7,93	2,64
T33	6,67	4,00	7,50	18,17	6,06
T34	16,00	5,71	2,67	24,38	8,13
T35	20,00	1,38	5,33	26,71	8,90
T36	6,15	1,43	4,44	12,03	4,01
T37	2,86	0,00	2,86	5,71	1,90
T38	20,00	2,86	2,22	25,08	8,36
T39	1,54	0,87	4,00	6,41	2,14
T40	10,67	2,67	6,67	20,00	6,67
T41	4,44	10,00	10,00	24,44	8,15
T42	5,71	3,08	8,89	17,68	5,89
T43	11,43	3,85	21,62	36,90	12,30
T44	8,00	4,44	32,73	45,17	15,06
T45	10,00	13,33	16,67	40,00	13,33
T46	3,64	10,00	2,50	16,14	5,38
T47	16,00	22,22	13,79	52,02	17,34
T48	29,09	16,00	12,00	57,09	19,03
T49	3,48	13,33	5,00	21,81	7,27

T2	2,68	2,35	1,52	6,545	2,182
T3	3,06	2,9	1,96	7,919	2,640
T4	2,12	1,5	3,17	6,783	2,261
T5	3,66	4,53	2,12	10,304	3,435
T6	3,24	2,86	1,78	7,882	2,627
T7	1,83	3,45	2,35	7,631	2,544
T8	2,12	1,73	3,94	7,790	2,597
T9	2,49	3,72	1,73	7,944	2,648
T10	3,61	1,39	2,44	7,435	2,478
T11	7,25	5,9	4,75	17,898	5,966
T12	6,85	6,36	7,42	20,631	6,877
T13	6,15	7,07	7,78	20,994	6,998
T14	7,56	4,2	3,54	15,297	5,099
T15	6,1	7,91	7,57	21,574	7,191
T16	8,52	5,52	6,75	20,783	6,928
T17	7,25	7,78	7,45	22,474	7,491
T18	6,36	6,36	8,2	20,924	6,975
T19	5,86	5,45	7,25	18,560	6,187
T20	6,01	7,4	6,69	20,099	6,700
T21	2,09	2,92	2,12	7,121	2,374
T22	3,24	1,5	2,35	7,081	2,360
T23	3,1	1,96	2,68	7,732	2,577
T24	1,5	2,64	2,12	6,254	2,085
T25	1,65	2,49	2,12	6,264	2,088
T26	1,83	1,47	1,96	5,262	1,754
T27	2,17	2,35	2,58	7,095	2,365
T28	1,83	1,96	1,96	5,748	1,916
T29	3,24	1,39	2,49	7,122	2,374
T30	1,83	2,49	1,96	6,283	2,094
T31	1,61	1,83	2,68	6,123	2,041
T32	2,12	1,73	1,39	5,242	1,747
T33	2,68	2,12	2,83	7,626	2,542
T34	4,06	2,49	1,78	8,335	2,778
T35	4,53	1,37	2,42	8,314	2,771
T36	2,58	1,39	2,22	6,193	2,064
T37	1,83	0,71	1,83	4,371	1,457
T38	4,53	1,83	1,65	8,010	2,670
T39	1,43	1,17	2,12	4,719	1,573
T40	3,34	1,78	2,68	7,799	2,600
T41	2,22	3,24	3,24	8,704	2,901
T42	2,49	1,89	3,06	7,448	2,483
T43	3,45	2,09	4,7	10,242	3,414
T44	2,92	2,22	5,76	10,903	3,634
T45	3,24	3,72	4,14	11,102	3,701
T46	2,03	3,24	1,73	7,006	2,335
T47	4,06	4,77	3,78	12,610	4,203
T48	5,44	4,06	3,54	13,038	4,346
T49	2	3,72	2,35	8,059	2,686



T50	26,67	20,00	20,00	66,67	22,22
-----	-------	-------	-------	-------	-------

T50	5,21	4,53	4,53	14,268	4,756
-----	------	------	------	--------	-------

ANEXO Nº 4. Datos en porcentajes de semilla hinchada obtenidos el (23-11-2010) a 67 días desde la siembra y datos transformados.

Datos originales					
	I	II	III	E	X
T1	3,75	6,45	5,00	15,20	5,07
T2	6,67	2,50	0,91	10,08	3,36
T3	6,67	6,58	1,67	14,91	4,97
T4	2,00	0,87	4,76	7,63	2,54
T5	4,29	14,0	3,00	21,29	7,10
T6	7,50	3,85	2,00	13,35	4,45
T7	1,43	8,57	4,17	14,17	4,72
T8	2,00	1,67	12,5	16,17	5,39
T9	4,29	10,0	1,25	15,54	5,18
T1	8,75	0,71	3,64	13,10	4,37
T1	34,6	21,4	18,6	74,78	24,9
T1	39,2	28,8	52,7	120,8	40,2
T1	28,0	40,5	54,3	122,9	40,9
T1	47,5	12,8	8,00	68,36	22,7
T1	25,0	56,0	47,3	128,3	42,7
T1	58,0	20,0	30,0	108,0	36,0
T1	45,0	45,0	44,1	134,1	44,7
T1	28,0	31,4	48,3	107,7	35,9
T1	26,9	18,4	49,0	94,38	31,4
T2	23,3	46,4	35,7	105,4	35,1
T2	1,92	4,00	2,00	7,92	2,64
T2	6,67	1,30	2,50	10,47	3,49
T2	4,55	1,67	3,33	9,55	3,18
T2	0,87	3,23	2,00	6,10	2,03
T2	1,11	4,29	2,00	7,40	2,47
T2	1,43	0,83	1,67	3,93	1,31
T2	3,16	3,75	3,85	10,75	3,58
T2	1,43	2,50	0,00	3,93	1,31
T2	5,00	0,71	2,86	8,57	2,86
T3	1,43	2,86	1,67	5,95	1,98
T3	1,58	2,14	4,67	8,39	2,80
T3	3,00	1,25	0,71	4,96	1,65
T3	4,44	3,00	5,00	12,44	4,15
T3	10,0	4,29	2,00	16,29	5,43
T3	10,0	1,03	3,33	14,37	4,79

Datos Transformados					
	I	II	III	E	X
T1	2,06	2,63	2,345	7,044	2,34
T2	2,67	1,73	1,187	5,596	1,86
T3	2,67	2,66	1,472	6,810	2,27
T4	1,58	1,17	2,294	5,045	1,68
T5	2,18	3,80	1,871	7,867	2,62
T6	2,82	2,08	1,581	6,494	2,16
T7	1,38	3,01	2,16	6,561	2,18
T8	1,58	1,47	3,606	6,659	2,22
T9	2,18	3,24	1,323	6,751	2,25
T1	3,04	1,10	2,034	6,177	2,05
T1	5,93	4,68	4,38	14,99	4,99
T1	6,30	5,42	7,296	19,01	6,33
T1	5,33	6,41	7,408	19,15	6,38
T1	6,92	3,65	2,915	13,49	4,49
T1	5,05	7,51	6,919	19,48	6,49
T1	7,64	4,52	5,523	17,70	5,90
T1	6,74	6,74	6,683	20,17	6,72
T1	5,33	5,65	6,998	17,98	5,99
T1	5,23	4,35	7,036	16,62	5,54
T2	4,88	6,85	6,018	17,75	5,91
T2	1,55	2,12	1,581	5,259	1,75
T2	2,67	1,34	1,732	5,752	1,91
T2	2,24	1,47	1,958	5,676	1,89
T2	1,17	1,93	1,581	4,681	1,56
T2	1,26	2,18	1,581	5,038	1,67
T2	1,38	1,15	1,472	4,016	1,33
T2	1,91	2,06	2,085	6,060	2,02
T2	1,38	1,73	0,707	3,828	1,27
T2	2,34	1,10	1,832	5,279	1,76
T3	1,38	1,83	1,472	4,693	1,56
T3	1,44	1,62	2,273	5,341	1,78
T3	1,87	1,32	1,102	4,296	1,43
T3	2,22	1,87	2,345	6,440	2,14
T3	3,24	2,18	1,581	7,009	2,33
T3	3,24	1,23	1,958	6,437	2,14



T3	5,38	1,07	3,33	9,79	3,26
T3	1,43	0,00	1,43	2,86	0,95
T3	10,0	1,43	1,11	12,54	4,18
T3	0,77	0,43	3,00	4,20	1,40
T4	7,33	2,00	5,00	14,33	4,78
T4	2,22	7,50	10,0	19,72	6,57
T4	2,86	1,54	6,67	11,06	3,69
T4	8,57	3,85	16,2	28,63	9,54
T4	6,00	4,44	21,8	32,26	10,7
T4	10,0	11,1	16,6	37,78	12,5
T4	3,64	5,00	1,25	9,89	3,30
T4	14,0	16,6	10,3	41,01	13,6
T4	21,8	12,0	6,00	39,82	13,2
T4	2,61	10,0	5,00	17,61	5,87
T5	20,0	12,5	15,0	47,50	15,8

T3	2,42	1,25	1,958	5,638	1,87
T3	1,38	0,70	1,389	3,485	1,16
T3	3,24	1,38	1,269	5,898	1,96
T3	1,12	0,96	1,871	3,965	1,32
T4	2,79	1,58	2,345	6,725	2,24
T4	1,65	2,82	3,240	7,718	2,57
T4	1,83	1,42	2,677	5,937	1,97
T4	3,01	2,08	4,089	9,186	3,06
T4	2,55	2,22	4,724	9,498	3,16
T4	3,24	3,40	4,143	10,79	3,59
T4	2,03	2,34	1,323	5,702	1,90
T4	3,80	4,14	3,293	11,24	3,74
T4	4,72	3,53	2,550	10,81	3,60
T4	1,76	3,24	2,345	7,348	2,44
T5	4,52	3,60	3,937	12,07	4,02

ANEXO Nº 5. Datos en porcentajes de semilla verde obtenidos el (07-12-2010) a 81 días desde la siembra y datos transformados.

Datos Originales					
	I	II	III	E	X
T1	2,50	4,84	3,33	10,6	3,56
T2	3,33	2,50	0,91	6,74	2,25
T3	4,44	3,95	1,67	10,0	3,35
T4	2,00	0,87	4,76	7,63	2,54
T5	2,86	6,00	2,00	10,8	3,62
T6	5,00	1,92	1,33	8,26	2,75
T7	1,43	5,71	3,33	10,4	3,49
T8	2,00	1,25	7,50	10,7	3,58
T9	2,86	6,67	1,25	10,7	3,59
T1	6,25	0,71	2,73	9,69	3,23
T1	21,3	14,2	10,7	46,4	15,4
T1	23,2	15,5	22,7	61,4	20,4
T1	18,6	24,1	23,7	66,5	22,1
T1	22,5	7,14	4,00	33,6	11,2
T1	18,3	30,0	28,4	76,7	25,5
T1	30,0	10,0	22,5	62,5	20,8
T1	24,0	25,0	25,8	74,8	24,9
T1	18,6	17,1	33,3	69,1	23,0
T1	16,9	14,6	24,0	55,5	18,5
T2	17,7	26,4	22,1	66,3	22,1
T2	1,92	4,00	2,00	7,92	2,64

Datos Transformados					
	I	II	III	E	X
T1	1,73	2,31	1,95	6,001	2,00
T2	1,95	1,73	1,18	4,877	1,62
T3	2,22	2,10	1,47	5,805	1,93
T4	1,58	1,17	2,29	5,045	1,68
T5	1,83	2,55	1,58	5,963	1,98
T6	2,34	1,55	1,35	5,256	1,75
T7	1,38	2,49	1,95	5,840	1,94
T8	1,58	1,23	2,82	5,641	1,88
T9	1,83	2,67	1,32	5,832	1,94
T1	2,59	1,10	1,79	5,496	1,83
T1	4,67	3,84	3,36	11,87	3,95
T1	4,86	4,00	4,81	13,69	4,56
T1	4,37	4,96	4,92	14,26	4,75
T1	4,76	2,76	2,12	9,655	3,21
T1	4,34	5,52	5,37	15,24	5,08
T1	5,52	3,24	4,79	13,55	4,52
T1	4,95	5,05	5,13	15,13	5,04
T1	4,37	4,20	5,81	14,39	4,79
T1	4,17	3,88	4,95	13,01	4,33
T2	4,27	5,18	4,75	14,22	4,74
T2	1,55	2,12	1,58	5,259	1,75



T2	3,33	0,43	2,50	6,27	2,09
T2	4,55	1,67	3,33	9,55	3,18
T2	0,87	3,23	2,00	6,10	2,03
T2	1,11	1,43	2,00	4,54	1,51
T2	1,43	0,83	1,67	3,93	1,31
T2	2,11	1,25	3,08	6,43	2,14
T2	1,43	1,67	0,00	3,10	1,03
T2	5,00	0,71	2,86	8,57	2,86
T3	1,43	2,86	1,67	5,95	1,98
T3	1,05	3,85	2,67	7,57	2,52
T3	2,00	0,00	0,71	2,71	0,90
T3	2,78	4,35	2,50	9,63	3,21
T3	6,00	3,08	1,33	10,4	3,47
T3	10,0	1,11	2,00	13,1	4,37
T3	3,85	1,10	2,22	7,17	2,39
T3	1,43	0,00	1,43	2,86	0,95
T3	10,0	0,50	1,11	11,6	3,87
T3	0,77	0,56	2,00	3,32	1,11
T4	4,67	2,86	3,33	10,8	3,62
T4	2,22	7,50	7,50	17,2	5,74
T4	1,43	0,00	4,44	5,87	1,96
T4	5,71	1,92	13,5	21,1	7,05
T4	6,00	2,22	16,3	24,5	8,20
T4	5,00	8,89	13,3	27,2	9,07
T4	1,82	5,00	1,25	8,07	2,69
T4	10,0	11,1	10,3	31,4	10,4
T4	18,1	8,00	2,00	28,1	9,39
T4	2,61	6,67	2,50	11,7	3,93
T5	6,67	5,00	10,0	21,6	7,22

T2	1,95	0,96	1,73	4,657	1,55
T2	2,24	1,47	1,95	5,676	1,89
T2	1,17	1,93	1,58	4,681	1,56
T2	1,26	1,38	1,58	4,239	1,41
T2	1,38	1,15	1,47	4,016	1,33
T2	1,61	1,32	1,89	4,828	1,60
T2	1,38	1,47	0,70	3,568	1,18
T2	2,34	1,10	1,83	5,279	1,76
T3	1,38	1,83	1,47	4,693	1,56
T3	1,24	2,08	1,78	5,113	1,70
T3	1,58	0,70	1,10	3,390	1,13
T3	1,81	2,20	1,73	5,744	1,91
T3	2,55	1,89	1,35	5,795	1,93
T3	3,24	1,26	1,58	6,090	2,03
T3	2,08	1,26	1,65	4,999	1,66
T3	1,38	0,70	1,38	3,485	1,16
T3	3,24	1,00	1,26	5,509	1,83
T3	1,12	1,02	1,58	3,735	1,24
T4	2,27	1,83	1,95	6,063	2,02
T4	1,65	2,82	2,82	7,306	2,43
T4	1,38	0,70	2,22	4,320	1,44
T4	2,49	1,55	3,74	7,793	2,59
T4	2,55	1,65	4,10	8,307	2,76
T4	2,34	3,06	3,71	9,128	3,04
T4	1,52	2,34	1,32	5,191	1,73
T4	2,24	3,40	3,29	8,941	2,98
T4	4,32	2,91	1,58	8,818	2,93
T4	1,76	2,67	1,73	6,172	2,05
T5	2,67	2,34	3,24	8,262	2,75

ANEXO N° 6. Datos en porcentajes de formación de protocormos obtenidos el (22-12-2010) a 96 días desde la siembra y datos transformados.

Datos Originales					
	I	II	III	E	X
T1	1,25	3,23	1,67	6,14	2,05
T2	3,33	2,50	0,91	6,74	2,25
T3	2,22	2,63	1,67	6,52	2,17
T4	2,00	0,87	4,76	7,63	2,54
T5	1,43	6,00	1,00	8,43	2,81
T6	2,50	1,92	1,33	5,76	1,92
T7	1,43	2,86	1,67	5,95	1,98

Datos Transformados					
	I	II	III	E	X
T1	1,32	1,93	1,47	4,727	1,57
T2	1,95	1,73	1,18	4,877	1,62
T3	1,65	1,77	1,47	4,892	1,63
T4	1,58	1,17	2,29	5,045	1,68
T5	1,38	2,55	1,22	5,163	1,72
T6	1,73	1,55	1,35	4,643	1,54
T7	1,38	1,83	1,47	4,693	1,56



T8	2.00	0.83	2.50	5.33	1.78
T9	1.43	3.33	1.25	6.01	2.00
T1	3.75	0.71	1.82	6.28	2.09
T1	16.6	8.57	8.68	33.9	11.3
T1	19.2	11.1	18.1	48.4	16.1
T1	10.6	18.8	21.2	50.7	16.9
T1	15.8	7.14	4.00	26.9	8.99
T1	11.6	24.0	23.1	58.8	19.6
T1	20.0	10.0	20.0	50.0	16.6
T1	18.0	20.0	21.6	59.6	19.8
T1	12.0	15.0	18.3	45.3	15.1
T1	13.0	10.7	17.0	40.8	13.6
T2	14.4	20.0	17.8	52.3	17.4
T2	1.92	0.00	0.00	1.92	0.64
T2	1.67	0.00	0.00	1.67	0.56
T2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2	1.05	0.00	2.31	3.36	1.12
T2	0.00	0.83	0.00	0.83	0.28
T2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T3	0.00	0.00	1.67	1.67	0.56
T3	0.53	0.71	1.54	2.78	0.93
T3	1.00	0.00	0.71	1.71	0.57
T3	2.00	1.00	1.25	4.25	1.42
T3	4.00	1.43	0.67	6.10	2.03
T3	10.0	0.34	1.33	11.6	3.89
T3	2.31	0.36	1.11	3.78	1.26
T3	1.43	0.00	1.43	2.86	0.95
T3	10.0	1.43	1.11	12.5	4.18
T3	0.77	0.43	1.00	2.20	0.73
T4	3.33	0.67	1.67	5.67	1.89
T4	0.00	5.00	6.00	11.0	3.67
T4	1.43	0.00	2.22	3.65	1.22
T4	2.86	1.92	10.8	15.5	5.20
T4	4.00	2.22	12.7	18.9	6.32
T4	5.00	6.67	10.0	21.6	7.22
T4	1.82	0.00	1.25	3.07	1.02
T4	6.00	5.56	6.90	18.4	6.15
T4	10.9	0.00	2.00	12.9	4.30
T4	1.74	3.33	2.50	7.57	2.52
T5	6.67	2.50	5.00	14.1	4.72

T8	1.58	1.15	1.73	4.468	1.48
T9	1.38	1.95	1.32	4.669	1.55
T1	2.06	1.10	1.52	4.686	1.56
T1	4.14	3.01	3.03	10.18	3.39
T1	4.43	3.40	4.32	12.16	4.05
T1	3.34	4.39	4.66	12.40	4.13
T1	4.04	2.76	2.12	8.927	2.97
T1	3.48	4.95	4.86	13.30	4.43
T1	4.52	3.24	4.52	12.29	4.09
T1	4.30	4.52	4.70	13.53	4.51
T1	3.53	3.93	4.34	11.81	3.93
T1	3.68	3.35	4.18	11.22	3.74
T2	3.86	4.52	4.28	12.67	4.22
T2	1.55	0.70	0.70	2.971	0.99
T2	1.47	0.70	0.70	2.886	0.96
T2	0.70	0.70	0.70	2.121	0.70
T2	0.70	0.70	0.70	2.121	0.70
T2	0.70	0.70	0.70	2.121	0.70
T2	0.70	0.70	0.70	2.121	0.70
T2	1.05	0.70	1.67	3.433	1.14
T2	0.70	1.15	0.70	2.569	0.85
T2	0.70	0.70	0.70	2.121	0.70
T3	0.70	0.70	1.47	2.886	0.96
T3	1.01	1.10	1.42	3.543	1.18
T3	1.22	0.70	1.10	3.034	1.01
T3	1.58	1.22	1.32	4.129	1.37
T3	2.12	1.38	1.08	4.590	1.53
T3	3.24	0.91	1.35	5.513	1.83
T3	1.67	0.92	1.26	3.871	1.29
T3	1.38	0.70	1.38	3.485	1.16
T3	3.24	1.38	1.26	5.898	1.96
T3	1.12	0.69	1.22	3.049	1.01
T4	1.95	1.08	1.47	4.510	1.50
T4	0.70	2.34	2.55	5.602	1.86
T4	1.38	0.70	1.65	3.746	1.24
T4	1.83	1.55	3.36	6.752	2.25
T4	2.12	1.65	3.63	7.408	2.46
T4	2.34	2.67	3.24	8.262	2.75
T4	1.52	0.70	1.32	3.553	1.18
T4	2.55	2.46	2.72	7.731	2.57
T4	3.37	0.70	1.58	5.666	1.88
T4	1.46	1.95	1.73	5.159	1.72
T5	2.67	1.73	2.34	6.754	2.25



ANEXO Nº 7. Prueba de Tukey al 5% para tratamientos con semilla hinchada a los 53 días. Datos promedio del porcentaje transformado a $\sqrt{x}+0,5$.

#	Tratamientos			X	Rangos						
	Medio	IBA	BA								
T 17	Murashige	1	1	4.512	a						
T 15	Murashige	0	1,5	4.434	a	b					
T 20	Murashige	0	0	4.226	a	b					
T 13	Murashige	2	0	4.134	a	b	c				
T 16	Murashige	0	2	4.099	a	b	c				
T 12	Murashige	1,5	0	4.056	a	b	c				
T 18	Murashige	1,5	1,5	3.938	a	b	c				
T 19	Murashige	2	2	3.742	a	b	c	d			
T 11	Murashige	1	0	3.395	a	b	c	d	e	f	
T 14	Murashige	0	1	2.976	a	b	c	d	e	f	a
T 45	Casero	0	1,5	2.754	a	b	c	d	e	f	a
T 47	Casero	1	1	2.577	a	b	c	d	e	f	a
T 44	Casero	0	1	2.47	b	c	d	e	f	a	h
T 50	Casero	0	0	2.252	c	d	e	f	g	a	h
T 43	Casero	2	0	2.251	c	d	e	f	g	a	h
T 38	Lindemann	1,5	1,5	1.966	d	e	f	g	a	h	
T 48	Casero	1,5	1,5	1.889	d	e	f	g	a	h	
T 41	Casero	1	0	1.868	d	e	f	g	a	h	
T 35	Lindemann	0	1,5	1.838	d	e	f	g	a	h	
T 49	Casero	2	2	1.729	d	e	f	g	a	h	
T 5	Phytamax	0	1,5	1.721	d	e	f	g	a	h	
T 4	Phytamax	0	1	1.682	d	e	f	g	a	h	
T 3	Phytamax	2	0	1.631	d	e	f	g	a	h	
T 2	Phytamax	1,5	0	1.626	d	e	f	g	a	h	
T 1	Phytamax	1	0	1.576	d	e	f	g	a	h	
T 7	Phytamax	1	1	1.564	d	e	f	g	a	h	
T 10	Phytamax	0	0	1.562	d	e	f	g	a	h	
T 9	Phytamax	2	2	1.557	d	e	f	g	a	h	
T 6	Phytamax	0	2	1.548	d	e	f	g	a	h	
T 34	Lindemann	0	1	1.53	d	e	f	g	a	h	
T 40	Lindemann	0	0	1.503	d	e	f	g	a	h	
T 8	Phytamax	1,5	1,5	1.489	d	e	f	g	a	h	
T 33	Lindemann	2	0	1.376	d	e	f	g	a	h	
T 36	Lindemann	0	2	1.29	d	e	f	g	a	h	
T 42	Casero	1,5	0	1.249	d	e	f	g	a	h	
T 27	Knudson	1	1	1.21	d	e	f	g	a	h	
T 46	Casero	0	2	1.184	d	e	f	g	a	h	
T 31	Lindemann	1	0	1.181	d	e	f	g	a	h	
T 37	Lindemann	1	1	1.162	d	e	f	g	a	h	



T 39	Lindemann	2	2	1,106	f	a	h
T 32	Lindemann	1.5	0	1,011		a	h
T 21	Knudson	1	0	0.9903		a	h
T 30	Knudson	0	0	0.962		a	h
T 22	Knudson	1.5	0	0.962		a	h
T 28	Knudson	1.5	1.5	0.8563		q	h
T 26	Knudson	0	2	0.707			h
T 29	Knudson	2	2	0.707			h
T 23	Knudson	2	0	0.707			h
T 24	Knudson	0	1	0.707			h
T 25	Knudson	0	1.5	0.707			h

Las dosis de BA e IBA en ppm.

ANEXO Nº 8. Prueba de Tukey al 5% para los tratamientos con semilla hinchada los 67 días desde la siembra. Datos promedios del porcentaje transformado a $\sqrt{x+0,5}$.

#	Tratamientos			X	Rangos		
	Medio	IBA	BA				
T 15	Murashige	0	1.5	5.08	a		
T 17	Murashige	1	1	5.044	a	b	
T 18	Murashige	1.5	1.5	4.798	a	b	c
T 13	Murashige	2	0	4.755	a	b	c
T 20	Murashige	0	0	4.741	a	b	c
T 12	Murashige	1.5	0	4.565	a	b	c
T 16	Murashige	0	2	4.52	a	b	c
T 19	Murashige	2	2	4.337	a	b	c
T 11	Murashige	1	0	3.959	a	b	c
T 47	Casero	1	1	3.314	a	b	c
T 14	Murashige	0	1	3.227	a	b	c
T 45	Casero	0	1.5	3.043	a	b	c
T 48	Casero	1.5	1.5	2.939	a	b	c
T 44	Casero	0	1	2.769	b	c	d
T 50	Casero	0	0	2.754	c	d	e
T 43	Casero	2	0	2.598	c	d	e
T 41	Casero	1	0	2.435	d	e	f
T 49	Casero	2	2	2.057	e	f	g
T 35	Lindemann	0	1.5	2.03			g
T 40	Lindemann	0	0	2.021			g
T 1	Phytamax	1	0	2			g
T 5	Phytamax	0	1.5	1.988			g
T 7	Phytamax	1	1	1.947			g



T 9	Phytamax	2	2	1.944	f a
T 3	Phytamax	2	0	1.935	f a
T 34	Lindemann	0	1	1.932	f a
T 33	Lindemann	2	0	1.915	f a
T 8	Phytamax	1.5	1.5	1.911	f a
T 23	Knudson	2	0	1.892	f a
T 38	Lindemann	1.5	1.5	1.836	f a
T 10	Phytamax	0	0	1.832	f a
T 29	Knudson	2	2	1.76	f a
T 21	Knudson	1	0	1.753	f a
T 6	Phytamax	0	2	1.752	f a
T 46	Casero	0	2	1.73	f a
T 31	Lindemann	1.5	1.5	1.704	f a
T 4	Phytamax	0	1	1.682	f a
T 36	Lindemann	0	2	1.666	a
T 2	Phytamax	1.5	0	1.626	a
T 27	Knudson	1	1	1.609	a
T 30	Knudson	0	0	1.564	a
T 24	Knudson	0	1	1.56	a
T 22	Knudson	1.5	0	1.552	a
T 42	Casero	1.5	0	1.44	a
T 25	Knudson	0	1.5	1.413	a
T 26	Knudson	0	2	1.339	a
T 39	Lindemann	2	2	1.245	a
T 28	Knudson	1.5	1.5	1.189	a
T 37	Lindemann	1	1	1.162	a
T 32	Lindemann	1.5	0	1.13	a

Las dosis de BA e IBA en ppm.

ANEXO N° 9. Prueba de Tukey al 5% para tratamientos a los 81 días desde la siembra de semilla verde (germinación).

Datos promedios del porcentaje transformado a $\sqrt{x}+0,5$.

#	Tratamientos			X	Rangos
	Medio	IBA	BA		
T 17	Murashige	1	1	6.724	a
T 15	Murashige	0	1.5	6.495	a b
T 13	Murashige	2	0	6.386	a b
T 12	Murashige	1.5	0	6.339	a b
T 18	Murashige	1.5	1.5	5.993	a b c
T 20	Murashige	0	0	5.917	a b c
T 16	Murashige	0	2	5.9	a b c



T 19	Murashige	2	2	5.542	a	b	c	d	e	f	a
T 11	Murashige	1	0	4.998	a	b	c	d	e	f	a
T 14	Murashige	0	1	4.499	a	b	c	d	e	f	a
T 50	Casero	0	0	4.024	a	b	c	d	e	f	a
T 47	Casero	1	1	3.748	b	c	d	e	f	a	a
T 48	Casero	1,5	1,5	3.603	b	c	d	e	f	a	a
T 45	Casero	0	1,5	3.597	b	c	d	e	f	a	a
T 44	Casero	0	1	3.166	c	d	e	f	a	a	a
T 43	Casero	2	0	3.062	c	d	e	f	a	a	a
T 5	Phytamax	0	1,5	2.622	d	e	f	a	a	a	a
T 41	Casero	1	0	2.573	e	e	f	a	a	a	a
T 49	Casero	2	2	2.449	e	e	f	a	a	a	a
T 1	Phytamax	1	0	2.348	e	e	f	a	a	a	a
T 34	Lindemann	0	1	2.336	e	e	f	a	a	a	a
T 3	Phytamax	2	0	2.27	e	e	f	a	a	a	a
T 9	Phytamax	2	2	2.25	e	e	f	a	a	a	a
T 40	Lindemann	0	0	2.242	e	e	f	a	a	a	a
T 8	Phytamax	1,5	1,5	2.22	e	e	f	a	a	a	a
T 7	Phytamax	1	1	2.187	e	e	f	a	a	a	a
T 6	Phytamax	0	2	2.165	e	e	f	a	a	a	a
T 33	Lindemann	2	0	2.147	e	e	f	a	a	a	a
T 35	Lindemann	0	1,5	2.146	e	e	f	a	a	a	a
T 10	Phytamax	0	0	2.059	f	a	a	a	a	a	a
T 27	Knudson	1	1	2.02	f	a	a	a	a	a	a
T 42	Casero	1,5	0	1.979	f	a	a	a	a	a	a
T 38	Lindemann	1,5	1,5	1.966	f	a	a	a	a	a	a
T 22	Knudson	1,5	0	1.917	f	a	a	a	a	a	a
T 46	Casero	0	2	1.901	f	a	a	a	a	a	a
T 23	Knudson	2	0	1.892	f	a	a	a	a	a	a
T 36	Lindemann	0	2	1.879	f	a	a	a	a	a	a
T 2	Phytamax	1,5	0	1.865	f	a	a	a	a	a	a
T 31	Lindemann	1	0	1.78	f	a	a	a	a	a	a
T 29	Knudson	2	2	1.76	f	a	a	a	a	a	a
T 21	Knudson	1	0	1.753	f	a	a	a	a	a	a
T 4	Phytamax	0	1	1.682	f	a	a	a	a	a	a
T 25	Knudson	0	1,5	1.679	f	a	a	a	a	a	a
T 30	Knudson	0	0	1.564	f	a	a	a	a	a	a
T 24	Knudson	0	1	1.56	a	a	a	a	a	a	a
T 32	Lindemann	1,5	0	1.432	a	a	a	a	a	a	a
T 26	Knudson	0	2	1.339	a	a	a	a	a	a	a
T 39	Lindemann	2	2	1.322	a	a	a	a	a	a	a
T 28	Knudson	1,5	1,5	1.276	a	a	a	a	a	a	a
T 37	Lindemann	1	1	1.162	a	a	a	a	a	a	a

Las dosis de BA e IBA en ppm.



ANEXO Nº 10. Prueba de Tukey al 5% para los tratamientos con formación de protocormos a los 96 días desde la siembra. Datos promedios del porcentaje transformado a $\sqrt{x+0,5}$.

#	Tratamientos			X	Rangos
	Medio	IBA	BA		
T 17	Murashige	1	1	7.491	a
T 15	Murashige	0	1,5	7.191	a b
T 13	Murashige	2	0	6.998	a b
T 18	Murashige	1,5	1,5	6.975	a b
T 16	Murashige	0	2	6.928	a b
T 12	Murashige	1,5	0	6.877	a b c
T 20	Murashige	0	0	6.7	a b c d
T 19	Murashige	2	2	6.187	a b c d e
T 11	Murashige	1	0	5.966	a b c d e f
T 14	Murashige	0	1	5.099	a b c d e f g
T 50	Casero	0	0	4.756	a b c d e f g a h
T 48	Casero	1,5	1,5	4.346	a b c d e f g a h i
T 47	Casero	1	1	4.203	b c d e f g a h i
T 45	Casero	0	1,5	3.701	c d e f g a h i
T 44	Casero	0	1	3.634	d e f g a h i
T 5	Phytamax	0	1,5	3.435	e f g a h i
T 43	Casero	2	0	3.414	e f g a h i
T 41	Casero	1	0	2.901	f g a h i
T 34	Lindemann	0	1	2.778	f g a h i
T 35	Lindemann	0	1,5	2.771	g a h i
T 1	Phytamax	1	0	2.737	g a h i
T 49	Casero	2	2	2.686	g a h i
T 38	Lindemann	1,5	1,5	2.67	g h i
T 9	Phytamax	2	2	2.648	g a h i
T 3	Phytamax	2	0	2.64	g a h i
T 6	Phytamax	0	2	2.627	g a h i
T 40	Lindemann	0	0	2.6	g a h i
T 8	Phytamax	1,5	1,5	2.597	g a h i
T 23	Knudson	2	0	2.577	g a h i
T 7	Phytamax	1	1	2.544	g a h i
T 33	Lindemann	2	0	2.542	g a h i
T 42	Casero	1,5	0	2.483	g a h i
T 10	Phytamax	0	0	2.478	g a h i
T 29	Knudson	2	2	2.374	g h i
T 21	Knudson	1	0	2.374	g h i
T 27	Knudson	1	1	2.365	g h i



T 22	Knudson	1,5	0	2,36			
T 46	Casero	0	2	2,335	a	h	-
T 4	Phytamax	0	1	2,261	a	h	-
T 2	Phytamax	1,5	0	2,182	a	h	-
T 30	Knudson	0	0	2,094	a	h	-
T 25	Knudson	0	1,5	2,088	g	h	-
T 24	Knudson	0	1	2,085	a	h	-
T 36	Lindemann	0	2	2,064	a	h	-
T 31	Lindemann	1	0	2,041	a	h	-
T 28	Knudson	1,5	1,5	1,916	a	h	-
T 26	Knudson	0	2	1,754	h		-
T 32	Lindemann	1,5	0	1,747	h		-
T 39	Lindemann	2	2	1,573	h		-
T 37	Lindemann	1	1	1,457			

ANEXO N° 11. Prueba de Tukey al 5% para los medios de cultivo con semilla hinchada a los 53 días. Datos promedio del porcentaje transformado $\sqrt{x+0,5}$.

Medios	X
Murashige Skoog	3,951 a
Casero	2,022 b
Phytamax	1,596 c
Lindemann	1,396 c



Knudson	0,851
	c

ANEXO Nº 12. Prueba de Tukey al 5% para los medios de cultivo con semilla hinchada a los 67 días desde la siembra. Datos promedios del porcentaje transformado a $\sqrt{x}+0,5$.

Medios	X
Murashige	4,503 a
Skoog	
Casero	2,508 b
Phytamax	1,862 c
Lindemann	1,664 c
Knudson	1,563 c



ANEXO N° 13. Prueba de Tukey al 5% para los medios de cultivo a los 81 días desde la siembra. Datos promedios del porcentaje transformado a $\sqrt{x}+0,5$.

Medios	X
Murashige	5,879 a
Skoog	
Casero	3,01 b
Phytamax	2,167 c
Lindemann	1,841 c
Knudson	1,676 c

ANEXO N° 14. Prueba de Tukey al 5% para los medios de cultivo a los 96 días desde la siembra para efecto de formación de protocormos. Datos promedios del porcentaje transformado a $\sqrt{x}+0,5$.

Medios	X
Murashige	6,641 a



Skoog	
Casero	3,446 b
Phytamax	2,615 c
Lindemann	2,224 c
Knudson	2,199 c

ANEXO Nº 15. Costos de los reactivos químicamente puros por gramo.

COSTOS DE LOS QUIMICOS	PRECIO POR GRAMO
Clorhidrato de aluminio	0.53
Nitrato de amonio	0.03
Sulfato de amonio	0.02
Acido bórico	0.03
Clorhidrato de calcio	0.04
Nitrato de calcio 4H ₂ O	0.02
Clorhidrato de cobalto 6H ₂ O	0.50
Sulfato cúprico 5H ₂ O	0.08
Acid, Na, 2H ₂ O (EDTA)	0.08
Citrato férrico	0.08
Sulfato ferroso 7H ₂ O	0.03
Magnesium sulfate Anhydrite	0.19
Sulfato de magnesio H ₂ O	0.04

Trióxido de molibdeno	0.06
Molybdic acid (sodium salt 2H ₂ O)	0.05
Clorhidrato de níquel 6H ₂ O	0.17
Clorhidrato de potasio	0.07
Potassium Iodide	0.29
Nitrato de potasio	0.04
Fosfato de potasio monobásico	0.11
Sulfato de zinc 7H ₂ O	0.02
ORGANICOS	
6 – benzylaminopurine	0.10
MES (free acid)	0.09
myo-inositol	0.10
alpha-naphthaleneacetic acid	0.08
Nicotinic acid (free acid)	0.07
Peptone	0.16
Pyridoxine HCl	0.10
Sucrose	0.05
Thiamine HCl	1.16

Fuente: Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas

ANEXO N° 16. Costos fijos por tratamiento.

SALES INORGANICAS	Precio gramo	P 6793 (35%)		K 4003 (35%)		M 8280 (35%)		L 0270 (35%)	
		Cantidad (g)	Total						
Clorhidrato de	0,53	0	0	0	0	0	0	1,964E-05	1,04084E-05



aluminio										
Nitrato de amonio	0,03	0,28875	0,009	0	0	0	0	0	0	0
Sulfato de amonio	0,04	0	0	0,175	0,007	0	0	0,35	0,01	
Acido bórico	0,03	0,001085	0,00003	0,0000196	0,0000006	0,00217	0,00007	0,0003549	0,00001	
Clorhidrato de calcio	0,04	0,0581	0,002	0	0	0,11627	0,005	0	0	0
Nitrato de calcio 4H ₂ O	0,03	0	0	0,24304	0,007	0	0	0,12152	0,004	
Clorhidrato de cobalto 6H ₂ O	0,50	0,000004375	2,1875E-06	0	0	0,00000875	0,000004	0	0	
Sulfato cúprico 5H ₂ O	0,08	0,000004375	0,0000004	2,148E-05	1,7184E-06	0,00000875	0,0000007	6,65E-06	0,0000005	
Acid, Na, 2H ₂ O (EDTA)	0,08	0,013034	0,001	0	0	0,013055	0,001	0	0	
Citrato férrico	0,08	0	0	0	0	0	0	0,00154	0,0001	
Sulfato ferrosos 7H ₂ O	0,03	0,097475	0,003	0,00875	0,0003	0,00973	0,0003	0	0	
Magnesium sulfate Anhydrite	0,19	0,316225	0,06	0,427437	0,08	0,063245	0,01	0	0,004	
Sulfato de magnesio H ₂ O	0,04	0,029575	0,001	0,019889	0,0008	0,005915	0,0002	1,803E-05	0,0000007	
Trióxido de molibdeno	0,06	0	0	0,0000056	0,0000003	0	0	0	0	
Molybdicacid (sodium salt 2H ₂ O)	0,05	0,00004375	2,1875E-06	0	0	0,0000875	0,000004	0	0	
Clorhidrato de níquel 6H ₂ O	0,17	0	0	0	0	0	0	1,091E-05	1,85402E-06	
Clorhidrato de potasio	0,07	0	0	0	0	0	0	0,3675	0,03	
Potassium Iodide	0,29	0,00014525	4,21225E-05	0	0	0,0002905	0,00008	3,465E-05	1,00485E-05	
Nitrato de potasio	0,04	0,3325	0,01	0	0	0,665	0,03	0	0	
Fosfato de potasio monobásico	0,11	0,02975	0,003	0,0875	0,010	0,0595	0,007	0,04725	0,005	
Nitrato de sodio		0	0	0	0	0,61285	0	0	0	
Sulfato de zinc 7H ₂ O	0,09	0,001855	0,00017	0,0001158	0,000010	0,00301	0,00027	0,0001978	0,000018	
ORGANICOS										
Agar	2	6,5	13	6,5	13	6,5	13	6,5	13	

6 – benzylaminopurine	0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MES (free acid)	0,40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
myo-inositol	0,50	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,05
alpha-naphthaleneacetic acid	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nicotinic acid (free acid)	0,08	0,0005	0,00004	0,0005	0,00004	0,0005	0,00004	0,0005	0,00004	0,00004
peptone	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pyridoxine HCl	0,59	0,0005	0,000295	0,0005	0,000295	0,0005	0,000295	0,0005	0,000295	0,0005
Sucrose	0,05	7	0,35	7	0,35	7	0,35	7	0,35	0,35
Thiamine HCl	1,16	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
TOTAL			13,49		13,51		13,45		13,45	



Figura Nº 17. Los tubos etiquetados al momento de la siembra.

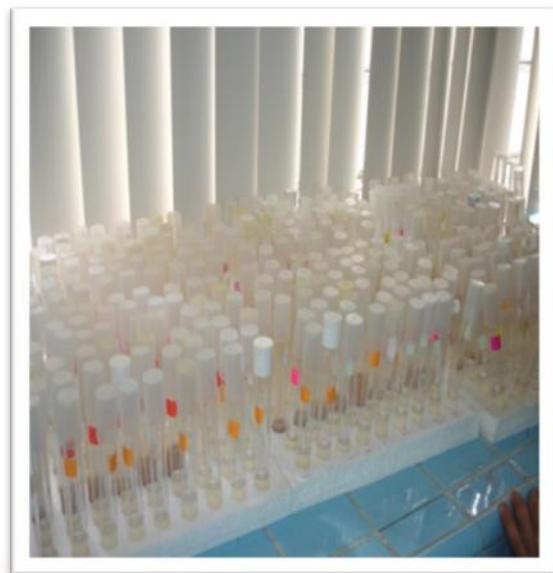


Figura Nº 18. Tubos sembrados.



Autora: Jessibel Carolina Molina Cabrera

Tema.: "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN *Comparettia speciosa* Rchb.f."

Figura Nº 19. Los tubos en la cámara de crecimiento.



Figura Nº 20. Revisión y toma de datos.



Figura Nº 21. Embrión hinchado rompiendo la testa.



Figura Nº 22. Protocormo con rizoides en formación.



Figura Nº 23. Protocormo con inicio de brote.