



FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL.

TESIS

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE TRES MEDIOS DE CULTIVO
EN LA GERMINACIÓN IN VITRO DE *Phragmipedium kovachii* A, D
& F (ZAPATITO) - PROVINCIA DE SAN MARTIN-2016”.**

PRESENTADO POR:

BACHILLER: LEIDY GUZMÁN INGA

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AMBIENTAL.

TARAPOTO – PERÚ

2016

ÍNDICE

Agradecimiento	1
Dedicatoria	2
Resumen	3
Introducción	4
CAPITULO I: PROBLEMA	
1.1. Planteamiento del problema	5
1.2. Formulación del Problema	5
1.2.1. Problema General	5
1.2.2. Problema específico	6
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo General	6
1.3.2. Objetivos Específicos	6
1.4. Justificación de la investigación	7
CAPITULO II: MARCO TEORICO	
2.1. Antecedentes	8
2.2. Bases Teóricas	9
2.2.1. Generalidades de las orquídeas	9
2.2.2. Distribución geográfica	9
2.2.3. Las orquídeas y su ambiente	10
2.2.4. Reproducción	11
2.2.5. Formas básicas de crecimiento	11
2.2.6. Descripción botánica de <i>Phragmipedium kovachii</i>	11
2.2.7. Componentes del medio de cultivo	12
2.3. Hipótesis	14
2.3.1. Hipótesis general	14
2.3.2. Hipótesis específica	14
2.4. Definición de terminos	14
Ecosistema	14

Material Genético.....	14
Biología.....	15
Conservación.....	15
Medio de cultivo.....	15
Cultivo In vitro.....	15
Propagación in vitro.....	16
Protocolo.....	16
2.5. Identificación de variables.....	16
Variable independiente.....	16
Variable dependiente.....	16
CAPITULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	
3.1. Ámbito de estudio.....	17
3.2. Tipo de la Investigación.....	17
3.3. Nivel de investigación.....	17
3.4. Método de Investigación.....	17
3.5. Diseño de la investigación.....	24
3.6. Población, Muestra y Muestreo.....	25
3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos.....	25
3.7.1. Técnicas.....	25
3.7.2. Instrumentos.....	25
3.8. Procedimientos de recolección de datos.....	25
3.9. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	25
CAPITULO IV. RESULTADOS	
4.1. Presentación de Resultados.....	26
Procedimiento para la siembra de <i>Phragmipedium kovachii</i>	27
Instalación del experimento.....	30
Gráfica de los estadios de las semillas.....	31
Evaluación de las semillas sembradas de <i>Phragmipedium kovachii</i>	34
A. Conteo.....	34
B. Viabilidad de las semillas sembradas de <i>Phragmipedium kovachii</i>	35
C. Porcentaje de germinación de las semillas sembradas de <i>Phragmipedium kovachii</i>	36

D. Contaminación.....	36
4.2. Discusión.....	65
Conclusiones.....	67
Recomendaciones.....	68
Referencia bibliográfica.....	69
ANEXOS.	

INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1: Composición de medios de cultivo para células vegetales	15
CUADRO N° 2: Estadíos de las semillas en su desarrollo.	24
CUADRO N°3: Tratamiento I=MS, ph 7.3.....	31
CUADRO N°4: Tratamiento II=GD, ph 7.3.....	31
CUADRO N°5: Tratamiento III=RE, ph 7.3.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de tubos de ensayo por cada tratamiento	21
Tabla 2: Tratamientos a utilizar con sus respectivos pH	22
Tabla 3: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 1- Mes1 después de su siembra.....	37
Tabla 4: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 2- Mes 1 después de su siembra.....	38
Tabla 5: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 1 después de su siembra.....	39
Tabla 6: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 1 después de su siembra	40
Tabla 7: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 2 después de su siembra	41
Tabla 8: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 2 después de su siembra.....	42
Tabla 9: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 2 después de su siembra.....	43
Tabla 10: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 2 después de su siembra.....	44
Tabla 11: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 1 después de su siembra.....	45
Tabla 12: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 1 después de su siembra.....	46
Tabla 13: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 1 después de su siembra.....	47

Tabla 14: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 1 después de su siembra	48
Tabla 15: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 2 después de su siembra.....	49
Tabla 16: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 2 después de su siembra.....	50
Tabla 17: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 2 después de su siembra.....	51
Tabla 18: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 2 después de su siembra.....	52
Tabla 19: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 1 después de su siembra.....	53
Tabla 20: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 1 después de su siembra.....	54
Tabla 21: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 1 después de su siembra.....	55
Tabla 22: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 1 después de su siembra.....	56
Tabla 23: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 2 después de su siembra.....	57
Tabla 24: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 2 después de su siembra	58
Tabla 25: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 2 después de su siembra.....	59
Tabla 26: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 2 después de su siembra.....	60

Tabla 27: Análisis de varianza de datos transformados Raíz ($x+0.5$), de la rotura de testa a los 30 días.....	62
Tabla 28: Promedio de germinación por tubo de cada medio de cultivo	62
Tabla 29: Análisis de varianza de datos transformados Raíz ($x+1$), de la formación de protorcormos a los 60 días.....	63
Tabla 30: Promedio de germinación por tubo de cada medio de cultivo	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ejemplar de Orquídea <i>Phragmipedium kovachii</i> en condiciones naturales	26
Figura 2: Cápsula <i>Phragmipedium kovachii</i> , 7cm de largo, 90 días de maduración	27
Figura 3: Cápsula <i>Phragmipedium kovachii</i> retirando las partes necrótidas	27
Figura 4: Cápsula <i>Phragmipedium kovachii</i> en solución de NaOCl al 1 %	28
Figura 5: Cápsula <i>Phragmipedium kovachii</i> secándose en la cámara de flujo laminar ...	28
Figura 6: Cápsula <i>Phragmipedium kovachii</i> con cortes longitudinales	28
Figura 7: Cápsula <i>Phragmipedium kovachii</i> con el segmento despejado	29
Figura 8: Cápsula <i>Phragmipedium kovachii</i> con las semillas retiradas, listas para la siembra	29
Figura 9: Semillas de <i>Phragmipedium kovachii</i> dispersando sobre el medio de cultivo ..	29
Figura 10: Tubos de ensayos rotulados y sellados listos para la caja de incubación	30
Figura 11: Tubos de ensayos rotulados y sellados dentro de la caja de incubación	30
Figura 12: Partes de la semilla <i>Phragmipedium kovachii</i>	32
Figura 13: Semilla en estadio 0	32
Figura 14: Semilla en estadio 1, embrión imbebido	32
Figura 15: Semilla en estadio 2 ruptura de testa	33
Figura 16: Semilla en estadio 3 protocormo	33
Figura 17: Semilla en estadio 4 protocormo desarrollado	33
Figura 18: Protocormo desarrollado	34
Figura 19: Tubo de ensayo conteniendo las semillas del tratamiento M&S ubicado en el estereoscopio.	34
Figura 20: Viabilidad	35

Figura 21: Secuencia de desarrollo de semillas <i>Phragmipedium kovachii</i> mostrando los diferentes estadios durante dos meses de evaluación.....	61
Figura 22: Estereoscopio binocular NIKON.....	80
Figura 23: Balanza analítica ADAM.....	80
Figura 24: Probetas graduadas PYREX.....	80
Figura 25: Micro pipetas EPPENDORF.....	81
Figura 26: Autoclave vertical a Presión.....	81
Figura 27: Tubos de ensayo PYREX.....	81
Figura 28: Cámara de flujo laminar ILUMIX.....	82
Figura 29: Medición del pH de la solución para el medio de cultivo.....	82
Figura 30: Soluciones STOCK para la preparación de medio de cultivo.....	82
Figura 31: Pesando Agar-Agar para el medio de cultivo.....	83
Figura 32: Horno microondas SAMSUNG para esterilización del medio de cultivo.....	83
Figura 33: dispensando la solución en los tubos de ensayo.....	83
Figura 34: Tubos de ensayo inclinados para la solidificación del medio de cultivo y su fácil siembra.....	84
Figura 35: Retirando las partes necróticas de la cápsula.....	84
Figura 36: Desinfección de la cápsula con solución de hipoclorito de sodio en concentración al 1 %.....	84
Figura 37 Cámara de flujo laminar acondicionada para la siembra.....	85
Figura 38: Apertura de la cápsula.....	85
Figura 39: Separando las semillas para la siembra.....	86
Figura 40: Sembrando las semillas sobre el medio de cultivo solidificado.....	86
Figura 41: Sellando a los tubos de ensayo.....	86
Figura 42: Tubos de ensayo rotuladas.....	87
Figura 43: Tubos de ensayo en la caja de incubación.....	87
Figura 44: Embrión hinchado rompiendo testa.....	87
Figura 45: Embrión con inicio de protocormo.....	88
Figura 46: Protocormo con inicio de brote.....	88

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1: Tubos contaminados y no contaminados, evaluado a los 20 días después de la siembra.....	36
Grafico 2: Prueba de Duncan para datos transformados de raíz ($x+0.5$), de la rotura de testa a los 30 días.....	63
Grafico 3: Prueba de Duncan para datos transformados de raíz ($x+1$), de la formación de protocormos a los 60 días.....	64
Gráfico 4: Porcentaje final de protocormos desarrollados a los 2 meses según medio de cultivo.....	65

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Alas Peruanas por la formación profesional con docentes destacados para el desarrollo de mi persona como profesional.

Al Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales (INIBICO) y al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), por el apoyo en el desarrollo del mi tema de investigación en su prestigiosa institución.

Al biólogo Marco león Martínez y al Ingeniero Henry Delgado Haya por la persistencia y paciencia de enseñanza en mi proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A DIOS

Por cuidarme durante todo este tiempo y permitir llegar a mí meta propuesta con mucha satisfacción.

A MIS QUERIDOS PADRES:

Asunción Guzmán Culqui y Eva Inga Miranda por el apoyo incondicional además por el gran esfuerzo y empeño de enseñarme y corregirme para mejorar cada día más como persona, y siempre lo llevare presente de manera muy importante en mi vida.

A MIS HERMANAS

Por enseñarme muchas experiencias buenas y malas de las cuales aprendí mediante consejos para mis momentos alegres y tristes de mi vida.

RESUMEN

La familia Orchidaceae es una de las más vulnerables, principalmente por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta. (Irene Ávila Díaz et al, 2006). Por consiguiente el cultivo in vitro es una alternativa para su conservación de las especies en peligro de extinción. En esta investigación se evaluó la germinación de *Phragmipedium kovachii* hasta obtener un estado protocormico de la especie, en tres medios de cultivo con diferente composición mineral, Murashige y Skoog (M y S), Robert y Ernst (R y E) y Thomale (G y D). Se colectó la cápsula en las que contenía las semillas, las cuales fueron desinfectadas y se sembró la cantidad de 100 a 300 de estas sobre el medio de cultivo preparado y colocados en 30 tubos de ensayos las condiciones de cultivo en las que se evaluó fue a 20 °C de temperatura, 50 % de humedad relativa. En este estudio se demostró que el medio Robert y Ernst (RE), obtuvo un porcentaje de 52 % mayor a los dos medios para la germinación con un porcentaje de 25 % para Thomale (GD) y para Murashige y Skoog (MS) un porcentaje de 23 %.

ABSTRACT

The orchid family is one of the most vulnerable, mainly due to habitat destruction and large extraction, which has been subject. Therefore, in vitro culture is an alternative tool for the conservation of endangered species. In this research *Phragmipedium kovachii* germination was evaluated until a Protocormico status of the species in three culture media with different mineral composition, Murashige y Skoog (M y S), Robert y Ernst (R y E) y Thomale (G y D). The capsule which contains the seeds were collected, which were disinfected and the number of 100 were seeded at 300 of these on the culture medium prepared and placed in 30 test tubes culture conditions in which it was assessed was to 20 ° C temperature, 50% relative humidity. This study showed that the average Robert and Ernst (R&E), obtained a percentage of 52% higher than the two media for germination with a percentage of 25% for Thomale (G&D) and Murashige and Skoog (M&S) a percentage 23%.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes entre las plantas superiores y su distribución es a nivel mundial; Se calcula que nuestro país alberga entre 2600 y 3000 especies. **Ministerio del Ambiente - MINAM, (2015).**

Esta diversidad es debido a que contamos con una amplia gama de microclimas, que circunscriben especies en aéreas muy restringidas con características climáticas muy específicas, hecho que dificulta el cultivo de muchas especies, fuera de su ambiente natural. En el Perú la familia Orchidaceae se encuentra muy amenazada con muchas especies en peligro de extinción, debido a dos factores , la depredación realizada con fines de exportación por colectores comerciales y la destrucción masiva maderera la cual deforestan unas 300,000 hectáreas por año exterminando flora y fauna originarias del lugar. Una de las soluciones a esta considerable pérdida es la instalación de orquidearios en las zonas afectadas. **Moisés Caveró (2005).**

Debido a más razones fueron las primeras plantas propagadas in vitro a partir de la siembra de semillas, de manera simbiótica Noël Bernard en Francia. (1900) y asimbióticamente Lewis Knudson en los Estados Unidos de América en (1921). Además la propagación in vitro como fue utilizada como bancos de germoplasma, para su reproducción. **María Eugenia Segretín, (2007).**

I. PROBLEMA

1.1. Planteamiento del Problema

Las orquídeas son un grupo de plantas muy diverso en el Perú. El género *Phragmipedium* está representado en nuestro país por ocho especies según lo definió Brako & Zarucchi en 1993.

En la región del Alto Mayo, la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández, se encuentra restringido a un área de bosque montano, con neblina, entre las altitudes de 1689 a 1850 m.s.n.m. La vegetación circundante está constituida por bosques de montaña, siendo los principales árboles: *Cedrela odorata* “Cedro” (familia Meliaceae), “Moena” (Lauraceae), *Cinchona spp.* (Rubiaceae) y *Podocarpu ssp.* (Podocarpaceae). La especie *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández, ocupa áreas no continuas en el bosque en donde no hay presencia de árboles, con dominancia de pocas especies de arbustos y hierbas; su hábitat está circunscrito a paredes rocosas con poca materia orgánica, correspondiendo la formación vegetal a un bosque de ladera. Millán B., R. Bravo. et, al. (2007).

Este género *Phragmipedium* está siendo amenazado por la comercialización que hoy en día se realiza ilegalmente, pero si no evitamos este problema, se podrían perder especies naturales, una de las alternativas factibles de solución es la aplicación de técnicas de propagación in vitro a partir de semillas, de manera que aseguremos su reproducción para ser distribuidas en diversas áreas donde se requiera, de ese modo estaremos conservando la especie en su hábitat.
Fuente: propia, 2013.

1.2. Formulación del Problema

1.2.1. Problema General.

¿Cuál de los medios de cultivo M&S, G&D y R&E utilizados, será más eficaz en el proceso de germinación, desde semilla hasta la fase protocormo, de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016?

1.2.2. Problema Específicos

- 1.2.2.1. ¿Cómo influirá la composición química de cada uno de los medios de cultivo utilizados en la germinación desde semilla hasta la fase protocormo de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016?
- 1.2.2.2. ¿Cuáles son los indicadores que permitirán diferenciar la efectividad de los medios de cultivo utilizados en el proceso de germinación desde semilla hasta la fase protocormo de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016?
- 1.2.2.3. ¿Cuál será el medio de cultivo con mayor porcentaje de viabilidad y germinación in vitro desde semilla hasta la fase protocormo de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016?

1.3. Objetivos:

1.3.1. Objetivo General.

Evaluar la eficacia de los medios de cultivo M&S, G&D y R&E, en la germinación desde semilla hasta la fase protocormo de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016.

1.3.2. Objetivos Específicos.

- 1.3.2.1. Describir la composición química de los medios de cultivos M&S, G&D y R&E, utilizados para la germinación desde semilla hasta la fase protocormo de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016.
- 1.3.2.2. Identificar los indicadores que nos permitan diferenciar la efectividad de los medios de cultivo M&S, G&D y R&E utilizados en el proceso de germinación desde semilla hasta la fase protocormo *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016.

1.3.2.3. Determinar el medio de cultivo con mayor porcentaje de viabilidad y germinación in vitro desde semilla hasta la fase protocormo de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016.

1.4. Justificación:

En el grupo de las orquídeas destaca la especie descubierta el 2002 *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández considerada por los especialistas como el mayor descubrimiento de los últimos años en lo que a orquídeas se refiere. Es endémica del Alto Mayo en la Provincia de Rioja Departamento de San Martín y por su rareza es víctima del tráfico ilegal según la declaración del Bosque de Protección Alto Mayo en el 2007.

El presente trabajo de investigación se justifica ambientalmente porque: La actividad extractiva ha significado una evidente disminución de las poblaciones naturales de la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalstrom & Fernández, causando un impacto tal que no podemos conocer si la especie tendrá el tiempo necesario para su regeneración en forma natural.

Las técnicas de propagación in vitro han permitido la multiplicación de especies en peligro de extinción con el fin de disminuir la presión de extracción de las plantas de sus hábitats naturales y de utilizar los propágulos en programas de reintroducción en el hábitat.

Del mismo modo estas técnicas pueden ser aplicadas a la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández, a fin de asegurar su propagación en cantidades suficientes para satisfacer la demanda y asegurar su conservación en el medio natural mediante la reintroducción en los hábitats donde haya desaparecido a consecuencia de la colecta ilegal.

Por lo tanto existe razón suficiente para generar información valiosa mediante el presente trabajo de investigación de la cual se pretende aportar metodologías acerca de técnicas in vitro para poder ser aplicadas y contribuir con el desarrollo de las especies de orquídeas con fines de propagación y conservación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Los bancos de germoplasma tienen como fin conservar la biodiversidad fuera de su ambiente natural, enfocando sus esfuerzos a especies identificadas como útiles o que se ha observado que su población está en proceso de disminución. La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas del planeta, pero también tiene un número significativo de especies en peligro de extinción. **Cerna Marco et al., (2014).**

La propagación y cultivo de las orquídeas fue revolucionado después del descubrimiento de Knudson en el año 1922, en donde las semillas pudieron ser germinadas en un medio simple con azúcar, en este trabajo demostró que la germinación de semillas de orquídeas en condiciones in vitro fue posible sin la asociación con hongos, fue la primera propagación exitosa de orquídeas mediante esta técnica en medios de cultivo con especies de ***Cattleya* y *Laelia*** en agar. **Mayo Alberto. et al., (2010).**

El cultivo in vitro se perfila como una serie de técnicas alternativas para la reproducción de orquídeas bajo condiciones asépticas controladas, esta propagación masiva de orquídeas, ya sea por medio de semillas o tejidos, produce altos niveles de multiplicación en períodos de tiempo cortos, además asegura la sanidad del material en multiplicación. Por lo tanto, el cultivo in vitro se perfila como una alternativa para el problema de las especies en peligro de extinción y en el mantenimiento de híbridos de gran valor. **Placencia, (2009).**

La técnica de cultivo de semillas in vitro tiene una importancia fundamental en la obtención de nuevas plantas híbridas, y pueden ser de dos tipos propagación por semillas y propagación vegetativa o clonal. Algo muy importante que mencionó Bennett en 1999, que todas las especies del genero ***Phragmipedium*** están registradas desde 1996, como especies en peligro de extinción incluyendo ahora el ***Phragmipedium kovachii*** Atwood, Dalstrom & Fernández, según la Convención sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES) basada en la **CATEGORIZACIÓN del DS 043-2006-AG** , esta especie se

encuentra amenazada en peligro crítico (**CR**), por lo tanto su comercialización está reglamentada prohibida, con excepción de sus plántulas o tejidos obtenidos a través de cultivos in vitro. **Millán S. Betty, (2011).**

Según Rach en el 2004, indica que el Perú ha pedido al gobierno americano que ayude en las investigaciones de esta especie ilegalmente sacada del Perú y patentada como *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández. El costo de esta planta en EE.UU. es de \$ 10 000 dólares por unidades, el cual superaría los 100 millones de dólares anuales.

2.2. Bases Teóricas

- Generalidades de las orquídeas.

La palabra orquídea (del latín orchis = testículo) apareció por vez primera mencionada en un manuscrito del filósofo griego Theophrastus (371-285 a.C). El nombre significa testículo y hace alusión a los pseudobulbos de algunas especies y al uso medicinal que se le asignaba a esta flor como afrodisiaca y potenciadora de la fertilidad. Con el tiempo, la palabra orchis derivó en orchidaceae, término con el que se designó a la familia más numerosa del reino vegetal con aproximadamente 25,000 a 35,000 especies. Según las normas establecidas, las especies se mencionan en latín o con nombres latinizados que aluden a su descubridor, al lugar a donde se las encontró por primera vez, o a alguna característica en particular. Además todas las especies tienen nombre y apellido: el nombre (en mayúscula) corresponde al género al que pertenece la especie, y el apellido (en minúscula) es una característica de esa especie. Por ejemplo, *Cattleya máxima* se dice: Cattleya: en honor de William Cattley, quien fue el primero en cultivarla; y máxima porque su flor tiene 12 cm de diámetro. **Freuler, (2007).**

- Distribución geográfica.

Las especies de orquídeas se encuentran en peligro de extinción a nivel mundial, debido al desarrollo, la sobre colección y la destrucción de sus hábitats naturales para fines hortícolas. **Pedroza et al., (2010).** En el Perú, se distribuye una rica diversidad de orquídeas algunas restringidas al Bosque Húmedo Tropical donde su normal crecimiento en forma natural es epífita, generalmente en los departamentos

de San Martín, Cajamarca, entre otros. Crecen entre los 100 y 4.600 m.s.n.m. Muchas de ellas están en peligro de extinción debido al comercio ilegal y la deforestación de su hábitat. De las 30.000 especies de orquídeas, en el Perú crecen más de 3.000 repartidas en 750 géneros de orquídeas. **Villanueva A. Carlos (2013)**

La familia Orchidaceae es considerada la más evolucionada del reino vegetal, debido a su complejidad floral, a sus interacciones con los agentes polinizadores y simbiosis con las micorrizas. Las orquídeas están distribuidas en todo el planeta, con excepción de los polos y lugares con alturas superiores a los 4500 msnm y 20° N y S. Las orquídeas epífitas, son propias de bosques tropicales húmedos, secos ó semi - desérticos del planeta. Muchas viven adheridas a las rocas de laderas de montañas y otra buena parte adaptada a vivir en desiertos o valles montañosos. **Tiza Arias G. (2010).**

- **Las orquídeas y su ambiente**

Las semillas de orquídeas generalmente germinan en sus hábitats naturales, en íntima simbiosis con micorrizas, mismas que les proporcionan los azúcares y nutrientes necesarios en sus primeras etapas de germinación. En el caso de orquídeas terrestres es de vital importancia la relación hongo-orquídea, ya que en estadios tempranos del ciclo de vida el protocormo enterrado no puede fotosintetizar sus nutrientes según Mc Kendrick, en el año 2000 en **Tiza Arias G, (2010).**

Las orquídeas crecen en casi todos los ecosistemas del país, es de suponerse que requieren un clima lo más parecido al de su procedencia, por lo que es importante conocer su origen.

Las orquídeas son especies que crecen en ambientes fríos templados y cálidos, pero la mayoría se desarrolla principalmente en ecosistemas tropicales, aunque algunas soportan climas extremos como heladas, altas temperaturas y precipitación. La temperatura que se tiene al interior de las casas, es adecuada para cultivar los tipos más comunes de orquídeas. En general si la temperatura es confortable para el ser humano, lo será para las orquídeas; sin embargo muchas

orquídeas se adaptan a condiciones desfavorables. **Menchaca García Rebeca A. (2011).**

- **Reproducción**

a) **Reproducción asexual:** se pueden reproducir por vía vegetativa, o sea por partición o meristemas.

La reproducción asexual o vegetativa se efectúa sin transferencia de material genético, se realiza tomando una parte de la planta a reproducir mediante un instrumento de cortar y sembrando en un medio adecuado, dependiendo de la especie. **Sánchez Roldan M. (2009).**

b) **Reproducción a partir de semillas:** debido a que las semillas de las orquídeas son muy pequeñas y contienen poca o nula reserva alimenticia, la germinación y el subsiguiente desarrollo de la planta, dependen en la naturaleza de la relación simbiótica de un hongo por un medio nutritivo, a esta reproducción se denomina asimbiótica. **Sánchez Roldan M. (2009).**

- **Formas básicas de crecimiento**

De acuerdo con el eje de crecimiento, las orquídeas suelen clasificarse en plantas monopodiales y simpodiales.

La mayoría de las orquídeas siguen dos patrones de crecimiento:

a) **Crecimiento monopodial:** tienen un único tallo, del que van naciendo nuevas hojas por ápice, y de entre ellas nacen el tallo floral y las raíces aéreas (*Phalaenopsis*).

b) **Crecimiento simpoidal:** tienen varios bulbos o pseudobulbos que brotan de un rizoma. Los nuevos tallos crecen desde la base del tallo del año anterior, y generalmente las flores nacen del nuevo tallo (*Cymbidium*, *Cattleya*). **Ferrarotto María (2011).**

- **Descripción botánica de *Phragmipedium kovachii*:**

Taxonomía de la especie *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández 2002:

División	:Spermatophyta	
Orden	:Orchidales	
Familia	:Orchidaceae	
Subfamilia	:Cypripedioideae	
Tribu	:Cypripedieae	
Género	:Phragmipedium	
Especie	:<i>Phragmipedium</i>	<i>kovachii</i>
	Atwood, Dalstrom & Fernandez, 2002.	

Según **Atwood (2002)** algunas características de la orquídea ***Phragmipedium kovachii*** Atwood, Dalstrom & Fernández, 2002.

Planta terrestre no presenta rizomas, sus raíces de 4 mm de diámetro, que puede llegar a 64.4 cm de longitud, pero sobre todo mucho más delgado.

Presenta una flor de 23 -25 cm de diámetro, pubescente, púrpura, con una sola bráctea verde 7 -9 cm del escapo de largo ; el ovario 8 cm de largo, pubescente marrón, sujeta por una bráctea floral aguda 4 – 5.5 cm de largo.

El labelo es de 5.5 - 7.5 x 3.5 – 4 cm estaminoide 1.3 x 2 cm, cuerpo triangular a rombo, anteras que tocan casi los estigmas; estigmas tres, el estigma mediano es grande, casi 1 cm de largo.

- **Componentes del medio de cultivo**

El medio de cultivo puede ser sólido o líquido, está conformado por algún agente gelificante, macro y micronutrientes esenciales para la supervivencia de la planta, nutrientes (hidratos de carbono, vitaminas), agentes reguladores del crecimiento y hormonas vegetales que ayudarán a obtener una planta o un órgano en particular, a partir del explanto elegido. Algunos de los elementos mencionados pueden ser reemplazados por mezclas poco definidas en su composición (jugo de tomate, agua de coco, etc.).

Los componentes del medio de cultivo se clasifican en cuatro categorías: sales minerales; sustancias orgánicas; reguladores de crecimiento y productos naturales complejos. **Tiza Arias G, (2010).**

Composición	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Sacarosa. Los explantes no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in vitro</i>
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada según la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras. Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis.
Hormonas y reguladores del crecimiento	Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Otras: giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Mezclas de sustancias poco definidas	Extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Se usan como soporte: agar, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

Cuadro N° 1. Composición de medios de cultivo para células vegetales

Fuente: Segretín, M. (2007).

2.3. Hipótesis:

2.3.1 Hipótesis general

Evaluación de la eficacia de tres medios de cultivo en la germinación in vitro de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO).

2.3.2 Hipótesis específicas

- ✓ La composición química de los medios de cultivo M&S, G&D y R&E utilizados en la germinación *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO), influirá de acuerdo a la concentración de sus nutrientes en la germinación de – *Phragmipedium kovachii*, desde semilla hasta la fase de protocormo.
- ✓ El porcentaje de contaminación y viabilidad serán los indicadores que permitan diferenciar la efectividad de los medios de cultivo M&S, G&D y R&E para la germinación in vitro de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016.
- ✓ El medio de cultivo con mayor concentración de nutrientes será aquel que alcance el mayor porcentaje de viabilidad y germinación de *Phragmipedium kovachii* A, D & F (ZAPATITO) - Provincia de San Martín – 2016.

2.4. Definición de Términos

- **Ecosistema:** Los ecosistemas desempeñan funciones valiosas y estas permiten generar todo un flujo de bienes y servicios ambientales de gran importancia para la sociedad a distinta escala, desde lo local hasta lo global. Sin embargo, la dinámica de las actividades humanas actuales y pasadas ha impactado negativa y directamente en los ecosistemas e indirectamente en sus funciones. **Catie (2015)**
- **Material Genético:** se entiende todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia; esto incluye qué son los genes, cómo ellos llevan esa información, cómo se replican y pasan a las generaciones posteriores y cómo la expresión de su información dentro de un organismo determina sus características particulares. **Pedrique de Aulacio M. (2008).**

- **Biotecnología:** es el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre. Como tal, la biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia en actividades tales como la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. **Marassi M. (2008).**
- **Conservación:** Alrededor del mundo, las especies están desapareciendo. Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), estamos enfrentando una extinción masiva, muy superior a la de los dinosaurios de hace 70 millones de años. Un total de 15.589 especies se enfrentan a la extinción, desde los mamíferos y las plantas, hasta los insectos. La conservación es el intento de proteger a estas especies antes de que sea demasiado tarde. Ninguna especie ha conseguido regresar a la vida después de haberse extinguido. La prevención es la única cura que tenemos. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. **IUCN (2007).**
- **Medio de cultivo:** Un medio de cultivo es un conjunto de componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La composición del medio de cultivo se basa en: Macronutrientes, Micronutrientes o elementos traza Factores de crecimiento. **Doménech A. (2011).**
- **Cultivo In vitro:** El término “cultivo in vitro de tejidos” significa cultivar algunas partes de las plantas también llamados “explantes”, como segmentos de hoja, tallo y raíces, además de otros tejidos u órganos vegetales, dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial, en los que deben de controlarse la asepsia, el crecimiento y el desarrollo de estos diferentes tejidos. **Salgado Garciglia R. (2015).**
- **Propagación in vitro:** Estas técnicas de propagación in vitro han permitido nuevas posibilidades para el manejo de la genética básica y obtener nuevos cultivares. Dentro de las alternativas se presentan la facilidad de la creación y mantenimiento de nuevo material genético para la clonación in vitro, la

obtención de material haploide a partir de anteras o cultivo de óvulos e incrementar la variabilidad genética. A nivel práctico se han obtenido cultivares mejorados, producción de semillas de variedades comerciales y una rápida propagación (clonación) de cientos de especies. **Salgado Garciglia R. (2015).**

- **Protocormo:** Cuerpo tuberiforme producido tras la diferenciación embrional de la semilla de las orquídeas. **Salgado Garciglia R. (2015).**

2.5. Identificación de Variables

Variable dependiente

Germinación in vitro de *Phragmipedium kovachii* A.D& F.

Variable independiente

Evaluación de la eficacia de tres medios de cultivo.

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Ámbito de estudio

El presente trabajo de investigación se desarrollara en la Región San Martín, Provincia San Martín, Distrito de La Banda de Shilcayo - Asentamiento Humano Ventanilla a una Altitud de 1250 msnm. **(Ver anexo 1).**

3.2. Tipo de Investigación

Según Fiallo Rodríguez J.P. (2008): En este tipo de investigación el objetivo es establecer relaciones causales que supongan una explicación del objeto de investigación, se basa sobre muestras grandes y representativas de una población determinada, utiliza la estadística como herramienta básica para el análisis de datos.

El presente trabajo de investigación tiene un carácter “experimental” en la que se determinará, con la mayor confiabilidad posible, relaciones de causa-efecto, sobre los tres medio de cultivos en la germinación de in vitro de *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández (2002).

3.3. Nivel de Investigación

La investigación contará con la evaluación cuantitativa en laboratorio para realizar el experimento con los tres medios de cultivos en la germinación in vitro de *kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández.

3.4. Método de Investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las siguientes etapas:

Etapla 1: Lugar de Ejecución

Los ensayos y la colección del material vegetal se realizaron en el Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales **-(INIBICO)** en convenio con el Instituto Nacional de Innovación Agraria **-(INIA)**.

Etapla 2: Material Vegetal y Medios de Cultivo

El material vegetal constituido de cápsulas indehiscentes de *Phragmipedium kovachii* Atwood, Dalstrom & Fernández, en perfecto estado de maduración de las semillas.

Se conoció a la planta madre que fue donadora de sus genes (semillas) para la propagación, anotando sus características morfológicas, fisiológicas y taxonómicas.

A. Medios de Cultivos:

Descripción de la composición de los tres Medios de cultivo que se utilizó en la germinación:

- ✓ **THOMALE (G&D):** El medio G & D (1954); presenta concentraciones de NO_3 , PO_4 , SO_4 , K , Mg , NH_4 , H (E.F George, D.J.M.), se puede resumir que este medio está compuesto macro, micronutrientes, aminoácidos y sales pero no contiene el elemento calcio.
- ✓ **ROBERT & ERNTS (R&E):** El medio R & E, presenta concentraciones de Nitrato de Amonio, Sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Nitrato de potasio KNO_3 , Fosfato de Potasio (KH_2PO_4) , Nitrato de Magnesio $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Nitrato de Calcio tetra Hidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. además micronutrientes como Molibdato de Sodio, Cloruro de Cobalto, Ácido Bórico, Yoduro de Potasio.
- ✓ **MURASHIGE & SKOOG (M&S):** El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio. Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales in vitro (Heller, 1953, 1954; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk y Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento además varían en sus cantidades de minerales (**ver anexo 2**).

La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y

Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular.

B. Protocolo Para la Preparación de Medios de Cultivo

En este procedimiento se ha utilizado como base de preparación de medios de cultivo al medio MURASHIGE & SKOOG (M&S), y a partir de dicho protocolo de preparación se realizó la preparación de los medios THOMALE (G&D) y ROBERT & ERNTS (R&E) con su respectivos protocolos (**ver anexo 5 ,6 y 7**), con la diferencia que estos dos últimos medios tienen diferente composición mineral como ya se especificó anteriormente.

✓ **Equipamiento a Utilizar.**

- Estereoscopio
- Microscopio
- Refrigerador.
- Horno microondas
- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar.
- Destilador de agua.
- Sistemas de iluminación.

✓ **Material Requerido:**

- Sales minerales y Vitaminas
- Macro y micronutrientes del Murashige y Skoog (1962)
- Tiamina
- Acido Nicotínico

✓ **Material de vidrio**

- Probeta de 1000 ml
- Frascos para medio de cultivo (botellas o tubos de ensayo)
- Pipeta graduada de 25 ml , 5 ml ; 1 ml

✓ **Recipientes**

- Frasco de 2 litros resistente al calor

- Cuchara de 100 ml o recipientes con medida para dispensado

✓ **Otros insumos**

- Papel aluminio

- Papel toalla

- Cling wrap (film plástico transparente para alimentos)

- Botes para pesado

○ **Formulación y Composición Mineral:**

La formulación del medio de cultivo corresponde al de Murashigue y Skoog (1962), también denominada "MS", el mismo que ha sido modificado para el cultivo de orquídeas, esto es, se han reducido sus macro y micronutrientes a la mitad de la concentración recomendada por el autor. Esta formulación ha sido probada como adecuada para las tres etapas de la propagación de orquídeas (Fases I, II y III) para la germinación y el desarrollo de las orquídeas in vitro respectivamente.

○ **Procedimiento**

1. En un vaso de vidrio o de plástico de capacidad de 1 litro, medimos 500 ml de agua destilada.
2. Pesamos los componentes sólidos que requiere la preparación del medio de cultivo (azúcar, agar, carbón activado, etc).
3. Agregamos los componentes (M & S modificado), los stock A, B, G, C, D, E, F y Ac. Nicotínico y Thiamina HCl al vaso de vidrio, previamente medidos con la ayuda de la pipeta de 1, 5 y 10 ml.
4. Agregamos los componentes sólidos: sucrosa, agitar vigorosamente hasta dilución de la sucrosa.
5. Enrazamos a un litro con agua destilada en un recipiente graduado y procedemos al ajuste del pH en el rango de 5.4 a 7.3, utilizando para ello HCl 1N ó KOH 1N según sea el caso.
6. Luego del ajuste del pH se agrega el agar-agar lentamente y en agitación para evitar la formación de grumos.
7. Dispensar previa dilución del agente solidificante en los tubos de ensayo.

8. Tapar los tubos de ensayo con papel aluminio primero y luego film.
9. Para la esterilización de los medios de cultivo utilizar el método de calor húmedo en una olla autoclave, el tiempo de autoclaveado puede ser de 20 minutos a 1 atmósfera de presión.
10. Luego del autoclaveado se retiró los tubos de la autoclave cuando la presión indicada en el manómetro indique 0 se agitó lentamente los tubos para homogenizar los componentes, luego se esperó unos 10 minutos y volver a agitar, seguidamente inclinar los tubos por su lado más conveniente teniendo cuidado de no mojar el papel aluminio con el medio de cultivo ya que esto propiciará la contaminación del medio de cultivo.
11. Después de haber solidificado el medio de cultivo, se realizó la siembra de las semillas.

Tabla 1: Número de tubos de ensayo por cada tratamiento.

TRATAMIENTO	Nº DE TUBOS DE ENSAYO
T1	10
T2	10
T3	10

Fuente: Propia – 2013.

Descripción de la tabla N° 1: Se obtuvo, 10 tubos de ensayo conteniendo 10 ml de medio de cultivo para sembrar la semilla de *Phragmipedium kovachii* Atwood Dalstrom & Fernández, por cada tratamiento.

Tabla 2: Tratamientos a utilizar con sus respectivos pH.

TRATAMIENTOS	MEDIO DE CULTIVO	pH
T1	G.D (THOMALE)	7.3
T2	M.S (MURASHIGE & SKOOG)	7.3
T3	R.E (ROBERT &ERNST)	7.3

Fuente: Propia, 2013.

Etapa 3: Limpieza del Material Vegetal indehisciente.

- Se procedió a seleccionar las cápsulas en buen estado.
- A continuación se lavó el material vegetal con una escobilla pequeña suavemente limpiando la superficie de la cápsula, todo esto con agua jabonosa y luego enjuagar.
- Luego se procedió a la limpieza de la cápsula (retirar las partes muertas) las cuales deben ser removidas con bisturí N° 10 o 11 tratando de no dañar el interior de la cápsula.

Etapa 4: Preparación de la solución desinfectante para cápsulas de orquídeas.

Se preparó una solución de NaClO al 1% (20 ml de lejía comercial en 100 ml de agua destilada), con la finalidad de desinfectar el material vegetal a usar asegurando con esto que las cápsulas estén libres de agentes contaminantes para posteriormente sembrarlos usando la cámara de flujo laminar en envases que contengan medios de cultivo semisólidos.

La solución que se usa como desinfectante es la lejía comercial (Hipoclorito de Sodio al 5.25%). Para disminuir la concentración de la lejía comercial de 5.25% de NaOCl se utiliza la siguiente fórmula (**Ver anexo 3**)

Etapas 5: Apertura de cápsulas

- Previo a la apertura de las cápsulas estas se colocó a secar al aire producido por la cámara de flujo laminar.
- Se realizó dos cortes transversales en los extremos de la cápsula y tres cortes longitudinales a lo largo de las suturas de dehiscencia de tal manera que las cápsulas quedaron abiertas mostrando sus tres lóculos para una fácil extracción de las semillas.

Etapas 6: Extracción de las semillas de la cápsula.

Se procede después a transferir la cápsula a una superficie desinfectada (Placa Petri esterilizada). Con ayuda de un bisturí se hacen cortes siguiendo las líneas longitudinales en las cápsulas. Se debe utilizar una hoja de bisturí nueva para cada cápsula para prevenir la propagación de virus.

Una vez realizado el procedimiento anterior se procede a tomar con ayuda de la pinza cada segmento de la cápsula, se levanta uno de los segmentos de la cápsula con las pinzas y se golpeó ligeramente sobre la placa Petri estéril, luego se procedió a juntar las semillas con ayuda de un bisturí N°10 y se las colocó en un matraz conteniendo agua destilada estéril, remover constantemente con una cucharilla antes de cada siembra para homogeneizar la cantidad de semillas al momento de sembrarlas.

En caso de sobrar semillas, estas se colocan en un matraz pequeño con agua destilada estéril para su disposición en otro momento.

Luego se procede a sembrar las semillas en condiciones asépticas en los tres medios seleccionados Murashige y Skoog (1962), Medio Thomale (G&D) y el Medio Robert Ernst (R&E). **Fuente: Instituto Biológico de Cordilleras Orientales – INIBICO.**

Después se coloca en una placa Petri estéril, para realizar los cortes siguiendo las líneas longitudinales de la cápsula.

Etapa 7: Proceso para siembra de semillas:

Una vez obtenida las semillas se realizó la siembra con una espátula estéril, con la cual se tomó una pequeña cantidad con aproximadamente 300 semillas y se colocó sobre el medio de cultivo esparciendo suavemente dentro del tubo de ensayo de 25 x 150 mm, luego se selló con plástico, rotulando con datos de la siembra.

La cantidad de medio de cultivo que se utilizó es 10 ml por cada tubo de ensayo, posteriormente se introdujo los tubos de ensayo a la caja de incubación a una temperatura de 21 – 25 °C donde permanecerán hasta lograr que las semillas se hidraten o se coloquen en el estadio embebido.

Etapa 8: Evaluaciones de las semillas sembradas:

Las semillas fueron evaluadas en el estereoscopio semanalmente mediante un contómetro mecánico, teniendo en cuenta los estadios de ruptura de la testa hasta obtener protocormo. Se utilizaron un formato de evaluación de semillas según estadios (**Ver anexo 8**) la cual se basó en tomar una muestra en este caso un tubo de ensayo que se encuentran germinando por un periodo de tres veces a la semana.

Los estadios considerados en la evaluación de las semillas son:

ESTADÍOS	DESCRIPCIÓN
0	SEMILLAS
1	EMBEBIDO
2	ROTURA DE TESTA
3	PROTOCORMO
4	PROTOCORMO DESARROLLADO

Cuadro 2: Estadios de las semillas en su desarrollo.

Fuente: Propia, 2013.

3.5. Diseño de Investigación

En la presente investigación se utilizara el Diseño Completamente al Azar (DCA) con un factorial de 4 x 3 completamente al azar (cuatro fases de desarrollo y tres medios de cultivo) con 10 repeticiones y un promedio de 30

tubos de ensayo cada una con 300 semillas haciendo un total de 30 unidades experimentales. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar las diferencias significativas.

3.6. Población, Muestra, Muestreo

- Población

La cantidad de 15 000 semillas aproximadamente que contiene una cápsula de *Phragmipedium kovachii* A, D & F.

- Muestra

La cantidad de 100 – 300 semillas de *Phragmipedium kovachii* A, D & F, sembrados y colocados en 30 tubos de ensayo, sobre los tres diferentes medios de cultivo: R&E: Robert y Ernst, M&S: Murashige y Skoog y G&D: Thomale.

- Muestreo

Nuestro muestreo será del tipo **Muestreo probabilístico (aleatorio)**: En este tipo de muestreo, todos los individuos de la población pueden formar parte de la muestra. Por lo tanto es el tipo de muestreo que deberemos utilizar en nuestra investigación, por ser el riguroso y científico.

3.7. Técnicas e instrumentos de Recolección de Datos

✓ Técnicas

- Métodos de propagación de orquídeas a partir de semillas desarrolladas por León (1995).
- Revisión de libros virtuales referente al tema.
- Se utilizará el internet, para la búsqueda de páginas relacionada al tema.

✓ Instrumentos

- Software de sistema de información geográfica 10.3

3.8. Procedimiento de Recolección de Datos

- Revisión bibliográfica
- Se utilizará internet, para la búsqueda de páginas relacionada al tema.

3.9. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

- Procesamiento de datos y análisis estadísticos utilizando SPSS.
- Microsoft Excel 2013.

IV. RESULTADOS

4.1. Presentación de Resultados

Para la obtención de semillas de *Phragmipedium kovachii* se reconoció la planta donadora de sus genes, anotando sus características morfológicas, fisiológicas y taxonómicas.



Figura 1: Ejemplar de Orquídea *Phragmipedium kovachii* en condiciones naturales.

Fuente: Propia, 2013.

La flor permanece en la planta por cerca de 15 días. La maduración de la semilla toma entre 90 a 120 días. La especie desarrolla en suelos pedregosos con un pH ligeramente ácido a alcalino que puede llegar hasta 7.9 en un suelo de muy baja conductividad eléctrica y su análisis químico, foliar, presenta patrones de requerimientos nutricionales totalmente diferentes a otras especies del mismo género prosperando en áreas muchas veces a pocos kilómetros de distancia. **Club peruano de orquídea, Agosto (2010).**

4.1.1. Propagación por Semillas

- Se realizó la propagación a partir de la semilla de la siguiente especie: *Phragmipedium kovachii*.

Se siguieron los procedimientos para las semillas de la cápsula no dehiscente (cápsula verde).

A. PROCEDIMIENTO PARA LA SIEMBRA DE *Phragmipedium kovachii*.

La colecta se hizo luego tres meses cuando la flor se formó en cápsula, la cual se colocó en un papel suavemente para su posterior siembra.



Figura 2: Cápsula *Phragmipedium kovachii*, 7cm de largo, 90 días de maduración.

Fuente: Propia, 2013.

- Luego se procedió a la limpieza de la cápsula eliminando las partes necrótidas.

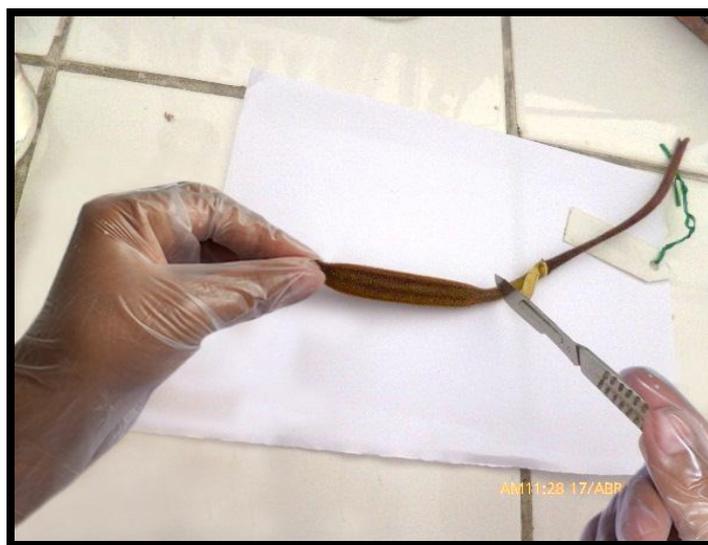


Figura 3: Cápsula *Phragmipedium kovachii* retirando las partes necrótidas

Fuente: Propia, 2013.

- Preparación de la solución desinfectante para cápsulas de orquídeas.



Figura 4: Cápsula *Phragmipedium kovachii* en solución de NaOCl al 1 %.
Fuente: Propia, 2013.

- Apertura de cápsula.



Figura 5: Cápsula *Phragmipedium kovachii* secándose en la cámara de flujo laminar.
Fuente: Propia, 2013.

- Extracción de las semillas de la cápsula..

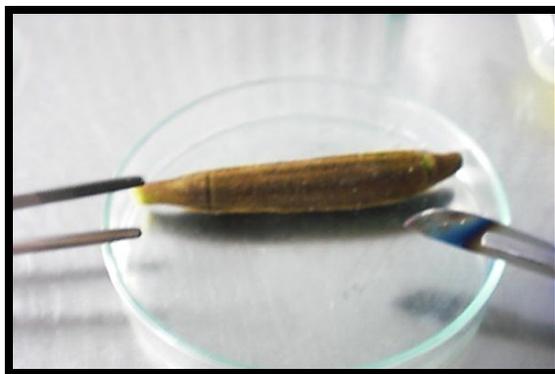


Figura 6: Cápsula *Phragmipedium kovachii* con cortes longitudinales.
Fuente: Propia, 2013.

- Segmento de la cápsula despejada.



Figura 7: Cápsula *Phragmipedium kovachii* con el segmento despejado.
Fuente: Propia, 2013.

- Semillas retiradas para ser sembradas



Figura 8: Cápsula *Phragmipedium kovachii* con las semillas retiradas, listas para la siembra.
Fuente: Propia, 2013.

- Siembra de semillas sobre el medio de cultivo



Figura 9: Semillas de *Phragmipedium kovachii* dispersando sobre el medio de cultivo. Fuente: Propia, 2013.

- Sellando y rotulando el tubo de ensayo.



Figura 10: Tubos de ensayos rotulados y sellados listos para la caja de incubación.
Fuente: Propia, 2013.



Figura 11: Tubos de ensayos rotulados y sellados dentro de la caja de incubación.
Fuente: Propia, 2013.

B. INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO

Una vez concluida la siembra se ubicó los tratamientos de forma aleatoria con sus respectivas repeticiones.

Cada gradilla contienen los 10 tubos de ensayo por tratamiento debidamente rotulados con la fecha de siembra y pH.

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

Repeticiones
(Tubos de
ensayo)

Cuadro N° 3: Tratamiento I=MS, ph 7.3
Fuente: Propia, 2013

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

Cuadro N° 4: Tratamiento II=GD, ph 7.3
Fuente: Propia, 2013

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

Cuadro N°5: Tratamiento III=RE, ph 7.3
Fuente: Propia, 2013

C. GRÁFICA DE LOS ESTADÍOS DE LAS SEMILLAS

La semilla de las orquídeas es muy pequeña, entre 0.4 y 1.25 mm de longitud, consiste de un embrión indiferenciado suspendido dentro de una estructura reticulada (la testa) y rodeado de un gran volumen de aire.

- ✓ Lo que a continuación se muestran son los estadios graficados que sirvieron para la evaluación durante el desarrollo embrionario de la semilla de *Phragmipedium kovachii*, con la ayuda de un estereoscopio.

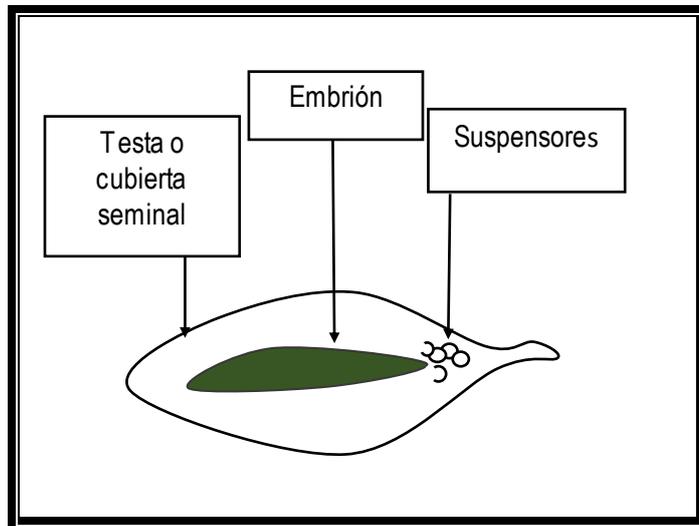


Figura 12: Partes de la semilla *Phragmipedium kovachii*

- En el estadio cero se muestra el embrión pequeño porque aún está en el inicio de su desarrollo.

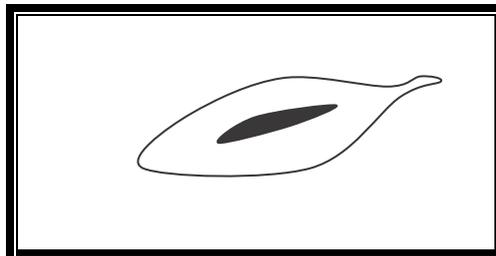


Figura 13: Semilla en estadio 0.

- En el estadio uno se muestra que el embrión pequeño, este va absorbiendo nutrientes del medio de cultivo la cual permite el inicio de su desarrollo y por lo tanto el crecimiento del embrión.

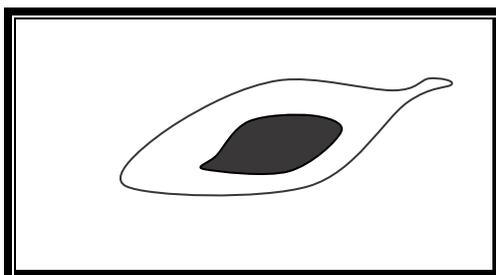


Figura 14: Semilla en estadio 1, embrión embebido.

- En el estadio dos se muestra que el embrión ya alcanzó su desarrollo hasta romper la cubierta seminal o testa.

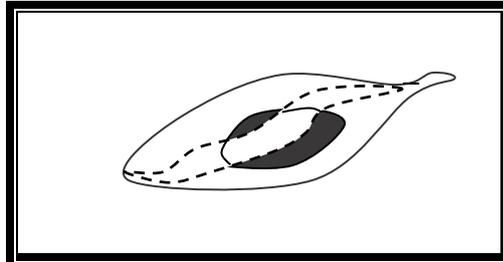


Figura 15: Semilla en estadio 2, ruptura de testa

- En el estadio tres el embrión alcanzó su fase de protocormo aumentando de tamaño y mostrando una característica de coloración verde.

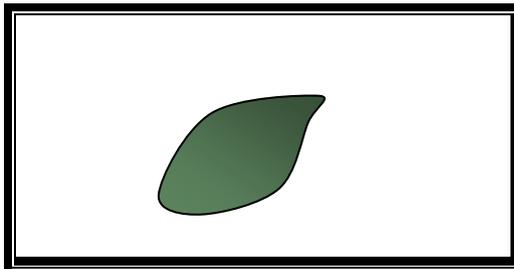


Figura 16: Semilla en estadio 3, protocormo

- En el estadio cuatro el embrión ya casi alcanzó su fase de protocormo mostrando una característica de coloración verde para la formación de sus raíces, tallo y hojas terminando así su desarrollo de semilla.

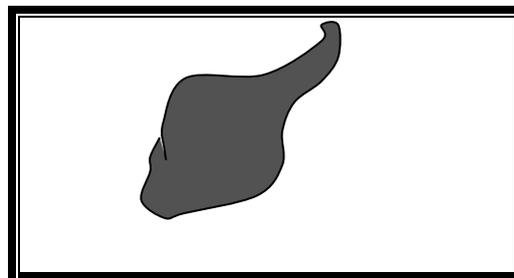


Figura 17: Semilla en estadio, protocormo desarrollado

- **Partes del protocormo:** el embrión se desarrolló rompiendo eventualmente la testa, para luego formar un cono llamado protocormo.

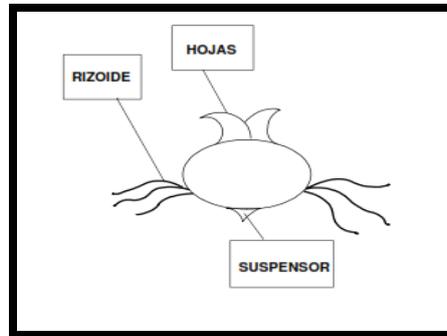


Figura 18: Protocormo desarrollado.

D. EVALUACIÓN DE LAS SEMILLAS SEMBRADAS DE *Phragmipedium kovachii*.

- CONTEO:** Procedimiento para el conteo de las semillas de una cápsula de *Phragmipedium kovachii*.

1. Después de la siembra se esperó una semana para realizar la evaluación.
2. La primera evaluación se cogió al azar 5 tubos de ensayo de cada tratamiento conteniendo la muestra para su respectivo conteo.
3. Cada muestra se colocó en el estereoscopio a una distancia de 1.5 X 10.

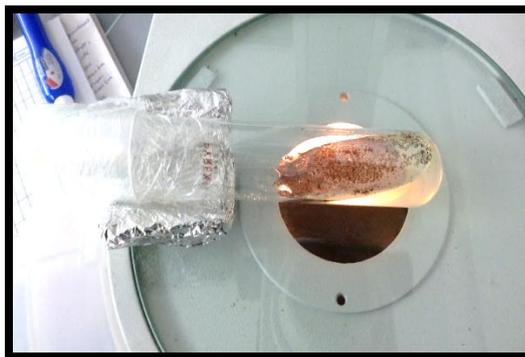
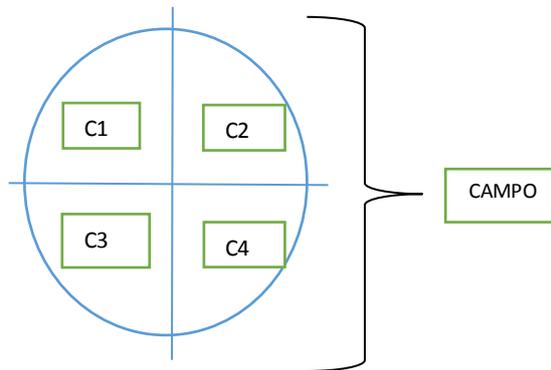


Figura 19: Tubo de ensayo conteniendo las semillas del tratamiento M & S ubicado en el estereoscopio.

Fuente: Propia, 2013.

4. Una vez colocado la muestra se dividió visualmente en un campo y cuatro cuadrantes la parte de la muestra para facilitar el conteo.



Leyenda:

C1: Cuadrante 1

C2: Cuadrante 2

C3: Cuadrante 3

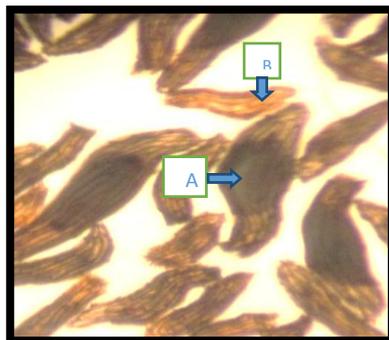
C4: Cuadrante 4

5. Para el conteo se utilizó un contómetro mecánico, con la cual se pudo calcular que existe un promedio de 100 a 300 semillas por tubo de ensayo, formando un total de 1200 semillas aproximadamente.

E. VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS SEMBRADAS DE *Phragmipedium kovachii*.

La viabilidad de las semillas se evaluó en el microscopio a un aumento de 100 x donde se tomó 5 muestras de cada tratamiento donde se realizó el recuento visualmente de semillas viables y no viables, usando la siguiente fórmula para el porcentaje de viabilidad, obteniendo de 96% viable de 100 semillas por tubo de ensayo.

$$\%Viabilidad = \frac{\text{Total de semillas viables}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$



A = Semilla viable.

B = Semilla no viable.

Figura 20: Viabilidad

Fuente: Propia, 2013

F. PORCENTAJE DE GERMINACION DE LAS SEMILLAS SEMBRADAS DE *Phragmipedium kovachii*.

Se evaluó el porcentaje de germinación a cabo de 4 semanas donde se tomó 10 tubos al azar de cada tratamiento en la cual se hizo el recuento total de 150 semillas germinadas de 200 semillas por tubo , en este caso fue con un porcentaje de 75 % de germinación.

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{Total de semillas germinadas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

G. CONTAMINACIÓN

Se evaluó presencia de microorganismos, esto a los 20 días después de la siembra, donde se obtuvo que un 20% estaban contaminadas y un 80% estaban en buen estado debido a la acción de algún patógeno, el cual se necesario eliminar los tubos contaminados.

$$\% \text{Contaminación} = \frac{\text{Total de tubos contaminados}}{\text{Total de tubos}} \times 100$$

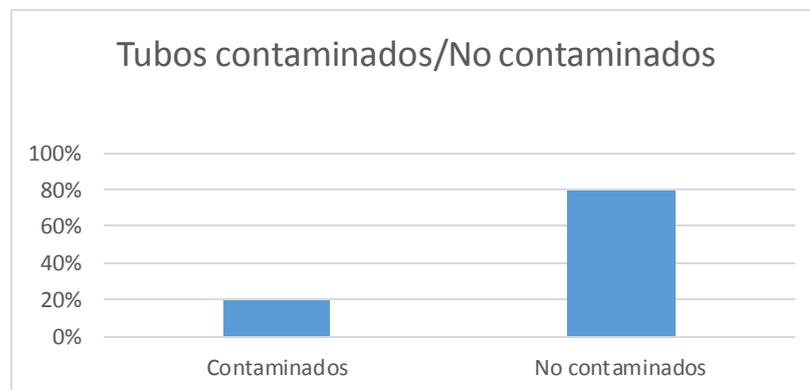


Grafico 1: Tubos contaminados y no contaminados, evaluado a los 20 días después de la siembra.
Fuente: Propia ,2013.

❖ **PROMEDIOS DE SEMILLAS DESARROLLADAS SEGÚN ESTADIOS DEL TRATAMIENTO I G & D(THOMALE)**

Tabla 3: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 1- Mes1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 1 - MES 1.							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P. DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		23.13	0.00	0.00	0.00	0.00
	2		26.13	0.00	0.00	0.00	0.00
	3		24.88	0.00	0.00	0.00	0.00
	4		23.75	0.00	0.00	0.00	0.00
	5		22.88	0.00	0.00	0.00	0.00
	6		24.38	0.00	0.00	0.00	0.00
	7		23.88	0.00	0.00	0.00	0.00
	8		24.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	9		24.63	0.00	0.00	0.00	0.00
	10		24.38	0.00	0.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		24.20	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 3: La tabla muestra la primera semana del mes 1, donde se obtuvo en el estadio 0 – semilla un 24.20 de promedio de semillas que aún no se muestra desarrollado.

Tabla 4: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 2- Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 2 - MES 1.							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P. DESARROL LADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		14.13	9.00	0.00	0.00	0.00
	2		20.50	5.63	0.00	0.00	0.00
	3		15.13	9.75	0.00	0.00	0.00
	4		16.62	7.13	0.00	0.00	0.00
	5		13.25	9.63	0.00	0.00	0.00
	6		14.88	9.50	0.00	0.00	0.00
	7		13.88	10.00	0.00	0.00	0.00
	8		15.50	8.50	0.00	0.00	0.00
	9		14.63	10.00	0.00	0.00	0.00
	10		16.25	8.13	0.00	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			15.47	8.72	0.00	0.00	0.00

Descripción de la tabla 4: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 2 del mes 1 donde se obtuvo en el estadio embebido un promedio de 8.72 la cual significa que la semillas en etapa de hidratación cada vez va siendo mayor.

Tabla 5: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 3 –Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 3 - MES 1.							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P. DESARROLLA DO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		5.13	18.00	0.00	0.00	0.00
	2		14.87	9.96	1.30	0.00	0.00
	3		5.38	17.50	2.00	0.00	0.00
	4		9.49	12.26	2.00	0.00	0.00
	5		3.62	19.26	0.00	0.00	0.00
	6		5.38	19.00	0.00	0.00	0.00
	7		3.88	20.00	0.00	0.00	0.00
	8		7.00	15.00	2.00	0.00	0.00
	9		4.63	20.00	0.00	0.00	0.00
	10		8.12	16.26	0.00	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			6.74	16.72	0.73	0.00	0.00

Fuente:Propia, 2013.

Descripción de la tabla 5:La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 3 del mes 1 donde se obtuvo en el estadio embebido un promedio de 16.72 la cual resume que las semillas conforme van hidratándose van pasando al estadio 2 ruptura de testa con un promedio de 0.73.

Tabla 6: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 4 – MES 1.							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P. DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		5.00	15.00	3.13	0.00	0.00
	2		13.10	7.00	4.03	0.00	0.00
	3		4.44	16.44	4.00	0.00	0.00
	4		8.00	11.05	4.25	0.00	0.00
	5		2.00	10.88	10.00	0.00	0.00
	6		4.00	11.38	9.00	0.00	0.00
	7		2.00	16.62	5.26	0.00	0.00
	8		5.00	14.00	5.00	0.00	0.00
	9		7.00	15.25	2.38	0.00	0.00
	10		6.00	15.38	3.00	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			5.65	13.3	5.05	0.00	0.00

Fuente:Propia, 2013.

Descripción de la tabla 6:La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 4 del mes 1 donde se obtuvo un promedio de 5.05 en el estadio de ruptura de testa la cual significa que va aumentando su desarrollo.

Tabla 7: Tratamiento Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 1 – MES 2.							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P. DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		3.67	11.50	7.96	0.00	0.00
	2		5.67	6.75	13.71	0.00	0.00
	3		3.50	10.25	11.13	0.00	0.00
	4		4.00	10.50	9.25	0.00	0.00
	5		1.33	9.00	12.55	0.00	0.00
	6		4.50	8.00	11.00	0.00	0.00
	7		1.50	10.63	11.75	0.00	0.00
	8		4.67	8.63	10.70	0.00	0.00
	9		4.33	13.00	7.30	0.00	0.00
	10		5.50	11.75	7.13	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ESTADÍO		3.86	10.30	10.32	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 7: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 1 del mes 2 donde el estadio 0 semilla va disminuyendo debido a que en los estadios 1y2 va aumentando su desarrollo.

Tabla 8: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 2 – MES 2.							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		2.00	10.63	10.50	0.00	0.00
	2		2.33	6.00	17.80	0.00	0.00
	3		2.00	8.00	14.88	0.00	0.00
	4		3.00	7.50	13.25	0.00	0.00
	5		0.00	7.86	15.00	0.00	0.00
	6		3.00	7.75	13.63	0.00	0.00
	7		0.50	9.13	14.25	0.00	0.00
	8		3.70	8.75	11.55	0.00	0.00
	9		3.93	11.50	9.20	0.00	0.00
	10		4.60	10.63	9.15	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		2.27	8.50	13.12	0.00	0.00

Fuente:Propia, 2013.

Descripción de la tabla 8:La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 2 del mes 2 donde el estadio 0 semilla va disminuyendo debido a que en el estadio 2 va aumentando la rotura de testa.

Tabla 9: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 3 – MES 2.							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTODOR MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		1.00	9.86	12.27	0.00	0.00
	2		2.00	5.86	18.27	0.00	0.00
	3		2.00	5.17	17.71	0.00	0.00
	4		2.00	8.83	12.92	0.00	0.00
	5		0.00	6.36	16.52	0.00	0.00
	6		2.50	5.57	16.31	0.00	0.00
	7		0.00	8.00	15.88	0.00	0.00
	8		2.50	7.38	14.12	0.00	0.00
	9		2.80	9.38	12.45	0.00	0.00
	10		3.00	9.50	11.88	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ESTADÍO		1.64	7.37	15.15	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 9: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadíos en la semana 3 del mes 2 donde en el estadio 2 se obtiene un promedio de 15.15.

Tabla 10: Tratamiento I Thomale (G & D) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 4 – MES 2							
			ESTADIO				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCOLOR MO	P DESARROLLA DO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T 1=GD	1		0.00	8.13	12.50	2.50	0.00
	2		1.00	4.25	17.88	3.00	0.00
	3		1.00	4.00	17.88	2.00	0.00
	4		1.00	6.60	10.15	6.00	0.00
	5		0.00	5.88	15.00	2.00	0.00
	6		1.80	4.00	15.58	3.00	0.00
	7		0.00	7.80	15.08	1.00	0.00
	8		1.90	6.38	14.72	1.00	0.00
	9		1.50	8.25	12.38	2.50	0.00
	10		2.80	8.50	12.08	1.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			0.91	6.59	14.57	2.40	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 10: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 4 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 2.40 en el estadio 3, la cual se resume que en dos meses comenzó el desarrollo de los Protocormos con el Tratamiento I Thomale (G & D).

❖ **PROMEDIOS DE SEMILLAS DESARROLLADAS SEGÚN ESTADIOS DEL TRATAMIENTO II M&S (MURASHIGE & SKOOG).**

Tabla 11: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 1 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCOLOR MO	P DESARROLLADO
TARATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T II = M S	1		22.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2		25.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3		23.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	4		20.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5		25.20	0.00	0.00	0.00	0.00
	6		21.75	0.00	0.00	0.00	0.00
	7		22.50	0.00	0.00	0.00	0.00
	8		23.75	0.00	0.00	0.00	0.00
	9		22.88	0.00	0.00	0.00	0.00
	10		20.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		22.61	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 11: La tabla promedios de las semillas según los estadios en la semana 1 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 22.61 el estadio 0.

Tabla 12: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 2 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTODORMO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T II = M S	1		16.00	6.00	0.00	0.00	0.00
	2		19.00	6.00	0.00	0.00	0.00
	3		19.00	4.00	0.00	0.00	0.00
	4		11.00	9.00	0.00	0.00	0.00
	5		18.20	7.00	0.00	0.00	0.00
	6		18.75	3.00	0.00	0.00	0.00
	7		17.50	5.00	0.00	0.00	0.00
	8		16.75	7.00	0.00	0.00	0.00
	9		20.88	2.00	0.00	0.00	0.00
	10		17.00	3.00	0.00	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			17.45	5.44	0.00	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 12: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 2 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 5.44 en el estadio 1, la cual se resume que la semana 2 del mes 1 comenzó a mostrarse un aumento de semillas hidratadas.

Tabla 13: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 3 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCOL MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
	1		10.00	12.00	0.00	0.00	0.00
	2		13.00	12.00	0.00	0.00	0.00
	3		15.00	8.00	0.00	0.00	0.00
	4		2.00	18.00	0.00	0.00	0.00
	5		11.20	14.00	0.00	0.00	0.00
	6		15.75	6.00	0.00	0.00	0.00
	7		12.50	10.00	0.00	0.00	0.00
	8		9.75	14.00	0.00	0.00	0.00
	9		18.88	4.00	0.00	0.00	0.00
	10		14.00	6.00	0.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		12.01	10.89	0.00	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 13: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 3 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 12.01 en el estadio 1, la cual se resume que la semana 3 del mes 1 comenzó a mostrarse un aumento de semillas hidratadas.

Tabla 14: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 4 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCOLORMO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T II = M S	1		6.00	15.00	1.00	0.00	0.00
	2		9.00	15.00	1.00	0.00	0.00
	3		7.00	16.00	1.00	0.00	0.00
	4		1.00	19.00	0.00	0.00	0.00
	5		10.00	15.20	0.00	0.00	0.00
	6		12.00	8.75	1.00	0.00	0.00
	7		6.00	15.50	1.00	0.00	0.00
	8		8.00	15.75	0.00	0.00	0.00
	9		10.00	12.88	0.00	0.00	0.00
	10		8.00	12.00	0.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		7.60	14.78	1.00	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 14: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 3 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 1.00 en el estadio 2, la cual se resume que la semana 4 del mes 1 comenzó a mostrarse el desarrollo de semillas hidratadas pasando al estadio 3 ruptura de testa.

Tabla 15: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 1 – MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTODOR MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T II = M S	1		5.75	15.25	1.00	0.00	0.00
	2		8.14	15.86	1.00	0.00	0.00
	3		5.80	16.20	1.00	0.00	0.00
	4		0.96	19.04	0.00	0.00	0.00
	5		9.60	14.60	1.00	0.00	0.00
	6		10.00	10.75	1.00	0.00	0.00
	7		5.80	16.70	1.00	0.00	0.00
	8		7.38	16.37	0.00	0.00	0.00
	9		9.50	13.38	0.00	0.00	0.00
	10		6.75	12.25	1.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTDÍO		6.99	15.35	0.67	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 15: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 1 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 0.67 en el estadio 2, la cual se resume que la semana del mes 1 comenzó a mostrarse el desarrollo de semillas hidratadas pasando al estadio 3 ruptura de testa.

Tabla 16: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 2 – MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTODOR MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T II = M S	1		4.60	16.40	1.00	0.00	0.00
	2		7.63	16.37	1.00	0.00	0.00
	3		4.70	18.30	0.00	0.00	0.00
	4		0.78	19.22	0.00	0.00	0.00
	5		8.25	15.95	1.00	0.00	0.00
	6		9.57	12.18	1.00	0.00	0.00
	7		4.29	17.21	1.00	0.00	0.00
	8		6.17	17.58	1.00	0.00	0.00
	9		8.50	13.38	1.00	0.00	0.00
	10		5.73	13.27	1.00	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			6.02	16.06	0.77	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 16: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 2 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 0.77 en el estadio 2, la cual se resume que la semana 2 del mes 2 comenzó a mostrarse mayor desarrollo de semillas hidratadas.

Tabla 17: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 3 – MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTODORMO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T II = M S	1		3.00	18.00	1.00	0.00	0.00
	2		6.50	17.50	1.00	0.00	0.00
	3		3.70	18.30	1.00	0.00	0.00
	4		0.88	18.12	1.00	0.00	0.00
	5		7.25	16.95	1.00	0.00	0.00
	6		9.00	11.75	1.00	0.00	0.00
	7		3.88	17.62	1.00	0.00	0.00
	8		5.50	17.25	1.00	0.00	0.00
	9		7.00	14.88	1.00	0.00	0.00
	10		4.00	15.00	1.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		5.07	16.53	1.00	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 17: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 3 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 1.00 en el estadio 2, la cual se resume que la semana 3 del mes 2 comenzó a mostrarse mayor desarrollo de semillas hidratadas minorando la cantidad de semillas del estadio 0.

Tabla 18: Tratamiento M&S (MURASHIGE & SKOOG) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 4 – MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTODORMO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
T II = M S	1		2.00	17.00	1.00	2.00	0.00
	2		5.25	17.75	1.00	1.00	0.00
	3		2.88	18.12	1.00	1.00	0.00
	4		0.13	18.87	1.00	0.00	0.00
	5		6.50	17.70	1.00	0.00	0.00
	6		8.13	9.62	1.00	3.00	0.00
	7		2.38	19.12	1.00	0.00	0.00
	8		4.50	16.25	1.00	2.00	0.00
	9		5.75	14.13	1.00	2.00	0.00
	10		3.63	15.37	1.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTDÍO		4.16	16.50	1.00	1.83	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 18: La tabla promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 4 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 1.83 en el estadio 3, la cual se resume que la semana 4 del mes 2 comenzó el desarrollo de semillas en la fase Protocornico.

❖ **PROMEDIOS DE SEMILLAS DESARROLLADAS SEGÚN ESTADIOS DEL TRATAMIENTO II R&E (ROBERT & ERNTS).**

Tabla 19: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 1 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTECTOR MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		20.38	0.00	0.00	0.00	0.00
	2		13.88	0.00	0.00	0.00	0.00
	3		20.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	4		13.13	0.00	0.00	0.00	0.00
	5		20.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6		22.63	0.00	0.00	0.00	0.00
	7		24.75	0.00	0.00	0.00	0.00
	8		19.50	0.00	0.00	0.00	0.00
	9		27.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	10		29.63	0.00	0.00	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			21.09	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 19: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 1 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 21.09 en el estadio de semilla.

Tabla 20: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 2 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTODOR MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		16.88	3.50	0.00	0.00	0.00
	2		8.08	4.80	1.00	0.00	0.00
	3		13.50	6.50	0.00	0.00	0.00
	4		5.83	4.30	1.00	0.00	0.00
	5		11.50	8.50	0.00	0.00	0.00
	6		11.50	11.13	0.00	0.00	0.00
	7		15.60	9.15	0.00	0.00	0.00
	8		10.60	8.90	0.00	0.00	0.00
	9		19.40	7.60	0.00	0.00	0.00
	10		20.51	9.12	0.00	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			13.19	7.45	0.20	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 20: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 2 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 0.20 en el estadio 2, la cual se resume que la semana 2 del mes 1 comenzó el desarrollo de semillas en estadio 2.

Tabla 21: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 3 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTECTOR MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		14.88	4.50	1.00	0.00	0.00
	2		7.88	5.00	1.00	0.00	0.00
	3		11.50	7.00	1.50	0.00	0.00
	4		7.13	5.00	1.00	0.00	0.00
	5		10.00	9.00	1.00	0.00	0.00
	6		10.33	12.30	0.00	0.00	0.00
	7		14.50	10.25	0.00	0.00	0.00
	8		10.30	9.20	0.00	0.00	0.00
	9		18.40	8.60	0.00	0.00	0.00
	10		19.33	10.30	0.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		12.42	8.12	0.35	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 21: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 3 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 0.35 en el estadio 2, la cual se resume que la semana 3 del mes 1 el desarrollo de semillas en estadio 2 va aumentando.

Tabla 22: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 1 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 4 – MES 1							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P DESARROLLA DO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		10.63	8.75	1.00	0.00	0.00
	2		2.25	10.63	1.00	0.00	0.00
	3		8.30	10.50	1.20	0.00	0.00
	4		3.50	8.13	1.50	0.00	0.00
	5		6.37	12.63	1.00	0.00	0.00
	6		6.88	14.75	1.00	0.00	0.00
	7		13.75	11.00	0.00	0.00	0.00
	8		9.12	10.38	0.00	0.00	0.00
	9		13.00	12.00	2.00	0.00	0.00
	10		16.13	11.50	2.00	0.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		8.99	11.03	1.07	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 22: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 4 del mes 1 donde se obtiene un promedio de 1.07 en el estadio 2, la cual se resume que la semana 4 del mes 1 el desarrollo de semillas en estadio 2 va aumentando rápidamente y las semillas en estadio 1 va disminuyendo debido a su evolución en su desarrollo.

Tabla 23: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 1 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 1- MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCOL MO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		9.60	8.11	2.67	0.00	0.00
	2		1.98	8.90	3.00	0.00	0.00
	3		5.23	11.52	3.25	0.00	0.00
	4		2.30	7.83	3.00	0.00	0.00
	5		4.50	11.62	3.88	0.00	0.00
	6		4.60	14.70	3.33	0.00	0.00
	7		8.90	13.85	2.00	0.00	0.00
	8		7.56	9.94	2.00	0.00	0.00
	9		9.30	13.70	4.00	0.00	0.00
	10		10.00	16.96	2.67	0.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			6.40	11.71	3.98	0.00	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 23: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 1 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 11.71 en el estadio 1, la cual indica aumento de semillas hidratadas para su posterior desarrollo en el estadio 2.

Tabla 24: Tratamiento R&E (ROBERT & ERNTS) Resultado de la evaluación en la Semana 2 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 2- MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		8.60	7.78	3.00	1.00	0.00
	2		1.50	7.88	3.50	1.00	0.00
	3		4.50	11.50	2.50	1.50	0.00
	4		2.00	5.93	3.20	2.00	0.00
	5		4.00	10.00	4.00	2.00	0.00
	6		3.90	13.63	2.60	2.50	0.00
	7		7.50	12.55	2.20	2.50	0.00
	8		6.80	8.13	2.57	2.00	0.00
	9		8.90	14.35	1.75	2.00	0.00
	10		9.30	17.33	2.00	1.00	0.00
	PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO		5.70	10.91	2.73	1.75	0.00

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 24: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 2 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 1.75 en el estadio 3, la cual indica el comienzo de su desarrollo en dicho estadio.

Tabla 25: Tratamiento R&E (**ROBERT & ERNTS**) Resultado de la evaluación en la Semana 3 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 3- MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCO RMO	P DESARROLLA DO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		5.80	4.78	3.00	1.00	0.00
	2		0.50	8.38	3.50	1.00	0.00
	3		3.90	8.60	2.00	1.60	0.00
	4		1.95	4.03	3.20	2.00	0.00
	5		3.50	7.00	4.00	2.00	0.00
	6		3.00	11.13	3.00	2.50	0.00
	7		5.50	9.05	2.20	2.50	0.00
	8		4.80	4.70	3.20	2.00	0.00
	9		3.90	15.45	1.75	2.00	0.00
	10		2.30	21.03	2.00	2.00	0.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			3.52	9.41	2.79	1.86	0.00

Fuente: Propia, 2013.

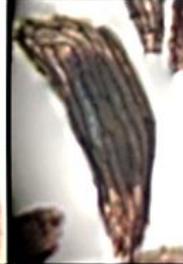
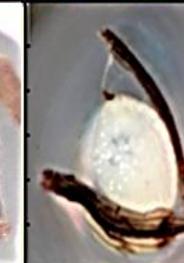
Descripción de la tabla 25: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 3 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 1.86 en el estadio 3, la cual indica el aumento de su desarrollo en dicho estadio.

Tabla 26: Tratamiento R&E (**ROBERT & ERNTS**) Resultado de la evaluación en la Semana 4 – Mes 2 después de su siembra.

PROMEDIO TOTAL DE SEMILLA POR TRATAMIENTO SEMANA 4 – MES 2							
			ESTADIOS				
			SEMILLA	EMBEBIDO	RUPTURA DE TESTA	PROTOCORMO	P DESARROLLADO
TRATAMIENTO	TUBOS	DESCRIPCION	0	1	2	3	4
III = R.E	1		3.80	4.75	8.13	2.20	1.50
	2		0.00	4.25	6.00	2.13	1.50
	3		1.90	6.48	6.38	2.57	2.67
	4		0.95	2.33	3.25	2.60	4.00
	5		1.80	0.70	10.00	2.50	5.00
	6		2.00	7.88	9.75	2.00	1.00
	7		3.50	11.57	5.43	2.75	1.50
	8		2.80	4.97	7.83	2.40	1.50
	9		2.90	11.32	9.38	2.40	1.00
	10		1.00	14.25	11.13	2.25	1.00
PROMEDIO TOTAL/ ESTADÍO			2.06	6.84	7.72	2.38	2.07

Fuente: Propia, 2013.

Descripción de la tabla 26: La tabla muestra datos promedios del crecimiento de las semillas según los estadios en la semana 4 del mes 2 donde se obtiene un promedio de 2.07 en el estadio 4, la cual indica el comienzo de su desarrollo en dicho estadio posteriormente formar Protocormos desarrollados y obtener una plántula.

TRATAMIENTOS	MES 1				MES 2			
	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4
TRATAMIENTO I= M.S								
TRATAMIENTO II= G.D								
TRATAMIENTO III= R.E								

Fuente: Propia, 2013.

Figura 21: Secuencia de desarrollo de semillas *Phragmipedium kovachii* mostrando los diferentes estadios durante dos meses de evaluación.

Tabla 27: Análisis de varianza de datos transformados Raíz (x+0.5), de la rotura de testa a los 30 días.

Fuente de Variabilidad	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Factor calculado	Significancia
Medios de cultivo	2	122,1317	61,06585	105,11	**
Error	27	15,6863	0,58097407		
Total	29	137,818			

Fuente: Propia, 2013

** : Altamente significativo

* : Significativo

ns: no significativo

R2: 88.61%

C.V: 20.33%

Media: 3.74

Tabla 28: Promedio de germinación por tubo de cada medio de cultivo

DUNCAN (0,05)	Medios de cultivo	Rotura de testa / Tubo
A	Medio RE	6,497
B	Medio GD	3,034
C	Medio MS	1,712

Fuente: Propia, 2013

DESCRIPCIÓN: En la tabla 27 del análisis de varianza de datos transformados raíz (x+0.5), de la rotura de testa de semillas de orquídea a los 30 días, nos indica que existe alta significancia estadística en esta evaluación, es decir que uno de los medios de cultivo R&E en estudio, induce a la rotura de testa en mayor número que los demás medios. Este resultado en base al diseño estadístico DCA, muestra un grado de confiabilidad de 88.61%. En cuando al coeficiente de variabilidad obtenido es alto para trabajos de laboratorio siendo de 20.33%, lo que nos indica que existió una alta heterogeneidad en las contabilizaciones en cada tubo de cada medio estudiado. Pero que aun así marcan la diferencia estadística entre medios.

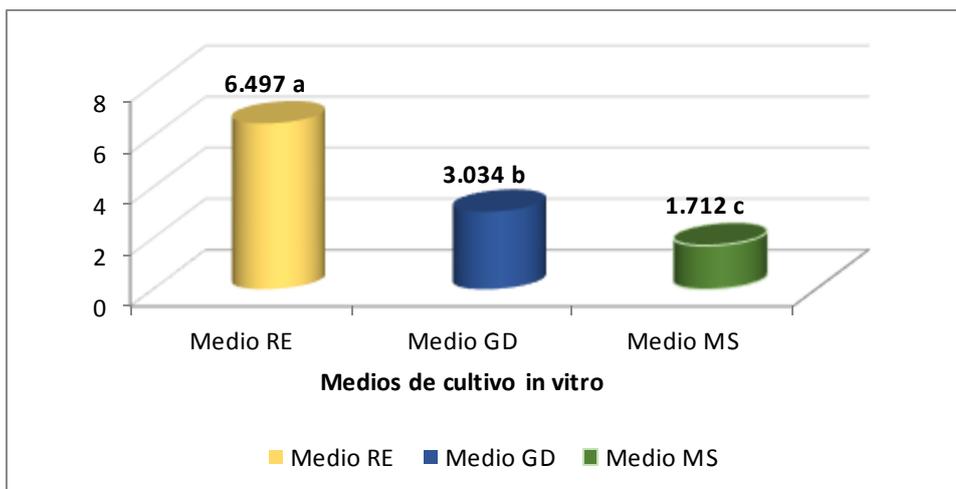


Grafico 2: Prueba de Duncan para datos transformados de raíz ($x+0.5$), de la rotura de testa a los 30 días.

Fuente: Propia, 2013

DESCRIPCIÓN: En el grafico 2 de la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5%, nos muestra el medio de cultivo que presento un alto promedio de semillas en la etapa de rotura de testa por tubo, siendo el medio R&E con un promedio por tubo de 6.49, según los datos transformados raíz $x-0.5$, seguido del medio G&D, con un promedio de 3.03 y el medio M&S con 1.71, semillas con rotura de testa por tubo. Estos resultados reaccionan al contenido nutricional del medio en donde fueron sembrados.

Tabla 29: Análisis de varianza de datos transformados Raíz ($x+1$), de la formación de protocormos a los 60 días.

Fuente de Variabilidad	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Factor Calculado	Significancia
Medios de cultivo	2	24,7016	12,3508	214,50	**
Error	27	1,554618	0,05757844		
Total	29	26,256218			

Fuente: Propia, 2013

** : Altamente significativo

* : Significativo

ns : no significativo

R²: 94.08%

C.V: 9.94%

Media: 2.41

Tabla 30: Promedio de germinación por tubo de cada medio de cultivo

DUNCAN	Medios de cultivo	Protocormos / Tubo
A	Medio RE	3,69
B	Medio GD	1,77
C	Medio MS	1,60

Fuente: Propia, 2013

DESCRIPCION: En el cuadro 29 del análisis de varianza para los datos transformados de formación de protocormos a los 60 días, de semillas de orquídea, en tres medios de cultivos, nos indica que existe alta significancia en los resultados, es decir que en uno de los medios utilizados se ha logrado obtener la formación de estructuras Protocormico. El diseño que sustenta esta afirmación tiene un 94.08% de confiabilidad, y la variabilidad existente fue de 9.94% que nos indica que entre las semillas evaluadas en cada tubo existió poca heterogeneidad a la hora de toma de datos. Con esto afirmamos que uno de los medios estudiados promueve la formación de protocormos de orquídea. Para conocer identificar el medio de cultivo que genera la significancia se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan.

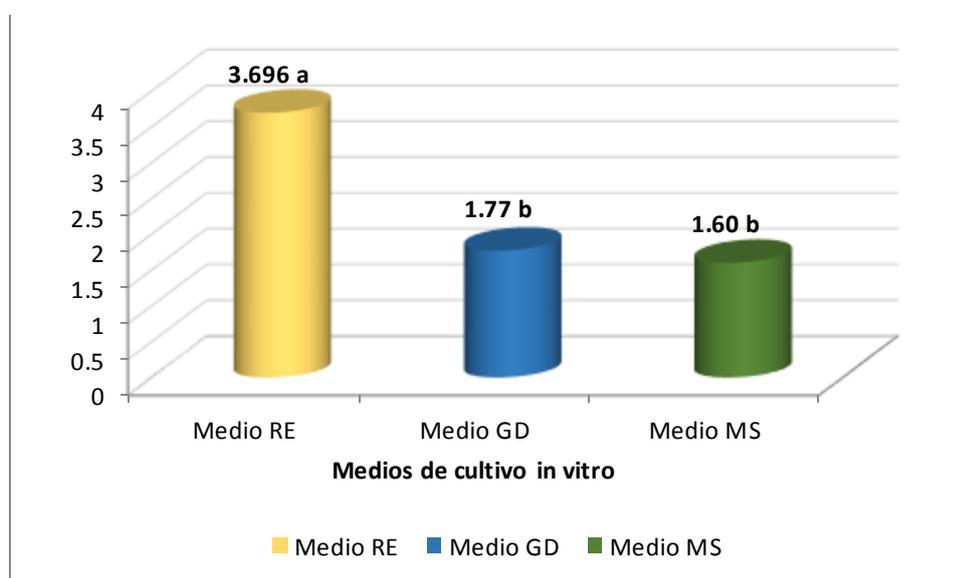


Gráfico 3: Prueba de Duncan para datos transformados de raíz (x+1), de la formación de protocormos a los 60 días

Fuente: Propia, 2013

DESCRIPCIÓN: En el gráfico 3 de los datos transformados para la formación de protocormos a los 60 días, de la prueba de Duncan al 5%, nos muestra que el medio de cultivo R&E, obtuvo el promedio más alto en cuanto a las semillas en fase de protocormo, siendo de 3.69 siendo significativo diferente a los demás medios de cultivo in vitro. El orden de los resultados del efecto de los medios de cultivo es en orden descendente

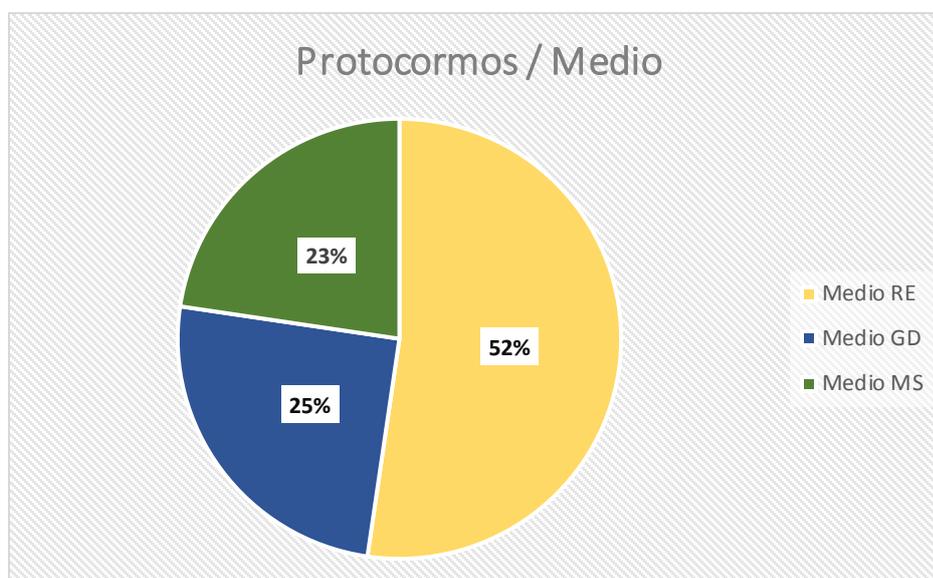


Gráfico 4: Porcentaje final de protocormos desarrollados a los 2 meses según medio de cultivo

Fuente: propia 2013

DESCRIPCIÓN: En el gráfico 4 el máximo de germinación alcanzado para la especie fue el medio de cultivo R&E de 52%, considerándose un porcentaje de germinación relativamente alto donde las semillas alcanzan un desarrollo de protocormo lo que indica que los componentes nutricionales de este medio son más efectivos para las semillas.

4.2. Discusión

1. Para el presente trabajo, la baja germinación de las semillas de *Phragmipedium kovachii* in vitro en el medio M&S y G&D pudo deberse a factores diversos, entre ellos a que no todas las semillas de una cápsula se

forman completamente o son fértiles y sólo germinan aquellas con un embrión viable según menciona Arditti y Ghani, en el año 2000. También, en muchos casos el embrión es muy pequeño con relación a la testa por lo que el volumen de la semilla puede estar ocupado por un 96 % de aire según menciona Arditti en el año 1992 y la humedad no llega al embrión.

2. De acuerdo a los cuadros de promedios que se evaluaron se pudo observar la rapidez de la germinación de las semillas que logró el medio R&E en la cual la rotura de testa se observó a la segunda semana del mes 1 y la formación de protocormo se observó a la segunda semana del mes 2 demostrando protocormos desarrollados a la cuarta del mes 2, a comparación de los dos tratamientos M&S Y G&D; la rotura de testa del primer tratamiento de G&D se observó a la tercera semana del mes 1 y la formación de protocormo se observó a la cuarta semana del mes 2; la rotura de testa del primer tratamiento de M&S se observó a la cuarta semana del mes 1 y la formación de protocormo se observó a la cuarta semana del mes 2, la germinación que fue más efectiva debe a que el factor que ayudó a la germinación fueron cultivados en el laboratorio de cultivo a una temperatura de fue 20°C, humedad relativa de 50 % y con un fotoperiodo de luz de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Referente al tiempo de germinación de las semillas, se menciona que pueden germinar de 40 a 70 días, gracias a los medios de cultivo empleados y las condiciones ambientales, esto conforme lo mencionado por Donayre en el año 2000.
3. La contaminación se evaluó después de 20 días después de la siembra se encontró 20 % de contaminación y 80% no contaminadas, las cuales fueron afectadas por hongos o algún patógeno que aparecen durante el proceso de siembra, es por eso que es necesario tomar medidas de asepsia durante la siembra. Donayre (2000) indica que el material también puede contener algunos patógenos que afectan a la germinación de las semillas, para los cuales es necesario utilizar algún desinfectante como hipoclorito de sodio o alcohol en concentraciones mínimas (0.1-0.5%).

CONCLUSIONES

1. La composición química de los medios utilizados promueve la pérdida de sustancias inhibitoras de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras, reajustando el equilibrio hormonal de la semilla o la sensibilidad de sus tejidos frente a las distintas sustancias activas en especial los elementos que se adicionó en la preparación de la solución stock E, que forma parte de la estructura de algunas proteínas vegetales, o vitaminas de interés bioquímico y fisiológico. De los 6 elementos, el Mo, Zn, Mn, Fe, Cu, Co, intervienen en la síntesis de la clorofila y en la estructura del cloroplasto los mismos que aceleraron el desarrollo de la fase de protocormo.
2. El indicador que permitió diferenciar la efectividad fue el desarrollo de los protocormos a los 60 días que mostró el medio de cultivo R&E el cual obtuvo el promedio más alto en germinación en cuanto a las semillas y en menor tiempo en la fase de protocormo, siendo un 3.69 significativo diferente a los demás medios de cultivo in vitro y en menor promedio con 1.77 para el medio G&D y 1.60 para el medio M&S.
3. El medio de cultivo más eficaz para la germinación de *Phragmipedium kovachii* A, D & F fue el tratamiento R&E, con 52% de desarrollo de las semillas hasta la fase de protocormo, considerándose un porcentaje de germinación relativamente alto comparando con los medios G&D y M&S, todo esto responde al contenido nutricional de cada medio de cultivo. Con base a los resultados de este trabajo se recomienda utilizar el medio R&E Roberth Ernst.

RECOMENDACIÓN

1. Debido al número de especies de orquídeas con diferentes características de adaptación no es posible aplicar los resultados de esta investigación a todas las especies de cada género y menos a nivel de la familia, pero constituyen una línea de base para elaborar el protocolo para las demás especies de orquídeas de manera que ayudemos a recuperar su pronta extinción de la flora en nuestra región mediante la reproducción in vitro, considerando la mayoría de los hábitats de plantas de orquídeas de manera que se forme una alternativa de conservación ex situ a través de bancos de germoplasma.
2. Evaluar posteriormente otros medios de cultivo Incorporando Hongos Micorrizicos en la raíz para la especie *Phragmipedium* en la fase de plántula ya que existe una relación simbiótica, los participantes obtienen beneficio, la planta recibe del hongo agua y nutrientes minerales, y el hongo a su vez recoge de la planta vitaminas e hidratos de carbono, que por sí mismo es incapaz de sintetizar, la planta lo hace gracias al proceso de la fotosíntesis así lo descubrió su vital importancia el francés Bernard descubrió en 1909.
3. Fomentar la repoblación de la especie *Phragmipedium kovachii* mediante técnicas in vitro u otras y que involucre a los pobladores del lugar donde se encuentran estas especies (principales extractores) para un futuro promocionar establecimientos de orquidearios como una buena alternativa, donde las orquídeas sean propagadas masivamente evitando su perdida incalculable debido a su singular belleza y rareza.

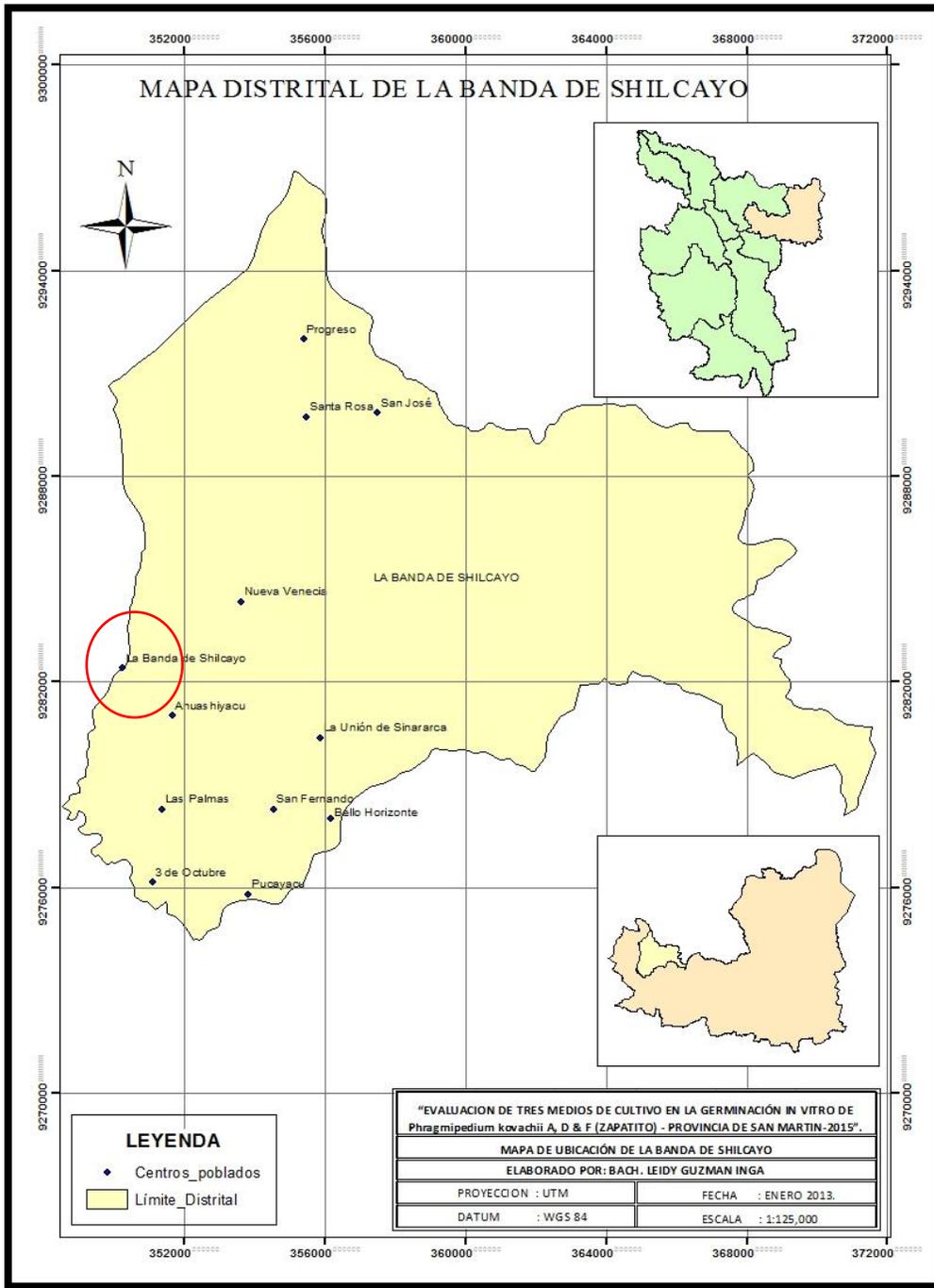
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Catie (2015). Adaptación al cambio climático: el rol de los servicios ecosistémicos. Recopilado de: <http://www.catie.ac.cr>.
2. Club peruano de orquídea, Agosto(2010).Recopilado de: <http://www.peruorchids.com>
3. Cavero Moisés (2005).Orquídeas del Perú – Centro de datos para la conservación del Perú.
4. Cerna Marco, Silvana Cárdenas, A.C, (2014) Revista: Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez. Ecuador.
5. Doménech, A. (2011). Seminario de Microbiología – Primer Bloque, Medios de cultivo.
6. Donayre T. A. (2000). Métodos en la Propagación de semillas de orquídea. Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. UNMSM. Lima – Perú.Ferrarotto María, (2011). Revista de Manual práctico ilustrado: cuidado de orquídeas en macetas I. Recuperado de <http://mplantasyvida.blogspot.com>.
7. Díaz Ávila Irene et al, (2006).Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Morelia, Michoacán. México.
8. Fiallo Rodríguez J.P., (2008). Cereza Mezquita J. y Hedesa Pérez Y.J. (2008). La investigación Pedagógica una vía para elevar la calidad educativa. Edit. Taller Gráficos San Remo. Lima- Perú.
9. Freuler Julia María. (2007). Orquídeas. 1 edición. Buenos Aires – Argentina.
10. MINAM, (2015).Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial – Lima: Recuperado de <http://www.minam.gob.pe>.
11. Millán S. Betty.(2011).Listado de Especies CITES Peruanas Flora Silvestre .Informe final. Lima – Perú.
12. Millán B., R. Bravo. Et, al. (2007).Evaluación poblacional, distribución y estado de conservación de *Phragmipedium kovachii* en el Perú. SERIE DE PUBLICACIONES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE. Instituto Nacional de Recursos Naturales, Lima, Perú.
13. Marassi M. (2008).Biotecnología. Recopilado de : <http://exa.unne.edu.ar>
14. Menchaca García Rebeca A. (2011), Manual para la micro propagación de orquídeas, Primera edición. México

15. Mayo Alberto. Et al., (2010). Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. México.
16. Placencia, M. (2009). Efecto de dos fitohormonas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum* sp. Bajo condiciones in vitro. Imbabura.Ecuador.
17. Pedroza, J., Serrato, L. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. in vitro. Revista Colombiana de Biotecnología. 12(2): 86-102.
18. Pedrique de Aulacio M. (2008). Introducción a la Genética molecular. Recopilado de: <http://www.bionova.org.es>.
19. Pérez. 2006. Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en la agricultura.la laguna. Arte y comunicación. Visul S.L.
20. Revista, cultivo de orquídeas, (2007). Recuperado de <http://www.iiap.org.pe>.Peru.
21. Rach. (2004). *Phragmipedium kovachii*, supplement de Selbyana Houston – EEUU. <http://www.phragmipediumkovachii.com>.
22. Salgado Garciglia R. (2015). La propagación de plantas in vitro, un éxito biotecnológico. México.
23. Sánchez Roldan M. (2009). Tesis Evaluación de medios de cultivo para la reproducción in vitro de *laelia anceps* para obtener el grado de maestra en ciencias. México.
24. Segretín María Eugenia. (2007).Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Trabajo de investigación.
25. Tiza Arias G. (2010).Tesis Propagación in vitro de las Orquídeas "*Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*" para optar el grado de Químico Agrícola. México.
26. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), (2007).
27. Recopilado de: <http://aventuraecologica.blogspot.com>.
28. Villanueva A. Carlos, et al., (2013). Adaptación, micropropagación y conservación de orquídeas (*cattleya* sp.) nativas de clima tropical húmedo lluvioso. Lambayeque – Perú.

ANEXOS

Anexo N°1: Mapa de ubicación del área de estudio.



Fuente: Propia, 2013.

ANEXO 2: Composición Mineral de los tres Medios de Cultivo

NUTRIENTES	FORMULA	TRATAMIENTO I : Cantidad de stock / l de MS total (en ml)	TRATAMIENTO II: Cantidad de stock / l de GD total (en ml)	TRATAMIENTO III: Cantidad de stock / l de RE total (en ml)
Macro y micro nutrientes				
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	20	20	10 ml
Nitrato de Potasio	KNO ₃	20	20	10 ml
Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	5		
Fosfato de Potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	5	20	10 ml
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5		
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O			
Cloruro de Potasio	KI			
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃			
Sulfato de Manganeso Monohidrato	MnSO ₄ .4H ₂ O	5		
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ . 7H ₂ O			
Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ . 7H ₂ O			
Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ . 5H ₂ O			
Agente quelante	Na ₂ EDTA.2H ₂ O			
Sulfato ferroso hepta hidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	20	20	
Sulfato de Amonio				10 ml
Nitrato de magnesio			20	
Vitaminas:		gr / l		
Tiamina -HCl		0.4		
Acido Nicotínico		0.5		
Fuentes de carbono :		gr / l		
	Fructuosa		10	20
	Glucosa		10	
	Sacarosa o sucrosa			
Agentes solidificantes:		gr / l		
	Agar Agar	7.5	7.5	7.5
Antioxidantes		gr / l		
	Carbón activado	2	2	2

Fuente: propia ,2013.

Anexo N°3: Preparación de la solución desinfectante para cápsulas de orquideas.

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

Donde:

V₁ : volumen inicial **V₂** : volumen final

C₁ : concentración inicial **C₂** : concentración final

- El volumen inicial (**V₁ en ml.**), es el volumen requerido de lejía comercial.
- La concentración inicial (**C₁ en porcentaje**), es la concentración de hipoclorito de sodio de la lejía comercial (5.25% de NaOCl).
- El volumen final (**V₂ en ml.**), es el volumen de agua destilada requerido.
- La concentración final (**C₂ en ml.**), es la concentración esperada.
- Se dispensa la solución desinfectante obtenida en frasco de vidrio, se coloca el material vegetal dentro la solución desinfectante por 20 minutos, se agita la solución desinfectante más el material vegetal con la finalidad de que la solución cubra toda el área del material vegetal. Antes de ingresar el frasco a la cámara de flujo laminar, limpiar la superficie del frasco con algodón y alcohol al 96%, con la finalidad de evitar contaminación.

FUENTE: Instituto Nacional de Innovación Agraria (**INIA**),2013.

Anexo N°4: SOLUCIONES STOCKS A PARTIR DE SALES DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG (1962).

Stock	Producto	Fórmula	Concent. Stock	
			Cant.	Unid.
A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	82.50	g/L
B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	95.00	g/L
C	Cloruro de Calcio Dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	88.00	g/L
D	Fosfato de Potasio Monobásico	KH ₂ PO ₄	34.00	g/L
E	Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₂ .2H ₂ O	0.0500	g/L
	Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0500	g/L
	Ioduro de Potasio	KI	1.6600	g/L
	ÁcidoBórico	H ₃ BO ₃	1.2300	g/L
F	Sulfato de Manganeso Monohidratado	MnSO ₄ . 4H ₂ O	3.3800	g/L
	Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ . 7H ₂ O	74.0000	g/L
	Sulfato de Zinc Heptahidratado.	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1.7250	g/L
	Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0050	g/L
G	Agente Quelante	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1.8650	g/L
	Sulfato Ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	1.3900	g/L
O	Sulfato de amonio	NH ₄ . 2SO ₄	3.00	g/L
M	Nitrato de Magnesio	Mg(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	5.5	g/L

FUENTE: Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA),2013.

ANEXO N° 5

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DEL MEDIO ROBERT & ERNETS (R&E) PARA LA GERMINACION DE *Phragmipedium kovachii* A.D& F.

PRIMERA EDICION

LUGAR :

FECHA:.....

OPERADOR :

VOLUMEN :

FORMULACION: R&E

Composición Stock	Composición stock/l.	Composición stock final
A	5 ml.	
B	4 ml.	
G	10 ml.	
C	2 ml.	
D	9 ml.	
E	5 ml.	
F	1.25 ml.	
THIAMINA	0.4 ml.	
ACIDO NICOTINICO	0.5 ml.	
BIOTINA	3 ml.	
FRUCTUOSA	10 gr.	
GLUCOSA	10 gr.	
AGAR	7.5 gr.	
VITROFURAL	0.114 gr.	
PH	7.3	

PHi= PH inicial:

PHf=PH final :

FUENTE: Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA),2013.

ANEXO N° 6:

**PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DEL MEDIO THOMALE (G&D) PARA LA GERMINACION DE
Phragmipedium kovachii A.D& F.**

PRIMERA EDICION

LUGAR :

FECHA:.....

OPERADOR :

VOLUMEN :

FORMULACION: (G&D)

Composición Stock	Composición stock/l.	Composición stock final
A	20 ml.	
B	20 ml.	
D	20 ml.	
M	20 ml.	
O	20 ml.	
GLUCOSA	10 gr.	
FRUCTUOSA	10 gr.	
AGAR	8 gr.	
VITROFURAL	0.114 gr.	
PH	7.3	

PHi= PH inicial:

PHf=PH final :

FUENTE: Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA),2013.

ANEXO N° 7:

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DEL MEDIO MURASHIGE & SKOOG (M&S) PARA LA GERMINACION DE *Phragmipedium kovachii* A.D& F.

PRIMERA EDICION

LUGAR :

FECHA:.....

OPERADOR :

VOLUMEN :

FORMULACION: M&S

Composición Stock	Composición stock/l.	Composición stock final
A	5 ml.	
B	4 ml.	
G	10 ml.	
C	2 ml.	
D	9 ml.	
E	1.25 ml.	
F	1.25 ml.	
THIAMINA	0.4 ml.	
ACIDO NICOTINICO	0.5 ml.	
FRUCTUOSA	10 gr.	
GLUCOSA	10 gr.	
VITROFURAL	0.114 gr.	
AGAR	7.5 gr.	
BIOTINA	3 mg.	
PH	7.3	

PHi= PH inicial:

PHf=PH final :

FUENTE: Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), 2013.

ANEXO N° 8: FORMATO PARA EL CONTEO DE SEMILLAS GERMINADAS

GERMINACION DE SEMILLAS										
CANTIDAD DE SEMILLAS SEGÚN ESTADIOS										
FECHA:	/ /			LUGAR:						
OPERADOR :				TRATAMIENTO:						
TRATAMIENTO	TUBO	CAMPO	CUADRANTE	ESTADIOS						
				0	1	2	3	4	5	
T 1	R1		1							
			2							
			3							
			4							
			1							
			2							
			3							
			4							
				TOTAL /TUBO						
				PROMEDIO/TUBO						
	R2		1							
			2							
			3							
			4							
			1							
			2							
			3							
			4							
				TOTAL /TUBO						
				PROMEDIO/TUBO						
	R3		1							
			2							
			3							
			4							
			1							
			2							
			3							
			4							
			TOTAL /TUBO							
			PROMEDIO/TUBO							
R4		1								
		2								
		3								
		4								
		1								
		2								
		3								
		4								
			TOTAL /TUBO							

FUENTE: Propia, 2013.

PANEL FOTOGRÁFICO



Figura 22: Estereoscopio binocular NIKON.
Fuente: Propia, 2013



Figura 23: Balanza analítica ADAM
Fuente: Propia, 2013



Figura 24: Probetas graduadas PYREX
Fuente: Propia, 2013



Figura 25: Micro pipetas EPPENDORF
Fuente: Propia, 2013



Figura 26: Autoclave vertical a Presión.
Fuente: Propia, 2013



Figura 27: Tubos de ensayo PYREX
Fuente: Propia, 2013



Figura 28: Cámara de flujo laminar LUMIX
Fuente: Propia, 2013

❖ Preparación de medios de cultivo



Figura 29: Medición del pH de la solución para el medio de cultivo
Fuente: Propia, 2013



Figura 30: Soluciones STOCK para la preparación de medio de cultivo.
Fuente: Propia, 2013



Figura 31: Pesando Agar-Agar para el medio de cultivo
Fuente: Propia, 2013



Figura 32: Horno microondas SAMSUNG para esterilización del medio de cultivo.
Fuente: Propia, 2013



Figura 33: dispensando la solución en los tubos de ensayo.
Fuente: Propia, 2013



Figura 34: Tubos de ensayo inclinados para la solidificación del medio de cultivo y su fácil siembra.

Fuente: Propia, 2013

❖ **Desinfección de la cápsula.**

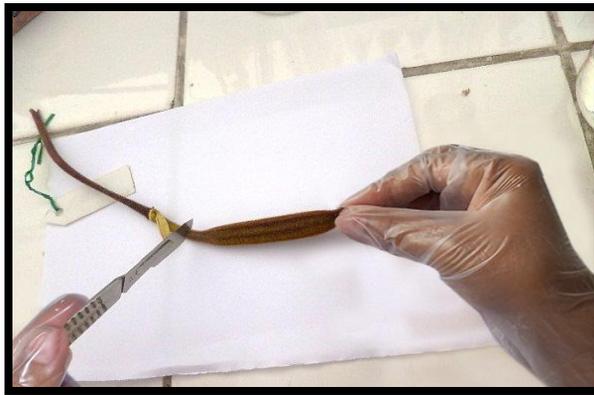


Figura 35: Retirando las partes necrótidas de la cápsula

Fuente: Propia, 2013



Figura 36: Desinfección de la cápsula con solución de hipoclorito de sodio en concentración al 1%.

Fuente: Propia, 2013

❖ **Siembra de las semillas.**



Figura 37 Cámara de flujo laminar acondicionada para la siembra.
Fuente: Propia, 2013



Figura 38: Apertura de la cápsula
Fuente: Propia, 2013

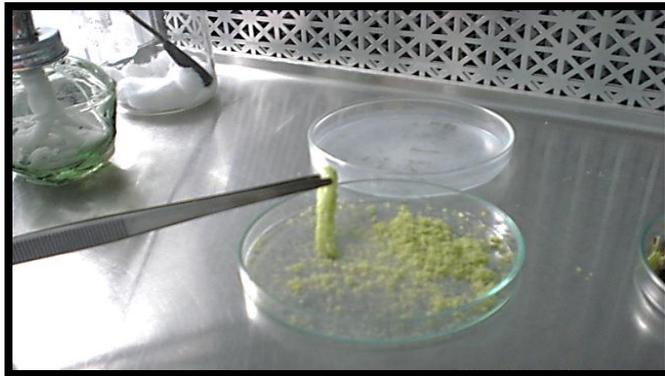


Figura 39: Separando las semillas para la siembra
Fuente: Propia, 2013



Figura 40: Sembrando las semillas sobre el medio de cultivo solidificado.
Fuente: Propia, 2013

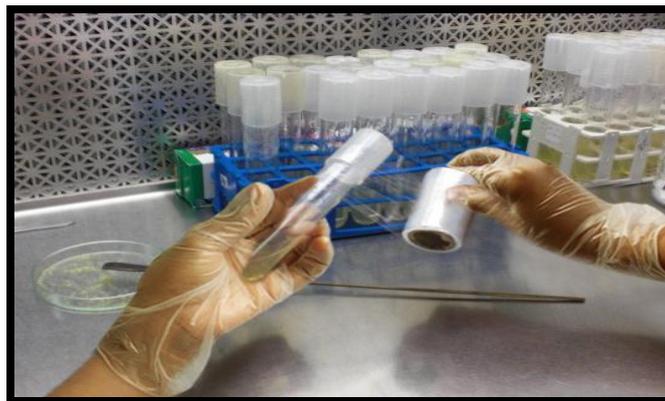


Figura 41: Sellando a los tubos de ensayo.
Fuente: Propia, 2013

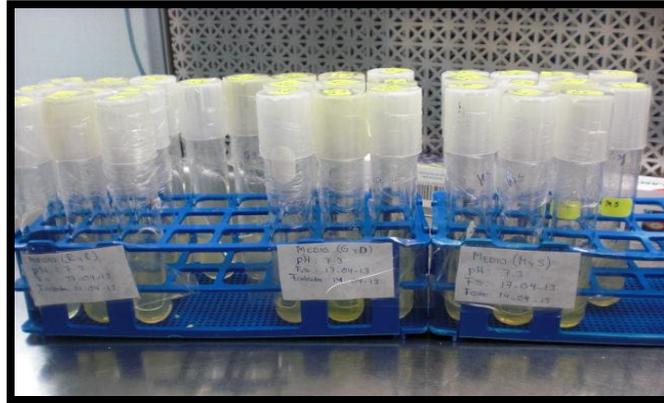


Figura 42: Tubos de ensayo rotuladas.
Fuente: Propia, 2013



Figura 43: Tubos de ensayo en la caja de incubación.
Fuente: Propia, 2013

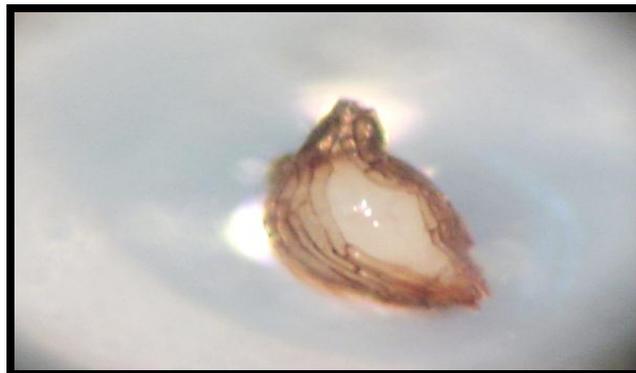


Figura 44: Embrión hinchado rompiendo testa
Fuente: Propia, 2013

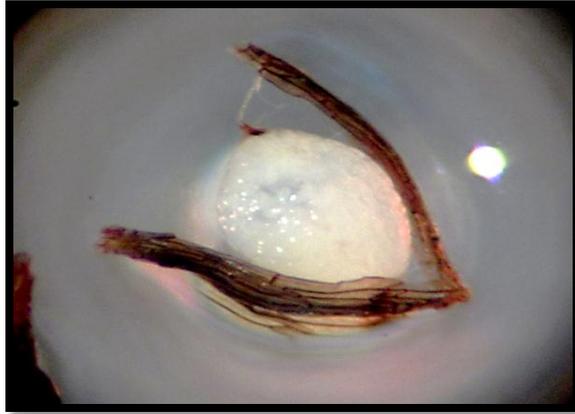


Figura 45: Embrión con inicio de protocormo
Fuente: Propia, 2013



Figura 46: Protocormo con inicio de brote
Fuente: Propia, 2013