



Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Biología del Medio Ambiente

“Influencia en el crecimiento de *Catleya máxima* con Harina de Plátano como sustancia nutritiva adicionado a medio Phytamax 6793”.

Trabajo de Graduación previo a la obtención del título de Bióloga

Autor:
Karina Beltrán Rodas

Director:
Dra. Raffaella Ansaloni

Cuenca, Ecuador
2009

DEDICATORIA:

A mi esposo David que ha sido mi apoyo y mi fuerza, a mi hija Emilia por todo su amor, dos seres maravillosos que amo con toda el alma, que son mi razón de vivir, a mis Padres que les adoro y son mi orgullo y a mi Dios que me ha bendecido y está conmigo siempre.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento para mi Directora de Tesis la Dra. Raffaella Ansaloni por su guía, apoyo y cariño, al Blgo Antonio Crespo, Blgo Danilo Minga y la Ing. Aida Cazar por su apoyo , a todo el personal administrativo de la UDA en especial a Marisol Mosquera por su ayuda.

Al Ing Juan Pablo Jara por darme la oportunidad de realizar mi tesis en las instalaciones de la Fundación Bonanza, a la Bioquímica Inés Suarez y el Ing Jara por su ayuda y compartir conmigo sus conocimientos. A Esteban Rodas por su ayuda incondicional y a Eduardo Carrasco por su ayuda, y su apoyo técnico y profesional.

“A mi querida Familia por todo su apoyo en especial a mis padres por su paciencia, amor y fe en mi, a mis hermanos por su cariño y comprensión y a Esther por su amistad y ayuda.”

RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo realizar mediante el cultivo in vitro un análisis en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de la especie *Cattleya maxima*, utilizando medio phytamax 6793 más la adición de Harina de Plátano como sustancia nutritiva a diferentes concentraciones y determinar la mejor concentración en el crecimiento de la especie.

El resultado obtenido fue que el Tratamiento 2 con una concentración de 30 g de Harina de Plátano fue la mejor, ya que se obtuvo los mejores resultados, por esta razón se recomienda el uso de esta concentración también en otras especies de orquídeas.

ABSTRACT

This research aimed at analyzing the growth and development of *Cattleya maxima* seedlings through an in vitro cultivation procedure using phytamax 6793 combined with plantain flour as nutritious media. Different concentrations were used and the optimum concentration was identified.

Treatment 2 with a concentration of 30 g of plantain flour was the best at obtaining the best results. Therefore, this concentration is also recommended for other orchid species.

OBJETIVOS PROPUESTOS

Objetivo General

Determinar en cual concentración de sustancia nutritiva como la harina de plátano produce un mejor crecimiento de *la sp Cattleya maxima* adicionado a la formulación de phytamax 6793.

Objetivos Específicos

- Definir la mejor concentración que actúe significativamente en el crecimiento en la *sp Cattleya maxima*.
- Verificar como influyen las concentraciones de harina de plátano en el desarrollo, crecimiento y enrizamiento de la especie *Cattleya máxima*
- Comparar el uso de la Harina de Plátano con Banana Powder (sigma- orchid media) y ver si hay reducción en los costos de producción.

CONTENIDOS

DEDICATORIA:.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
OBJEIVOSPROPUESTOS.....	vi

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

CAPITULO 1: MARCO TEORICO

1.1 Historia de las Orquídeas	4
1.2 Datos Generales del Género <i>Cattleya</i>	6
1.2.1 Historia.....	6
1.2.2 Características Botánicas del género <i>Cattleya</i>	6
Cultivo.....	7
Hábitat	7
Tiempo de Floración	7
1.2.3 Clasificación Botánica	8
1.2.4 Distribución.....	9
1.3 El Cultivo In Vitro	10
1.3.1 Objetivos del Cultivo In Vitro	11
1.3.2 Fundamentos del cultivo in vitro	11
Esterilización.....	11
Laboratorio.....	12
Cámara de Flujo Laminar	13
Generador de Ozono	13
Autoclave.	14
Cuarto de Crecimiento	15
1.3.3 Contaminación microbiana	15
Material Vegetal.....	15
Area de Trabajo.....	15
Los Instrumentos.....	16

El exterior de los recipientes de cultivo.....	17
El Investigador	17
1.4 Medio de Cultivo.....	17
1.4.1 Componentes del medio de Cultivo.....	18
1.4.2 Fuentes de Carbono.....	18
1.4.3 Nutrientes Minerales	19
1.4.4 Macro y Micro Elementos:.....	19
1.4.5 Vitaminas	20
1.4.6 Agente Gelificante	20
1.4.7 Reguladores de Crecimiento	20
Auxinas:	21
Citoquininas:	21
Giberilinas:.....	22
1.4.8 Otros Componentes.....	22
Aminoácidos.	23
Antioxidantes	23
Carbón Activado	23
1.4.9 pH y Otras Condiciones del Cultivo In Vitro	24
El pH	24
Temperatura	25
Control de Temperatura	25
Luz	26
Estado Higométrico.....	26
Fotoperíodo	26
1.5 Análisis Químico del Plátano	26
1.5.1 Información de nutrientes de la Harina de Plátano	27
1.5.2 Harina de Plátano Utilizado	28
1.6 Banana Powder (SIGMA)	28
1.7 Medio de Cultivo Phytamax 6793.....	29
Formulación:	29
Aditivos:.....	29
Vitaminas:	29

CAPITULO 2:METODOLOGÍA

2.1	Ubicación del Área de Estudio:.....	31
2.2	Datos del Laboratorio	31
2.3	Materiales:	32
	Equipos:	32
	Materiales de vidrio:	32
	Otros:.....	32
	Reactivos:.....	33
	Sustancia Nutritiva:.....	33
	Químicos:	33
	Biológico:.....	34
2.4	Diseño Experimental	34
	Factor en Estudio:	34
	Variables:	34
	Tratamientos:.....	34
	2.4.1 Descripción del Diseño Experimental.....	34
2.5	Fase de Laboratorio	35
	2.5.1 Preparación del Medio de Cultivo	36
2.6	Proceso de Siembra	37
	Desinfección.....	37
	Siembra	38
2.7	Toma de Datos.....	39
2.8	Análisis de Datos.....	40

CAPITULO 3:RESULTADOS

3.1	Análisis de Promedios de medidas registradas por mes por cada tratamiento durante el Proyecto	41
3.2	Análisis y Comparación del Crecimiento de la <i>sp Cattleya maxima</i> entre Tratamientos con el Promedio Total durante los 5 meses de investigación.....	42
3.3	Análisis de las Características de las plántulas de la <i>sp Cattleya maxima</i>	44
3.4	Análisis Estadístico	45
3.5	DISCUSION.....	46

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Recomendaciones:.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	52
ANEXOS.....	55

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:

Tabla 1.1 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 1 mes de Mayo.

Tabla 1.2 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 1 mes de Junio.

Tabla 1.3 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 1 mes de Julio.

Tabla 1.4 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 1 mes de Agosto.

Tabla 1.5 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 1 mes de Septiembre.

Tabla 1.6 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 2 mes de Mayo.

Tabla 1.7 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 2 mes de Junio.

Tabla 1.8 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 2 mes de Julio.

Tabla 1.9 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 2 mes de Agosto.

Tabla 1.10 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 3 mes de Septiembre

Tabla 1.11 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 3 mes de Mayo.

Tabla 1.12 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 3 mes de Junio.

Tabla 1.13 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 3 mes de Julio.

Tabla 1.14 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 3 mes de Agosto.

Tabla 1.15 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 3 mes de Septiembre.

Tabla 1.16 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 4 mes de Mayo.

Tabla 1.17 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 4 mes de Junio.

Tabla 1.18 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 4 mes de Julio.

Tabla 1.19 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 4 mes de Agosto.

Tabla 1.20 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 4 mes de Septiembre.

Tabla 1.21 Crecimiento de las plántulas en cm. Tratamiento 5 mes de Mayo.

ANEXO 2:

2.1 Cuadro de resultados del Análisis Estadístico “a posteriori” de Sheffe con los promedios Finales de los Tratamientos

ANEXO 3:

3.1 Resultados del Crecimiento promedio (base-ápice) en cm de cada Tratamiento mes de Mayo.

3.2 Resultados del Crecimiento promedio (base-ápice) en cm de cada Tratamiento mes de Junio.

3.3 Resultados del Crecimiento promedio (base-ápice) en cm de cada Tratamiento mes de Julio.

3.4 Resultados del Crecimiento promedio (base-ápice) en cm de cada Tratamiento mes de Agosto.

3.5 Resultados del Crecimiento promedio (base-ápice) en cm de cada Tratamiento mes de Septiembre.

3.6 Tabla de Crecimiento General de la *sp Cattleya maxima* durante los 5 meses.

ANEXO 4:

Fotografía 4.1 Plántulas de *Cattleya máxima* para la Siembra.

Frascos utilizados, *Cattleya maxima* sembrada en medio Phytamax 6793

Fotografía 4.2 Cámara de Flujo Laminar

Fotografía 4.3 Generador de Ozono

Fotografía 4.4 Instrumentos Modificados para la siembra (en reemplazo de la pinza)

Fotografía 4.5 Calibrador.

Fotografía 4.6 La Siembra.

Fotografía 4.7 Ubicación de Frascos en el Cuarto de Crecimiento.

Fotografía 4.8 Toma de medidas de las plántulas con el Calibrador.

Fotografía 4.9 Marcado de Frascos con un marcador permanente para Registro de Crecimiento por mes (cada mes con un color diferente)

Fotografía 4.10 Registro de Crecimiento por mes.

Fotografía 4.11 Tratamiento 1 (Phytamax 6793)

Fotografía 4.12 Tratamiento 2 (Phytamax 6793 + 30g Harina de Plátano)

Fotografía 4.13 Tratamiento 3 (Phytamax 6793 + 40g Harina de Plátano)

Fotografía 4.14 Tratamiento 4 (Phytamax 6793 + 50g Harina de Plátano)

Fotografía 4.15 Tratamiento 5 (Phytamax 6793 + 60g Harina de Plátano)

Fotografía 4.16 Identificación de Tratamientos (tapas) fecha, ○ # de Tratamiento, △ Repeticiones. (Tapa Frasco Planta Madre)

Karina Beltrán Rodas
Trabajo de Graduación
Dra. Rafaella Ansaloni
Septiembre del 2009

**“INFLUENCIA EN EL CRECIMIENTO DE *CATLEYA MAXIMA*
CON HARINA DE PLÁTANO COMO SUSTANCIA NUTRITIVA
ADICIONADO A MEDIO
PHYTAMAX 6793”.**

INTRODUCCION

Las orquídeas son las soberanas del reino vegetal, y constituyen la familia más numerosa de plantas de flor. Sin duda, forman el grupo más diverso, con un despliegue de fascinantes y preciosas flores. Si mencionamos la palabra orquídea, de inmediato nos viene a la mente términos como exótica, rara, hermosa y colorida.

La mayor parte de las orquídeas son fáciles de cultivar, siempre y cuando se satisfagan sus necesidades en el entorno, la temperatura y la humedad. Se calcula que en nuestro planeta existen más de 30.000 especies distintas de orquídeas divididas en unos 1800 géneros distribuidos por todo el mundo. Aunque se siguen descubriendo y registrando nuevas especies.

Por otro lado, existen más de 100.000 especies híbridos registrados que se han propagado de manera artificial. Muchos de estos híbridos son importantes plantas comerciales; se utilizan como flores ornamentales.

Muy pocas orquídeas poseen nombres comunes; en su mayoría se denominan sencillamente con su nombre botánico o genérico. (Banks, 2004)

Pese al pequeño tamaño de nuestro país, resulta difícil conocer su complicado sistema topográfico, más aún si no existen vías de comunicación que permitan acceder a las áreas que conservan vegetación nativa que hospeda a las plantas epífitas y entre ellas a la gran familia de las orquidáceas, dispuestas desde el nivel del mar hasta prácticamente las nieves perpetuas, hay de todos los colores, formas y tamaños, para satisfacer el gusto del más exigente de los orquideófilos del mundo.

Las orquídeas usualmente engalanan los árboles andinos, que lucen cual centinelas de las damas orquídeas y las protegen del agresivo ataque de depredadores y destructores de los bosques, mudos testigos de una compleja y milenaria evolución que ha dado lugar a la fabulosa riqueza biótica que tipifica al Ecuador. Otras orquídeas son litofíticas, es decir crecen sobre rocas y por último una pequeña cantidad de ellas son aún terrestres,(Sanchez,s,a)

Tenemos a las especies de orquídeas silvestres que las podemos encontrar en bosques tropicales, pero debido a la expansión agropecuaria, invasiones, tala de bosques, la misma extracción de estas especies para su comercialización y su tráfico ha provocado la destrucción total de sus ecosistemas, y viene ocasionando que una gran cantidad de orquídeas nativas se encuentren hoy en peligro de extinción. (Valencia, R; *et al.* 2000).

Hoy en día existen personas dedicadas a rescatar y proteger de diferentes formas estas plantas, tales como: invernaderos, jardines botánicos etc. Otra forma de conservar estas especies es mediante la micropropagación esta es una técnica que nos ha permitido propagar especies amenazadas (semillas no viables, de baja fertilidad) así como de interés económico, a demás producción in vitro de plantas durante todo el año sin importar las condiciones climáticas. (Jara,2009)

La presente investigación proporcionará resultados científicos en el estudio de micropropagación de orquídeas, obteniendo resultados investigativos importantes que nos permitan conocer el desarrollo de la *sp Cattleya maxima* a través de tratamientos a base de medio Phytamax 6793 mas harina de plátano, en los que se determinara la

influencia en su crecimiento, datos que nos ayudarán para su conservación futura, además permitir reducir significativamente gastos en producción.

CAPITULO 1

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 Historia de las Orquídeas

Se conoce que históricamente está documentado que los chinos ya cultivaban algunas de las fragantes especies *Cymbidium* en el año 500 a.c y los japoneses cuidaban de especímenes de la endémica *Neofinetia falcata*, habría que esperar a finales del siglo XVIII y principios del XIX para que el cultivo de las orquídeas se convirtiese en una actividad más popular. (Banks, 2004)

El filósofo griego Theoprasthus (300 a.c) es reconocido por muchos como el primer botánico por su manuscrito “Indagaciones sobre las Plantas” en el que describe algunas orquídeas dándoles el nombre genérico de *Orchis* que en griego significa testículo (Hirtz, 2004).

En la época victoriana Sander creó una colección, o, posiblemente, la colección de orquídeas y plantas tropicales más importantes del momento, con más de 60 invernaderos repletos de ejemplares, contaba con recolectores de plantas en todo el mundo incluidos Borneo, Filipinas y Nueva Guinea. (Banks,2004)

Las Orquídeas estuvieron en todo su apogeo, hasta 1929 donde con la depresión de esta época el cultivo de orquídeas a gran escala pasó a manos de grandes empresarios, 18 años después Lewis Cudson descubre un medio sintético para esterilizado denominado

Agar, idóneo para que germinen las millones de semillas, con este descubrimiento se inicia la comercialización de flores cortadas de orquídeas. (Banderas y Rodas, 2007)

Según Morel, 1960 indica que cuarenta años más tarde se logra propagar orquídeas masivamente por medio del método de cultivo de ápice de vástago "in vitro". A partir de este momento las orquídeas son el primer cultivo ornamental propagado exitosamente en masa a través del cultivo de tejido. Debido al gran valor comercial de estas plantas, este método fue aplicado por numerosos investigadores, también fue utilizada por cultivadores de orquídeas para aplicarlo a fines comerciales, ya que encontraron una forma de propagación rápida, masiva y que mantiene las características de la planta madre. (Villena y Lala 2002)

La mayoría de las orquídeas son epífitas, es decir crecen sobre árboles en busca de sustento y luz, con lo que evitan la oscuridad del suelo de los bosques. Asimismo, reciben una generosa corriente de aire y sus temas radicales se hallan perfectamente drenados. No son parásitas, ya que no toman alimento del árbol, ni simbióticas, por que el anfitrión no recibe beneficio alguno de esta relación unilateral. El árbol actúa como soporte o sustrato que proporciona las condiciones perfectas para que la orquídea se desarrolle. (Banks, 2004)

Las Orquídeas son las plantas más evolucionadas y especializadas, su capacidad para adaptarse es notable, pueden crecer tanto a nivel del mar como en los elevados páramos, muchas viven sobre los árboles (epífitas), otras lo hacen sobre las rocas (litófitas), otras sobre la tierra y algunas especies se desarrollan incluso en ambientes subterráneos. (Sánchez, s.a).

Las orquídeas generalmente son especies que florecen una sola vez al año, siempre por la misma fecha, esto es determinado por factores ambientales como: disminución o elevación de la temperatura, aumento en las horas de luz, cambios estacionales, variaciones en la humedad ambiental, etc. Los híbridos producidos por el hombre pueden florecer dos o más veces al año.

El tiempo de desarrollo en la naturaleza es muy lento dependiendo de la especie puede tomar entre 2 a 3 años o en algunos casos más tiempo. En lo referente a su hábito de crecimiento las orquídeas se dividen en dos grandes grupos, las de crecimiento "simpodial", desarrollo horizontal y las de crecimiento "monopodial" desarrollo vertical (Merchán, s.a).

1.2 Datos Generales del Género *Cattleya*

1.2.1 Historia

Jhon Lindley estableció el género en 1824 con la especie *C. labiata*, planta que de otra manera, y lógicamente se habría clasificado en género *Epidendrum*. El éxito de *Cattleya* entre los cultivadores fue inmediato. Y tan rotundo que se realizaron numerosas expediciones al Neotrópico en busca de nuevas especies y variedades del género. Como consecuencia de intensiva hibridación en el cultivo, las *Cattleya* híbridas son en su mayoría bigenéricas y trigenéricas. Se advierten dos grupos primarios en el género: las especies unifoliadas, y las bifoliadas. (Dodson,2005)

Etimología

Dedicado a William Cattley, horticultor inglés muy aficionado a las orquídeas. (Dodson,2005)

1.2.2 Características Botánicas del género *Cattleya*

Botánicamente el género *Cattleya* son plantas epífitas bastante grandes, con pseudobulbos que terminan en una hoja o a veces en 2 o más. El desarrollo de los botones al comienzo está protegido por una espata, a veces doble, que los guarda mientras están tiernos y delicados.

Se distinguen dos grupos principales de cattleyas. Las que poseen solamente una hoja, conocidas como tipo Labiata y las bifoliadas. En las inflorescencias de las *Cattleyas* hay varias flores grandes y vistosas. Por lo general los pétalos son más anchos que los sépalos y el labelo es generalmente grande, y envuelve la columna, en donde están cuatro polinios cartilaginosos.

Cultivo

El cultivo de este género se da en condiciones medias y con mucha iluminación. (Dodson, 2005)

Es relativamente fácil el cultivo de las *Cattleyas*, es un género común en todas las colecciones. Algunas especies pueden presentar algún grado de variación climática de acuerdo a las condiciones de origen, siempre que permiten algún grado de aireación a las raíces, en condiciones de humedad alta y temperaturas que varían entre los 15 ° C en la noche y los 28° C en el medio día, requieren sombra moderada y una buena circulación de aire. (Arango, 1990)

Hábitat

Son plantas epífitas, normalmente de bosque húmedo. En el Ecuador la especie *Cattleya maxima* se da en bosques secos de la costa ecuatoriana, los que reciben espesa bruma nocturna, aun en la estación seca. (Dodson, 2005)

Tiempo de Floración

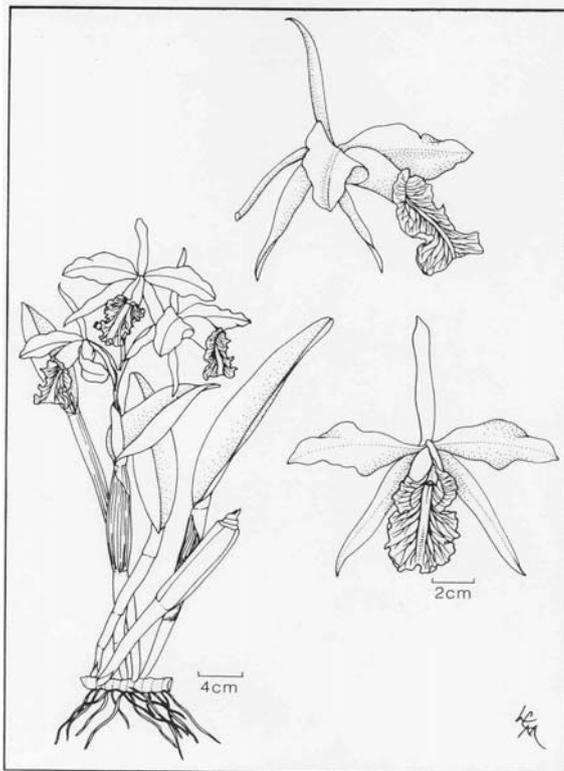
Principalmente en noviembre y diciembre pero esporádicamente a lo largo del año (Icones Plantarum Tropicarum 1980)

1.2.3 Clasificación Botánica

REINO:	Vegetal
CLASE:	Monocotiledonea
SUBCLASE:	Liliidae
ORDEN:	Orchidales
FAMILIA:	Orquideacea
SUBFAMILIA:	Epidendroideae
TRIBU:	Epidendrae
GENERO:	<i>Cattleya</i>
ESPECIE:	<i>máxima</i>

Referencias: (Beechtel y col, 1981) y (Rasmussen y col, 1985)

Imagen 1.



Cattleya maxima Lindl.

Fuente: Orchids of Ecuador (Dodson, 2002)

1.2.4 DISTRIBUCION

Género de 53 especies, distribuidos en todo el Neotropico (Dodson, 2005)

Según Dodson y Escobar 2004. La mayoría de las *Cattleyas* del tipo labiada (una sola hoja) son originarias de América Central y América del Sur, concentradas principalmente en las regiones Andinas de Sudamérica del norte y occidental, y la más grande en Brasil, principalmente las regiones costeras. *Cattleyas* también hay en México, Panamá, Trinidad, Venezuela y Perú, crecen en las laderas de las montañas entre los 600 y 1600 metros sobre el nivel del mar, donde se encuentra un clima con brisas suaves durante la mayor parte del tiempo. Para el Ecuador se citan cinco especies, pertenecientes a dos grupos. (Banderas y Rodas, 2007)



Fuente: Icones Plantarum Tropicarum 1980 page 19

Sitio de Colección de especímenes:

Especímenes vistos en Ecuador: Guayas en Manglaralto cercano, alt. 20 m, 10 oct. 1957, Dodson 55 (MO); Manabí en Cerro Montecristi, este del Km 7 de Manta, alt 100m. 10 dic.1960, Dodson 359 (SEL). (Villena y Lala, 2002).

1.3 EL CULTIVO IN VITRO

El cultivo de tejidos es una práctica, que consiste en cultivar en medios nutritivos y adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallos y hojas y algunas veces ovarios, ovulos, anteras y polen.

Consiste en aislar, inocular y lograr desarrollo de células, órganos o tejidos bajo condiciones de asepsia utilizando medios de cultivo que suplan el desarrollo y/o crecimiento del explante.

El cultivo de protoplastos, meristemas, yemas, raíces, anteras, óvulos y/o embriones, se ha ido desarrollando básicamente para el logro de tres fines: la micropropagación vegetativa, la conservación de germoplasma, y para transformarse en una herramienta que puede a cortar los diferentes pasos del mejoramiento ético tradicional o estudios fisiológicos.

Para cultivar células, tejidos u órganos in vitro se siguen una serie de principios básicos simples. Es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal.

Por último, se debe proporcionar a las células, tejidos y órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuada, en ambiente estéril.(Hurtado, 1988)

1.3.1 Objetivos del Cultivo In Vitro

Los objetivos perseguidos del cultivo con la utilización del cultivo in vitro de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de la aplicación de tales cultivos se pueden resumir así;

- a) Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines.
- b) Bioconversión producción de compuestos útiles.
- c) Incremento de la variabilidad genética.
- d) Obtención de plantas libres de patógenos.
- e) Propagación de plantas.
- f) Conservación e intercambio de germoplasma. (Roca y Mroginski, 1991)

1.3.2 Fundamentos del cultivo in vitro

Esterilización

La esterilización es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. Se dice que tales materiales o sitios son estériles o se han esterilizado. En la terminología médica se utiliza generalmente la palabra ASEPSIA para designar la condición en la que están ausentes los microorganismos patógenos; quienes trabajan en el cultivo de tejidos de plantas utilizan la palabra aséptico como sinónimo de estéril.

La desinfección se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos. Se utiliza la palabra axénico para las preparaciones que están libres de virus, viroides o microplasma. (Roca y Mroginski, 1991)

Según Morel 1974. La producción de las plantas por las técnicas de cultivo de tejidos, se realiza bajo condiciones estériles; tanto el lugar de trabajo (aislamiento y siembra), como los instrumentos a emplear deben estar desinfectados. Se recomienda esterilizar los instrumentos sumergiéndolos en etanol, lavarlos con agua destilada estéril y mantenerlos cubiertos con toallas de papel estéril; Sagawa y col.,(1966) recomienda flamear los instrumentos después de sumergirlos en alcohol etílico.(Villena y Lala 2002).

El Cultivo in vitro debe ser aséptico, lo que implica la esterilización previa de los tejidos o su extracción aséptica así como el establecimiento de condiciones que permitan mantener los cultivos al abrigo de las contaminaciones microbianas.(Mateo y Urbano, 1988).

Laboratorio

Un laboratorio de cultivo de tejidos se puede dividir esquemáticamente en áreas departadas para las diferentes funciones que se desarrollan en él, en la práctica, sin embargo, algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente. Las áreas o secciones principales son:

1. Area de preparación
2. Area de lavado y de esterilización
3. Area de transferencia
4. Area de incubación
5. Area de observación y examen
6. Area de crecimiento
7. Area de cuarentena y de control fitosanitario
8. Area de oficina.

La seguridad física del personal del laboratorio es importante, por esta razón se debe tomar precauciones para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores etc. Como el uso de compartimientos especiales para almacenar reactivos peligrosos (solventes orgánicos, ácidos, alcohol, nitrógeno líquido) ubicados en el área general de preparación y en otras áreas del laboratorio.(Roca y Mroginski,1991)

Cámara de Flujo Laminar

Según Merchán,s.a una cámara de flujo laminar es un receptáculo en forma generalmente prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo. La esterilidad de la zona de trabajo se consigue porque se hace circular a través del interior de la cámara una corriente de aire que previamente ha sido microfiltrada para eliminar toda partícula extraña.

Para evitar que el aire del exterior pueda entrar en la cámara de flujo sin pasar previamente por los filtros se procura que la presión interior sea ligeramente superior a la presión exterior, con lo cual el aire siempre circula de dentro hacia fuera. Existen dos tipos de cámaras de flujo laminar según sea la forma en la que se hace circular el aire: cámaras de flujo horizontal y cámaras de flujo vertical. (Banderas y Rodas,2007)

Las cámaras de flujo laminar deben ubicarse, en lo posible, en un lugar alejado de las puertas y con un mínimo de corriente de aire, con el fin de prolongar la vida útil de los filtros.(Roca y Mroginski,1991)

Generador de Ozono

Un generador de ozono, u ozonizador, es capaz de producir ozono -una molécula triatómica que contiene tres átomos de oxígeno- artificialmente, mediante la generación de una alta tensión eléctrica (llamada "Efecto corona") que produce ozono, y, colateralmente, iones negativos.

La generación de ozono tiene aplicación en la eliminación de malos olores y desinfección del aire, en el tratamiento y purificación de aguas.

Los principales usos industriales del ozono:

- Tratamientos ambientales, higienización y desodorización
- Eliminación de olores, moho, gérmenes, virus y bacterias.

Autoclave.

El vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias y hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo (siempre y cuando no contengan componentes termolábiles).

La autoclave más utilizada actualmente en el laboratorio es la contraparte de mayor tamaño de la olla de presión común. La extracción del aire se logra automáticamente al permitir que el vapor expulse el aire del aparato, antes de cerrar la válvula correspondiente, la presión se lee en un nanómetro que forma parte de la autoclave.

Para esterilizar los materiales relacionados con el cultivo de tejidos se acostumbra usar una presión de 15 lb durante 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121°C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida en cinco minutos. (Roca y Mroginski,1991)

Cuarto de Crecimiento

El área de crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la temperatura (20-28°C), de a iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa (70%-80%).

En esta área se instalan estanterías metálicas o de madera para colocar los cultivos. Estas estanterías pueden tener dimensiones variable: al ancho entre 0.30 m y 1.00m, de largo de acuerdo con el tamaño del cuarto, y la altura total de 1.80 a 2.20 m; la distancia entre entrepaños es de 0.20 a 0.50 m.

Es necesario propiciar una buena distribución de aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces. Cuando se utilizan tubos relucientes, es conveniente sacar los balastos fuera de este cuarto.(Roca y Mroginski,1991)

1.3.3 Contaminación microbiana

Material Vegetal

El material vegetal y los tejidos puede llevar contaminadores en su superficie o en su interior. Los que llevan el explante sobre su superficie se puede eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro son difíciles de eliminar. En este último caso puede ser útil la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo.(Roca y Mroginski,1991)

Area de Trabajo

Los contaminadores más comunes son aquí las bacterias y las esporas de hongos que habitan en el ambiente. La utilización de cabinas o cuartos adaptados con un sistema de flujo laminar de aire, el cual penetra a través de filtros a prueba de microbios, permite mantener asepsia durante el trabajo. Si el área de trabajo carece de estas instalaciones, se

hace necesario limpiar las paredes y las mesas con desinfectantes y trabajar en lo posible durante cortos períodos de tiempo.(Roca y Mroginski,1991)

El aire no es un medio favorable para el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, pero si una vía para su diseminación.

Se debe tener en cuenta además que la contaminación también puede ser producida en las habitaciones destinadas a su crecimiento en donde ocurre un intercambio entre el interior del frasco de cultivo y el ambiente exterior, y en vista que el periodo de permanencia de las plantas en estos locales es prolongado se debe tener atención permanente en el estricto mantenimiento de la limpieza de esta área.(Perez,1988)

Los Instrumentos.

Estos deben ser esterilizados antes de usarse. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que los instrumentos inicialmente estériles pueden contaminarse con microbios del aire, de superficies vegetales mal desinfectadas, de las manos o de la exhalación del investigador.

Se debe colocar los instrumentos en alcohol etílico al 70% de 2 a 3 minutos, y flamearlos luego cuidadosamente. Se debe alterar el flameo hecho después de la inmersión de los instrumentos en alcohol, con la colocación de los mismos contra la corriente de aire de la cabina de trabajo para mantener su esterilidad mientras que el alcohol residual se evapora. (Roca y Mroginski,1991)

La esterilización por calor húmedo en autoclave se emplea comúnmente para eliminar los microorganismos de los medios de cultivo, equipos e instrumental de laboratorio.

Distintos microorganismos son introducidos por esta vía, un ejemplo de esto es el género *Bacillus*, que puede contaminar los medios de cultivo por insuficiente esterilización o mal funcionamiento de las autoclaves y puede ser diseminado durante las operaciones con el material vegetal. (Pérez, 1998).

El exterior de los recipientes de cultivo.

Existe la posibilidad de que, durante el tiempo transcurrido entre la esterilización de los recipientes con los medios de cultivo y el momento de usarlos, se localicen en su exterior ciertos contaminadores, de tal manera que se mantenga estéril solo el interior de los tubos; por lo tanto se debe flamear obligatoriamente la boca de cada tubo antes y después de sembrar el explante. (Roca y Mroginski,1991)

El Investigador

El investigador es una fuente primaria de contaminación. El uso de batas de laboratorio y de guantes limpios y la protección del cabello, la boca y la nariz reducen la contaminación. Es esencial que el investigador se limpie bien las manos y los brazos (lavándolos con jabón y agua y enjuagándolos con alcohol al 70% antes de iniciar una sección de trabajo. (Roca y Mroginski, 1991).

1.4 MEDIO DE CULTIVO

El éxito que se obtenga en los cultivos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también el empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc.; usando sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma adecuada siendo posible establecer cultivos para casi todas las partes de la planta en diversas especies vegetales. (Hurtado y Merino, 1988)

Según (Merchan,s.a) Los requerimientos nutritivos para un crecimiento in vitro óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para el medio de cultivo.(Banderas y Rodas 2007).

1.4.1 Componentes del medio de Cultivo.

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

- a) Carbono
- b) Nutrientes minerales
- c) Vitaminas
- d) Agente gelificante (en el caso de los semisólidos)
- e) Sustancias reguladoras del crecimiento
- f) Otros compuestos. (Roca y Mroginski,1991)

Entre las necesidades nutricionales y hormonales de crecimiento tenemos:

- Agua, Sustancias orgánicas, Azúcares Aminoácidos.
- Macro elementos : (N ,P, K, Ca, Mg, S)
- Micro elementos (Fe, Zn, B, Mn, Cu, Ni, Co, Al, Mol.)
- Reguladores de crecimiento: (Auxinas, Citoquininas, Giberilinas, Acido abscísico)
- Complejos Naturales (Hurtado y Merino 1988).

1.4.2 Fuentes de Carbono

Muy pocos cultivos son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. (Roca y Mroginski, 1991)

Según Sanchez s.a, normalmente para el cultivo in vitro de células, tejidos u órganos es necesario adicionar una fuente de carbono en el medio, debido a que el crecimiento in vitro tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad. La sacarosa es el carbohidrato más utilizado para propósitos de micropropagación. (Banderas y Rodas,2007)

1.4.3 Nutrientes Minerales

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras.

El nitrógeno se suministra en forma de nitrato y amonio como fuente nitrogenada, en este último caso el medio debe contener también ácido cítrico, succínico o málico. Otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada. Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en concentraciones de 1 a 3mM.(Roca y Mroginski, 1991)

1.4.4 Macro y Micro Elementos:

Los micro elementos se aportan solamente con el objeto de evitar cualquier carencia. Con el fin de impedir cualquier riesgo de toxicidad, la concentración de la solución en oligoelementos es baja.

A veces los micro elementos se utilizan a concentraciones más elevadas con el objeto de provocar una activación del crecimiento; además resulta indispensable añadir glúcidos a los medios de cultivo debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Los azúcares más utilizados son sacarosa y glucosa Es bastante sorprendente que los azúcares ejerzan una acción específica sobre la morfogénesis. (Mateo y Urbano, 1988)

1.4.5 Vitaminas

Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general solo sea esencial la incorporación de Tiamina.(Roca y Mroginski, 1991)

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en el sistema enzimático y son requeridas en cantidades muy pequeñas. En el caso de cultivo de orquídeas, la Tiamina es la vitamina más frecuente incluida en los medios. Otras vitaminas que pueden ser utilizadas son. Niacina, Acido Nicotínico, Inositol, y Piridoxina.(Reinsinger et al,1976)

1.4.6 Agente Gelificante

Según Debergh,1982. En los medios de cultivo semisólidos se adiciona Agar (0.6% a 1%).Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas in vitro de los cultivos.(Roca y Mroginski, 1991)

El Agar-agar es una alga marina que convenientemente tratada se presta para varios usos en el laboratorio. En el cultivo de orquídeas éste mero vehículo para los constituyentes de cada fórmula, siendo su función la de dar la consistencia gelatinosa a los medios de cultivo.(Villena y Lala, 2002)

1.4.7 Reguladores de Crecimiento

Son sustancias que inhiben o promueven cambios en los tejidos y órganos de las plantas, actúan en cantidades muy pequeñas y generalmente en un lugar distinto de donde se producen. Existen tres grupos de reguladores de crecimiento: auxinas,

citoquininas y giberelina, pero a veces también giberelinas o ácido abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo in vitro de tejidos y órganos.(Roca y Mroginski, 1991)

Auxinas:

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en los tejidos.

Las auxinas que más se utilizan son. 2,4D, ANA,AIA y AIB.

Acido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4D)

Acido Naftaleno (ANA)

Acido Indolacético(AIA)

Aciido Indolbutírico (AIB)

A menudo es necesaria una concentración de auxinas sustancialmente menor para mantener los cultivos.(Roca y Mroginski, 1991)

En cultivo in vitro las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callos. Están muy irregularmente repartidas por las plantas, existiendo una mayor concentración en los órganos jóvenes de crecimiento activo y en las semillas inmaduras. Se han demostrado que forman complejos con las proteínas, que sirven para la regulación de la concentración de auxinas. (Rojas, Ramírez, 1993)

Citoquininas:

Las citoquininas se utilizan frecuentemente a débil concentración para estimular la proliferación de los tejidos en cultivo. Debido a que ejercen generalmente un efecto inhibitor sobre rizogénesis, las citoquininas se evitan o se emplean en dosis muy débiles en los medios de enraizamiento. (Mateo y Urbano, 1988)

Las citoquininas son esenciales para la división de las células, también ejerce su acción sobre la diferenciación e inducen la formación de brotes.

Las más utilizadas son KIN, BAP y ZEA (Sánchez, *et al.* 1994)

6-furfuril-aminopurina (KIN)

Benzilaminopurina (BAP)

6-[4-hidroxi-E-metil but-trans-2-enilamino]purina (ZEA)

Giberilinas:

Las giberilinas son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría, Su efecto primordial es el de elongar los tallos.

En la mayoría de los cultivos, los niveles de ácido giberélico superiores a 1.0 mg/litro son tóxicos. Las giberilinas deberían utilizarse en bajos niveles y con cautela; son termolábiles y deberían esterilizarse con filtros. (Roca y Mroginski, 1991)

1.4.8 Otros Componentes

Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Entre ellos están el agua de coco, jugo de tomate, extracto de levadura y extracto de tubérculos de papa. (Roca y Mroginski, 1991)

Numerosos investigadores han utilizado además de los iones conocidos, extractos de productos vegetales que poseen materia orgánica la misma que es proporcionada al medio de cultivo, otras fuentes de nitrógeno como son los aminoácidos, fuentes de carbohidratos como son los almidones, fructosa, manosa, sacarosa, etc., mezcla de minerales y posiblemente hormonas, así como también vitaminas, enzimas y reguladores de crecimiento.

Es por esta razón que varios autores han propuesto la utilización de productos naturales como: pulpa de plátano, agua de coco, extracto de malta, jugo de naranja, jugo de tomate riñón, piña, papa y fréjol, para enriquecer el medio de cultivo. Pero en realidad son muy escasos los estudios e información que podemos encontrar acerca de la utilización de complejos naturales en medios de cultivo. (Sánchez, *et al.* 1994)

Aminoácidos.

A demás de glicina, en ocasiones se incorporan a los medios otros aminoácidos como asparagina, cisteína y L-tirosina. En general, no son constituyentes esenciales de los medios inclusive, en concentraciones relativamente altas, pueden tener efectos inhibitorios sobre cultivos.

En algunos medios se adiciona ácidos orgánicos como el cítrico, el málico, el succínico y el pirúvico, como precursores de aminoácidos; también es frecuente la adición de L-glutamina y de caseína hidrolizada (0.1% a 1%).(Roca y Mroginski, 1991)

Antioxidantes

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes.(Roca y Mroginski, 1991)

Carbón Activado

Es un material que se obtiene de la madera, mediante combustión de la lignina y celulosa. Es un material robusto, liviano, que no se deteriora. Se utiliza por que absorbe líquidos, para ser almacenados con las sustancias disueltas en su superficie en capas condensadas. Otras ventajas de éste material es la fácil aireación que permite oxigenar el medio de cultivo en conjunto y a las raíces de la planta, además con la combustión

incompleta de la madera se produce la mineralización parcial de las sales para ser consumidas por las orquídeas.(Villena y Lala, 2002)

El Carbón activado (0.1% a 5%), incorporado al medio, ha demostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos.(Roca y Mroginski, 1991)

Este es obtenido por destilación seca de la madera. Tiene una estructura celular muy porosa, gracias a esta característica cumple la función de absorción, es un producto que por su color oscuro que es transmitido al medio permite a las plántulas realizar fototropismo radicular correcto. (Sánchez, *et al.* 1994)

1.4.9 pH y Otras Condiciones del Cultivo In Vitro

Narayaswamy et al.(1964) y Raghavan(1966;1976) han revisado exhaustivamente la literatura en relación con los efectos del pH del medio, de la temperatura y la luz y de los gases en los cultivos. Lo mismo se aplica también a los cultivos de células y tejidos.

Es suficiente decir que una especie particular puede reaccionar favorablemente a un conjunto de condiciones mientras que otras pueden no hacerlo.(Roca y Mroginski, 1991)

El pH

Generalmente se supone que los cultivos de tejidos de plantas pueden sobrevivir en un amplio rango de pH. Steward et al. (1952). Los pH iniciales de la mayoría de los medios son generalmente de 4.0 a 5.5, en ausencia de varios suplementos de crecimiento.

En la mayoría de los casos se requiera ajustar el pH, aumentándolo con una solución 0.01 o 0.1 N de Hidróxido de Potasio o de Sodio; normalmente el ajuste de pH se hace a

5.5, 5.8 o 6.3. Según Arditti(1977)las orquídeas generalmente se desempeñan mejor en un medio levemente más ácido.(Roca y Mroginski, 1991)

Temperatura

La temperatura es constante en muchas cámaras de cultivo manteniéndose entre 22 y 25° C durante la noche, puede ser favorable. Cuando en cultivo *in vitro* interfiere con problemas de interrupción de letargos o de inducción floral o degeneración de plántulas, o amarillamiento en el caso de protocormos, la acción de temperaturas relativamente bajas es necesaria, a veces, o útil para imitar las variaciones estacionales de temperatura.(Mateo y Urbano 1988)

Según (Merchán,s.a)la temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Una complicación adicional se produce por el hecho de que puede existir interacción entre la temperatura óptima de crecimiento y otros factores como la luz, la composición del medio. (Banderas y Rodas, 2007)

Control de Temperatura

El control de temperatura en las áreas de crecimiento se puede lograr por medio de aparatos de aire acondicionado de pared o de un sistema central. En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarmas y controles para cortar la iluminación cuando falte el aire acondicionado.(Roca y Mroginski, 1991)

Luz

Generalmente la iluminación de las cámaras del cultivo se realiza mediante tubos fluorescentes. A menudo la conservación de capas de tejidos se realiza bajo iluminaciones relativamente débiles (2000 a 5000 lux).

La iniciación de los fenómenos (Rizogénesis, Caulogénesis), generalmente se ha observado con iluminaciones del mismo orden y a veces más débiles.

Cuando se trata de preparar las plántulas para la transferencia a tiestos en invernadero, parece preferible aumentar la intensidad de iluminación. (Mateo y Urbano,1988)

Estado Higométrico

Generalmente la obturación de los recipientes de cultivo asegura una humectación suficientes de la atmosfera ambiente. Por consiguiente no es necesario prever dispositivos adicionales que permitan controlar la higometría de la cámara de cultivo.(Mateo y Urbano,1988)

Fotoperíodo

Se recomienda dar 12 horas continuas de luz a explantes de orquídeas esto lo consigue con lámparas de neón que reemplazan a la luz solar y permiten un crecimiento controlado y rápido por incentivación clorofílica. Al mismo tiempo las lámparas irradian calor que tempera la cámara o cuarto de crecimiento, brindando luz y calor a los embriones en desarrollo.(Sanchez, 1994)

1.5 Análisis Químico del Plátano

La composición química del plátano caracterizada por la presencia de almidones y escasez de ácidos, lo hace un producto extremadamente sensible al oxígeno al igual que al calor. (org/nutrition/fruits, 2009)

Según el código Latinoamericano,1980.Otra fuente natural utilizada como complejo natural en los medios de cultivo es la pulpa de banano, que entre sus principales componentes presenta agua, vitaminas, carbohidratos, glucosa, componentes orgánicos e inorgánicos, auxinas, citoquininas etc., estos cumplen la función de acelerar el desarrollo y favorecer el crecimiento.(Banderas y Rodas,2007)

1.5.1 Información de nutrientes de la Harina de Plátano

Vitaminas		% DV	Minerales	% DV	Grasas	% DV
Vitamina A	248 UI	Calcio	22 mg	Grasa total	1,81 mg	2%
Retinol	0 mcg			Grasa saturada	0,698 mg	3%
Retional actividad equivalente	12 mcg	Hierro	1,15 mg	Grasa monoinsaturada	0,153 mg	~
Alfa Caroteno	96 mcg	Magnesio	108 mg	Grasas poliinsaturadas	0,337 mg	~
Beta Caroteno	101 mcg	Fósforo	74 mg			
Beta criptoxantina	0 mcg	Potasio	1491 mg			
Licopeno	0 mcg	De sodio	3 mg			
Luteína + zeaxantina	84 mcg	Zinc	0,61 mg			
Vitamina C	7 mg	Cobre	0,391 mg			
Vitamina E	0,39 mg	Manganeso	0,574 mg			
Vitamina K	2 mcg	Selenio	3.9 mcg			
Tiamina	0,18 mg					
Riboflavina	0,24 mg					
Niacina	2,8 mg					
Vitamina B6	0,44 mg					
Vitamina B12	0 mcg					
Folato	14 mcg					
Folato de alimentos	14 5,6 mcg	~				
Ácido fólico	0 mcg	~				
Equivalentes de la dieta Folato	14 mcg	~				
Ácido pantoténico	0 mcg	0%				

Fuente: www.elook.org/nutrition/fruits/.(2009)

1.5.2 Harina de Plátano Utilizado



Costo:

Harina de Plátano 500g 0.45 USD

1.6 Banana Powder (SIGMA)

Polvo de plátano (Producto N ° B 4032)

Sigma ofrece un plátano en polvo para su uso en orquídeas y otras plantas de cultivo celular. B4032 número de producto es un polvo de secado por aspersión una mezcla de plátano y dextrina. La utilización de este producto en alrededor de 40 g / L.

Para reducir la aglutinación, agregue lentamente el polvo al medio de cultivo con agitación constante. La presencia de sólidos de banano es común en medio que contiene ambos productos.

Costo:

Banana Powder 500g 51.40 USD

(Sigma Biochemicals & Reagents, 2005)

1.7 Medio de Cultivo Phytamax 6793

En investigaciones realizadas estas formulas han sido modificadas para obtener mejores resultados es el caso del medio utilizado para este estudio Phytamax 6793, que se fundamenta en el medio MS. Existen además una infinidad de medios específicos para especies de orquídeas, que varía su composición dependiendo de las necesidades y objetivos del estudio.

La tendencia actual en la propagación de plantas es el empleo de medios de cultivo cada vez más simples y económicos que faciliten y agilicen el proceso de micropropagación, lo que ha sido posible gracias al dominio, cada vez mayor, de los factores que influyen el cultivo in Vitro. (Pérez, 1998).

Formulación:

Reactivos para la preparación del medio phytamax 6793 (solución madre) según el manual Sigma. (Tabla1)

Aditivos:

Azúcar	20g/lt
Agar	5g/lt
Carbón Activado	2g/lt
Peptone	2000mg/lt
Acido Nicotinico	0.5mg/lt
BAP	2mg/lt
Agua Destilada	aforar a 1000ml

(BAP: 6-Benzylaminopurine)

Vitaminas:

Piridoxina	0,5ml/lt
Tiamina	0.5ml/lt

Tabla 1

Medio de Cultivo	
Producto	Phytamax
	P 6793
	mg / litro
NO ₃ (NH ₄)	825
NO ₃ K	950
SO ₄ Mg	90.35
SO ₄ Mn	8.45
SO ₄ Zn	5.3
SO ₄ Cu	0.0125
IK	0.415
ClCo	0
Cl ₂ Ca	0
PO ₄ H ₂ K	85
BO ₄ H ₃	3.1

MoO ₄ Na ₂	
SO ₄ Fe	27.85
EDTA	27.85
NO ₃ Na	0
SO ₄ (NH ₄) ₂	0
(NO ₃) ₂ Ca	0
Mo ₃	0
CLNi	0
CLK	0
Citrato de Fe	0
ClAl	0
Ca fosfato tribásico	0
ClCo	0.0125
Fe tartrate	0
Mees	1000

Fuente: Manual Sigma

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del Área de Estudio:

El estudio fue realizado en el laboratorio y orquideario de la Fundación Bonanza por la Vida del Ing. Juan Pablo Jara, ubicada en la autopista Cuenca-Azogues en Zhullín sector el Carmen, a una altura de 2450 msnm.

Durante el proyecto se mantuvieron las siguientes condiciones de laboratorio: una temperatura de 22-24° C en el día y 18° C por la noche, con una humedad relativa de 44- 51%. Luz artificial proporcionada a través de lámparas de neón de 40 W que remplazan la luz solar, con un fotoperiodo de 10 horas luz directa y en la noche apagado.

2.2 Datos del Laboratorio

La Fundación cuenta con un laboratorio de micropropagación que asegura la permanencia de las especies ya que cuentan con una buena producción de especies mediante el cultivo in-vitro.

La Fundación ha involucrado especies vegetales de interés ornamental, agrícola, medicinal, forestal, con las que se encuentra trabajando obteniendo resultados investigativos importantes los que ayudaran para su conservación futura.

Cuenta además con la infraestructura y establecimientos adecuados para el manejo y cultivo de las especies dándoles las mismas condiciones que en sus hábitats naturales.

Las plántulas utilizadas en el proyecto se obtuvieron del laboratorio de la misma fundación.

2.3 Materiales:

Equipos:

- Cámara de Flujo Laminar.
- Generador de Ozono
- Balanza digital (mg.)
- Balanza gravitatoria (mg.)
- Autoclave.
- Potenciómetro
- Calibrador (Vernier Caliper 150 x 0,05mm)
- Refrigerador.
- Cocina.

Materiales de vidrio:

- Cajas Petri.
- Erlenmeyers (500ml, 1000ml).
- Pipetas graduadas (1ml, 2ml, 5ml)- Probetas (100ml).
- Vasos de precipitación
- Varillas de agitación.
- Frascos de vidrio.

Otros:

- Mecheros de alcohol
- Aspersor de alcohol
- Instrumentos Modificados (pinzas)
- Papel aluminio
- Ollas metálicas.

- Cucharas.
- Algodón.
- Mascarillas.
- Cinta masquin.
- Etiquetas para identificación
- Cuaderno de registros.
- Lápices.
- Marcadores permanentes.
- Cinta plástica

Reactivos:

- Medio de cultivo (Phytamax 6793)
- Agar – agar
- Carbón activo.
- Agua destilada
- Vitaminas (Thiamina y Piridoxina)

Sustancia Nutritiva:

- Harina de Plátano (30,40,50,60g)

Químicos:

- Alcohol.
- Cloro.
- Jabón liquido.
- Detergente.
- Desinfectante
- Insecticida

Biológico:

Plántulas de orquídea de la *sp Cattleya máxima*.

2.4 Diseño Experimental

Factor en Estudio:

Para este proyecto se tomo en cuenta un factor de estudio: Las concentraciones de la Harina de Plátano.

Las que nos permitirán determinar que concentración influye más en el crecimiento de las plántulas y en el número, desarrollo y vigor de las raíces de la *sp Cattleya maxima*.

Variables:

- Crecimiento de las plántulas (Medida: Base- Ápice)
- Número de Raíces (presencia o ausencia)

Tratamientos:

- T1: Medio Phytamax 6793 sin sustancia nutritiva (testigo)
- T2: Medio Phytamax 6793 + 30g de harina de plátano
- T3: Medio Phytamax 6793 + 40g de harina de plátano
- T4: Medio Phytamax 6793 + 50g de harina de plátano
- T5: Medio Phytamax 6793 + 60g de harina de plátano.

2.4.1 Descripción del Diseño Experimental.

La resiembra de las plántulas de la *sp Cattleya maxima* se realizó en medio phytamax 6793 más la adición de harina de plátano en distintas concentraciones.

Las concentraciones utilizadas fueron de 30,40,50,60, gr de harina de plátano, serán 4 tratamientos y cada tratamiento tendrá 10 repeticiones. Y un tratamiento más de medio phytamax sin la adición de ninguna sustancia nutritiva, en total fueron 5 tratamientos y 10 repeticiones

En cada frasco se sembró de 15 a 20 plántulas de la *sp Cattleya maxima*.

La toma de datos se realizo a partir de la siembra con una marca de color negro para las medidas iniciales y después una vez al mes durante 5 meses, usando diferentes colores para las medidas de cada mes.

Para la toma de datos se eligió 5 plántulas de forma aleatoria para cada tratamiento en la que se tomaron datos de tamaño total de las plántulas en cm.(desde la base del tallo hasta el ápice de las hojas), número de raíces, desarrollo o ausencia de las mismas, a partir de estos datos se calculó un valor promedio para cada variable.

Se tomó en cuenta también imprevistos como contaminación de replantes, muerte, daño del medio etc..

2.5 Fase de Laboratorio

Para esta investigación se utilizó plántulas de la especie *Cattleya maxima*, especie que ya fueron trabajadas con anterioridad en el laboratorio de la Fundación, las plantas madres se obtuvieron por siembra de semillas en medio de cultivo Phytamax 6793(semillas sembradas con fecha 05/11/08) Las semillas de la planta madre fueron tomadas por el dueño de la fundación en Vilcabamba provincia de Loja. (Ver Anexo 4 Fotografía 4.1).

La selección del material vegetal con el que se trabajo, fueron frascos que contenían el mejor material para el replante, es decir plántulas que se encontraren en un buen estado, tamaño adecuado y con la cantidad de plántulas suficientes para su extracción y su posterior siembra.

El medio utilizado fue Phytamax 6793, es uno de los medios más utilizados para la siembra de orquídeas, con muy buenos resultados en muchos estudios y en la Fundación.

Una vez llenados los frascos con los medios de cultivo se procedió a marcar las tapas con códigos para identificar a cada tratamiento, en este caso se utilizó T1, T2, T3, T4 y T5. Cada frasco se identificó con fecha de siembra, número de tratamiento, repetición y nombre de la especie. (Ver Anexo 4 Fotografía 4.16)

2.5.1 Preparación del Medio de Cultivo

Para la preparación del medio de cultivo phytamax se partió con la preparación de la solución madre (Reactivos) más aditivos para un litro de medio, (Tabla 1), luego se procedió a pesar los aditivos para la preparación de cada tratamiento. Después se pesaron los 30, 40, 50 y 60 g de harina de plátano.

En cada litro de medio phytamax 6793 se añadió las diferentes concentraciones de harina de plátano. (La harina de plátano se disolvió en agua destilada y se añadió al medio), en cada tratamiento se adicionó vitaminas (piridoxina 0.5ml y tiamina 0.5ml) una vez mezclado todo, se mide el pH con el pH metro que tiene que ser de 5.4 o 5.5. En este caso el valor del pH fue de 6.0 y se bajó con 11 gotitas de ácido clorhídrico hasta dar con un resultado de 5.5 de pH. (se baja el pH con ácido clorhídrico y se sube con hidróxido de sodio).

Luego se llevó a fuego el medio, en una olla de aluminio, cuando estuvo caliente se adicionó el agar y se cocinó hasta disolverlo, con una varilla se agitó constantemente para evitar grumos o sedimento (todo este proceso duró unos 13 min en total).

Caliente el medio se procedió a colocar el medio en los frascos previamente lavados y esterilizados, más o menos 1 cm y medio por frasco, y se tapó bien. Luego se colocaron los frascos para esterilizar los medios en el autoclave con 10 atmosferas de presión y se dejó por un tiempo de 10 min más.

Una vez sin presión el autoclave se sacó los frascos para dejarlos enfriar y gelificar luego identificarlos y prepararlos para la siembra. (Fueron 10 repeticiones por tratamiento en total 50 frascos).

2.6 Proceso de Siembra

Desinfección.

Previo a la siembra se desinfectó todo el laboratorio, desde estantes, mesones, cajones, sillas con alcohol y desinfectante, pisos con desinfectante y cloro, ventanas y puertas (de vidrio) con limpia vidrios y desinfectante, y el ambiente con insecticida para evitar la presencia de insectos.

En el piso se utilizó: 100cc de agua más 25cc de desinfectante y 25cc de cloro en una primera limpieza, luego otra con cloro al 100%.

Se desinfectó las paredes y la mesa de la cámara de flujo laminar con cloro y con alcohol, los frascos para la siembra también se desinfectaron con alcohol antes de ingresar a la cámara.

Los materiales a usarse en la siembra fueron previamente esterilizados y desinfectados con alcohol antes de ingresarlos a la cámara.

Para la siembra se utilizó un mandil limpio, el pelo recogido, mascarilla, y zapatos de uso solo en el cuarto de siembra, desinfectados con alcohol

Las manos se lavaron con jabón antibacterial hasta los codos y luego alcohol, una vez secas se colocó guantes para la siembra.

Antes de la siembra se prendió un Generador de Ozono 20 min antes para desinfectar el ambiente y matar gérmenes y bacterias.(Ver Anexo 4 Fotografía 4.3)

Siembra

Se empezó la siembra, colocando los frascos de los distintos tratamientos y los frascos con las plántulas madre a sembrar, dentro de la cámara de flujo.(Ver Anexo 4 Fotografía 4.2) El frasco con las plántulas se destapó y con un instrumento modificado previamente flameado en el mechero de alcohol se procedió a extraer cuidadosamente las plántulas a sembrarse, las que se colocaron en una caja petri estéril (antes de colocar las plántulas se roció con alcohol y se flameo la caja petri estéril una vez fría se colocó las plántulas). El uso de un instrumento modificado y no una pinza para la siembra se lo hizo con el fin de no dañar ni romper al ejercer presión sobre ellas) (Ver Anexo 4 Fotografía 4.4)

Cada frasco para la siembra se flameó y se abrió y se colocaron las plántulas al final se flameo el borde del frasco, la tapa y se cerró bien. (Se flamearon los instrumentos constantemente en el mechero). (Ver Anexo 4 Fotografía 4.6).

Se sembró en cada frasco de 15 a 20 plántulas aproximadamente dependiendo del tamaño de la plántula. Una vez sembrados los frascos se procedió a sellarlos con cinta plástica no herméticamente para permitir la respiración e intercambio de gases y evitar contaminación.

Al final se realizó el etiquetado de los frascos para la identificación de cada tratamiento, luego se colocaron en los estantes del cuarto de crecimiento.(Ver Anexo 4 Fotografía 4.7)

2.7 Toma de Datos

Una vez sembrados los frascos inmediatamente se procedió a la toma de las medidas iniciales a través de un calibrador (Ver Anexo 3 Fotografía 3.5), se eligieron por cada frasco 5 plántulas aleatoriamente y se las enumeró para llevar un mejor registro de su crecimiento. Para lo que se procedió a marcar la medida inicial con una línea pequeña, con un marcador permanente de color negro.(Ver Anexo 4 Fotografía 4.9)

La toma de datos se las realizó 1 vez por mes y por cada mes se utilizó un color diferente, la siembra fue realizada en el mes de mayo del 2009 (día 07) y los datos se tomaron cada 07 de cada mes.

*Se utilizó el color negro para el mes de mayo.

*Se utilizó el color azul para el mes de junio.

*Se utilizó el color rojo para el mes de julio.

*Se utilizó el color verde para el mes de agosto.

*Se utilizó el color morado para el mes de septiembre.

(Ver Anexo 4 Fotografía 4.10)

Los datos se tomaron en cm desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja más grande, con un calibrador (medidas con 2 decimales) fuera del frasco. Esta forma de toma de datos se realizó para evitar manipulación y contaminación de las plántulas o de los medios.

Los datos obtenidos con el calibrador son confiables y no presentan margen de error. Con los datos obtenidos se procedió a analizarlos y evaluarlos estadísticamente.(Ver Anexo 4 Fotografía 4.8)

Cada vez que se midieron las plántulas, se anotó el número de raíces y el estado de las plántulas (color y vigor).

2.8 Análisis de Datos

Para el análisis del crecimiento promedio (base – ápice) de la especie estudiada *Cattleya maxima* se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2007 y para el análisis de las medidas finales (5 meses), se empleó el Análisis Estadístico de Varianza ANOVA a 1 criterio.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Análisis de Promedios de medidas registradas por mes por cada tratamiento durante el Proyecto

Resultados del crecimiento promedio (base – ápice) en cm. de *Cattleya maxima* (durante 5 meses)

	Mayo		Junio		Julio		Agosto		Sept
T 1	0,43	T1	0,63	T1	0,85	T1	1,06	T1	1,25
T2	0,45	T2	0,63	T2	0,87	T2	1,10	T2	1,31
T3	0,38	T3	0,52	T3	0,76	T3	1,04	T3	1,24
T4	0,38	T4	0,51	T4	0,77	T4	0,82	T4	1,01
T5	0,40								
Prom	0,41	Prom	0,57	Prom	0,81	Prom	1,01	Prom	1,20

Los resultados que se obtuvieron del crecimiento en relación al tiempo en las plántulas del tratamiento T1 (Phytamax 6793 sin complejos naturales) tuvo buen crecimiento, las plántulas tuvieron un buen aumento de tamaño cada mes. Este tratamiento actuó como testigo para ver si hay diferencia con los otros tratamientos utilizados con Harina de plátano (**HP**) a distintas concentraciones.

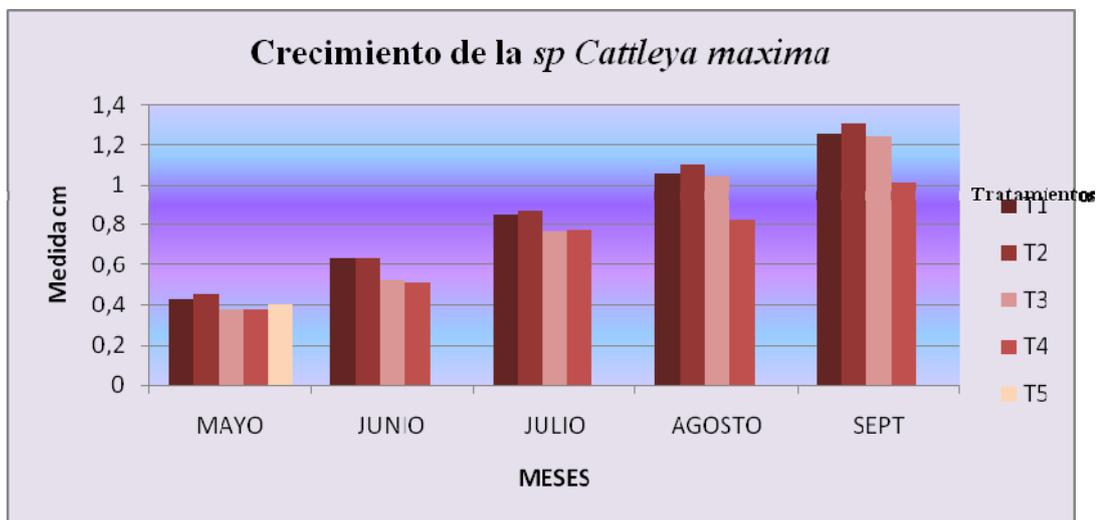
En el tratamiento T2 (Phytamax 6793 + HP 30g) el aumento en el crecimiento de esta especie fue mayor, las plántulas crecieron mucho más a comparación de los otros tratamientos.

El Tratamiento T3 (Phytamax 6793 + HP 40g) tuvo también buen crecimiento pero en menos proporción.

En el Tratamiento T4 (Phytamax 6793 + HP 50g) no presentó buen crecimiento, hubo una disminución en el tamaño de las plántulas.

En el caso del T5 (Phytamax 6703 + HP 60g) no se pudieron tomar datos ya que al poco tiempo de su siembra (15 días) las plántulas sufrieron una intoxicación, y murieron. (Ver Anexo 3 Fig 3.1Fig,3.2Fig,3.3Fig,3.4Fig,3.5)

3.2 Análisis y Comparación del Crecimiento de la *sp Cattleya maxima* entre Tratamientos con el Promedio Total durante los 5 meses de investigación.



En el análisis de los promedios totales se puede ver claramente la influencia de los tratamientos en el crecimiento de la *sp Cattleya maxima*.

El crecimiento de las plántulas en los 5 meses de estudio en el tratamiento 1 se puede observar un buen crecimiento de las plántulas obteniendo en el mes de septiembre un buen tamaño de las plántulas, tomando en cuenta que este es un medio testigo sin la adición de ninguna sustancia nutritiva.

En el Tratamiento 2 las plantas obtuvieron los mejores resultados en el crecimiento ya que las plántulas crecieron más y para septiembre las plántulas tuvieron el mejor tamaño.

Las plántulas del Tratamiento 3 tuvieron una disminución en el tamaño a partir del mes de agosto en donde las plántulas no crecieron mucho y en septiembre tampoco mostraron un aumento de tamaño significativo.

En cuanto al Tratamiento 4 las plántulas no tuvieron un buen crecimiento en todos los meses registrados, a partir del mes de julio las plántulas no crecieron mucho y en los meses de agosto y septiembre las plántulas casi estancaron su crecimiento.

En el Tratamiento 5 no se obtuvieron datos por muerte de las plántulas.

3.3 Análisis de las Características de las plántulas de la *sp Cattleya maxima* Cuadro de Observaciones Finales

Características de las Plántulas de la <i>sp Cattleya maxima</i>	
Tratamiento 1 Phytamax 6793	Este tratamiento tuvo buen crecimiento, plántulas largas, grandes y delgadas
	Numero de hojas de 2 a 3 por plántula
	La mayoría de repeticiones no presentan raíz y en otras tienen una sola raíz
	Raíz delgada muy pequeña de color verde
	Presentan un buen color
Tratamiento 2 Phytamax + 30g de HP	Este tratamiento presento las mejores características:
	Buen crecimiento, plántulas grandes
	Plántulas muy vigorosas
	Abundancia de hojas (de 6 a 7 por plántula)
	Raíces blancas con micro vellosidades, apuntan hacia arriba(aérea)
	Raíz de tamaño mediano y gruesa, numero de 1 a 2 por plántula
Buen color	
Tratamiento 3 Phytamax + 40g de HP	Tratamiento con buen crecimiento, de tamaño mediano
	Número de hojas de 3 a 4 por plántula
	Raíces pequeñas y gruesas apuntan hacia arriba, con micro vellosidades
	Número de raíces de 1 a 2 por plántula
	Buen color
Tratamiento 4 Phytamax + 50g de HP	Tratamiento de plantas pequeñas
	Numero de hojas de 2 a 3 por plántula
	Este tratamiento presento mayor número y desarrollo de las raíces
	Raíces largas(+ de 1 cm) y delgadas de color verde, sin vellosidades
	La mayoría de plántulas con 1 raíz larga y las demás pequeñas
	raíces que crecen en el medio y algunas dentro
Buen color	
Tratamiento 5 phytamax + 60 gr de HP	En este tratamiento las plántulas se volvieron de color amarillo a los 15 días de la siembra
	Plántulas decaídas con las hojas sobre el medio
	Al termino del mes las plántulas se murieron
	Plántulas presentaron signos de Intoxicación
HP: Harina de Plátano	

Cada Tratamiento tuvo diferencias significativas en el desarrollo de la *sp Cattleya maxima*, como se puede observar en el cuadro.

En el T1 las características y el tamaño de las plántulas son buenas, son plántulas grandes pero un poco delgadas.(Ver Anexo 4 Fotografía 4.11)

El T2 tuvo el mejor tamaño y desarrollo, este tratamiento presentó las mejores características a diferencia de los demás Tratamientos. Son plántulas vigorosas , grandes y con buenas raíces y mayor número de hojas (Ver Anexo 4 Fotografía 4.12)

El T3 dio plántulas de tamaño mediano con raíces pequeñas, con buen color y vigor (Ver Anexo 4 Fotografía 4.13)

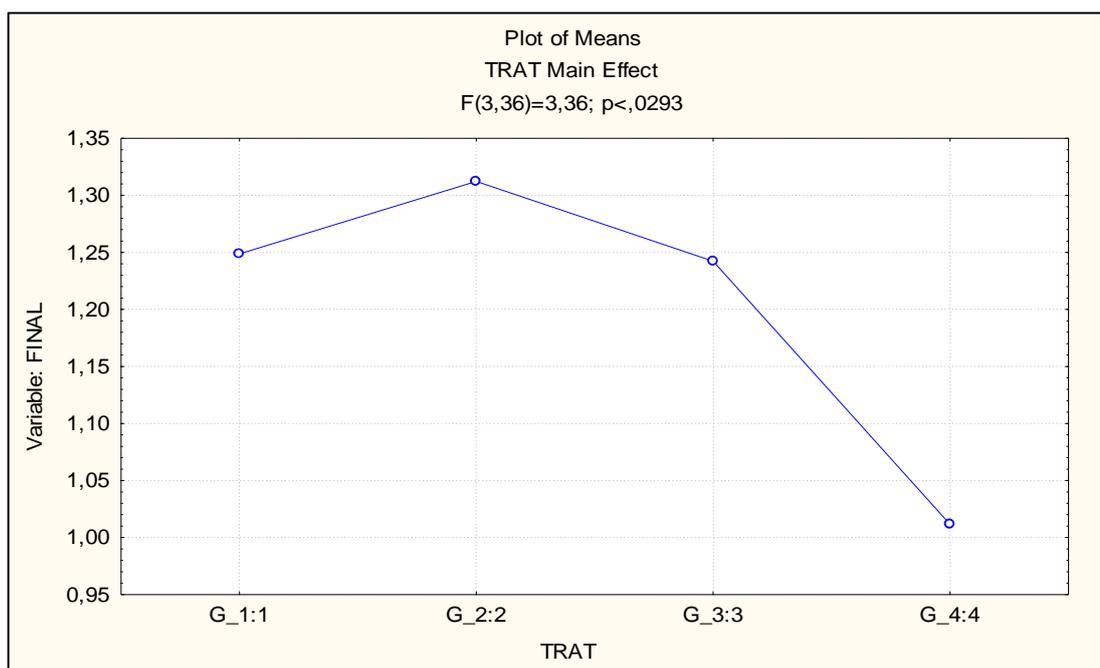
El T4 dio plántulas pequeñas con raíces grandes y largas, buen color y poco vigor, buen color.(Ver Anexo 4 Fotografía 4.14)

En el T5 las plántulas se murieron, a causa de una Intoxicación. (Ver Anexo 4 Fotografía 4.15)

*En todos los tratamientos las raíces brotaron en el mes de Junio.

3.4 Análisis Estadístico

El Análisis Anova sobre los resultados finales dan un resultado positivo ($F= 3,35$, $p= 0,292$) (Ver anexo 2 Tabla 2.1)



El análisis Anova sobre los resultados del inicio, no había diferencia significativa entre los tratamientos ($F= 2,21$, $p= 0,103$)

Como resultado del Análisis “a posteriori” de Sheffe demuestra que el Tratamiento 2 fue el mejor (dio los mejores resultados), y el Tratamiento 4 fue el

3.5 DISCUSION

Analizando los resultados obtenidos se puede ver claramente una influencia significativa de los tratamientos en el crecimiento de la *sp Cattleya máxima*.

Determinando así, que las plántulas que tuvieron el mejor crecimiento son las del Tratamiento 2 con la adición de 30g de Harina de Plátano, las plántulas tuvieron un excelente tamaño y un mejor desarrollo, y las mejores características en cuanto al color, vigor, raíces y un mayor número de hojas.

Las cantidades disponibles de luz, oxígeno, anhídrido carbónico, temperatura, entre otros factores favorecerían activando las funciones fisiológicas de respiración, fotosíntesis, absorción de nutrientes, producción de glucosa endógena lo que ocasiona mayor crecimiento foliar.(Villena y Lala,2002)

El Tratamiento 1 también tuvo muy buenos resultados en el crecimiento de las plántulas tomando en cuenta que este medio no tenía la adición de sustancia nutritiva tuvo un buen crecimiento en comparación con el Tratamiento 2 que fue el mejor. Las plántulas presentaron buenas características en su desarrollo.

En el estudio realizado por Banderas y Rodas dicen que los tratamiento PS (Phytamax sin complejos naturales) PG (50 gr. pulpa de banano) y PCH (Phytamax con 100 gr. leche de maíz tierno) presentaron buenos resultados, esto indica que las necesidades de las plántulas son distintas y varían según la especie. Así pues tratamientos que tienen

excelentes resultados para una especie puede tener resultados totalmente contradictorios para otras especies. (Banderas y Rodas, 2007)

El estudio realizado por Banderas y Rodas observó que para crecimiento de tallo y de raíz tanto en *Oncidium loxense* como en *Cattleya hibrida*, PG 150 (Phytmax con 150 gramos de pulpa de banano) fue el tratamiento que presentó los mejores resultados. En cuanto a crecimiento se corroboró que con *Cattleya* se confirma la teoría que a mayor concentración de auxinas, citoquininas y nutrientes se obtiene un mayor crecimiento. (Banderas y Rodas, 2007)

En el Tratamiento 3 con la adición de 40g de Harina de Plátano presentó un menor crecimiento de las plántulas, su tamaño comparable con T1, en cuanto a su desarrollo no tuvo mucha influencia, las plántulas no presentaron características significativas.

La variabilidad en el crecimiento de unas plántulas a otras está determinado por las dosis de los tratamientos, éstas están relacionadas con el contenido total de sales y las cantidades variables disponibles de macro y micro elementos absorbidos (Villena y Lala, 2002)

El Tratamiento 4 con la adición de Harina de Plátano de 60 g no tuvo influencia en el crecimiento de *Cattleya maxima*, las plántulas detuvieron su crecimiento a partir del mes de agosto, en cuanto a las características este tratamiento tuvo un tamaño pequeño pero un mayor desarrollo y número de raíces a diferencia de todos los tratamientos.

Resultados similares fueron obtenidos en la utilización de Tratamiento Murashige y Skoog (50% concentración) en crecimiento de protocormos de *Cattleya máxima* en donde se detectó una elongación de raíces mayor que en otros tratamientos usados en la investigación, lo que se debió a la óptima concentración de nutrientes minerales de la fórmula (Ms 50%) que influyó en la suficiente síntesis de hormonas radiculares para su crecimiento, cantidades de hormonas caulinares y foliares que sin embargo pudieron ser

insuficientes para el normal desarrollo de follaje que se detectó con un incremento mayor en elongación de raíces sobre altura de plántulas en este tratamiento.(Villena y Lala,2002)

El Tratamiento 5 con la adición de 60g de Harina de Plátano nos dio como resultado una saturación de nutrientes, presentando una intoxicación de las plántulas y posterior muerte. Esta cantidad de Harina de Plátano no es buena en el uso con medios de cultivo. No se pudo obtener datos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de esta investigación científica en la Influencia en el crecimiento de la *sp Cattleya maxima* mediante la micropropagación por el método de Cultivo In Vitro, utilizando medio Phytamax 6793 más la adición de una sustancia nutritiva como la Harina de Plátano (**HP**), el mejor resultado se obtuvo con el Tratamiento 2 (Phytamax + 30gr de HP)

Se utilizó como testigo el Tratamiento 1: medio Phytamax 6793 sin sustancia nutritiva (**ssn**)

La mayor altura se obtuvo con T2 (+30g de HP) en primer lugar, este tratamiento presentó la concentración óptima de nutrientes favoreciendo positivamente en las funciones fisiológicas de crecimiento y mejor desarrollo de las plántulas de este estudio.

T2 se obtuvo el mejor tamaño de plántulas, un buen número de raíces, plántulas vigorosas, con el mayor número de hojas, buen color.

En cuanto al vigor de las plántulas el T2 (+30g de HP) fue el mejor, y en el T1 (ssn) las plántulas son grandes pero un poco más delgadas es decir con menos vigor.

El crecimiento de las plántulas en T4 (+50 g de HP) se estanco dando plántulas pequeñas pero con un mayor desarrollo de sus raíces a diferencia de todos los tratamientos. Determinando que esta concentración fue la mejor en cuanto a desarrollo de raíces, pero no en crecimiento.

T3 (+40 gr de HP) no proporcionó resultados significativos en cuanto a tamaño y desarrollo de las plántulas.

Se puede determinar a través de este estudio que la cantidad de 60g de harina de Plátano (T5) fue demasiado ya que provoco la muerte de las plántulas por una saturación de nutrientes.

En cuanto al uso de la Harina de Plátano como sustancia nutritiva adicionado a un medio de Cultivo es definitivamente más barato que la utilización del medio Banana Powder de la casa Sigma ya que su valor es sumamente alto.

Los costos de una funda de Harina de Plátano de 500g está en el mercado a 0.45 USD mientras que la casa Sigma ofrece medio Banana Powder 500g a 51.40 USD.

Hay que tomar en cuenta que la casa Sigma con Banana Powder sugiere el uso 40g/L para la preparación medio, mientras que en esta investigación en vista de los buenos resultados obtenidos se sugiere el uso de la Harina de Plátano a 30g/L.

Estos datos nos llevan a que el uso de la Harina de Plátano común que hay en el mercado reduce significativamente los costos de producción y es de fácil acceso.

Recomendaciones:

La utilización de 30g de Harina de Plátano en medio cultivo para un buen crecimiento. Esta concentración es la óptima para el crecimiento y desarrollo de las plántulas. Sin embargo estos resultados no se pueden generalizar para todas las especies de orquídeas debido a que pueden variar según las exigencias y necesidades de cada especie.

Por los resultados obtenidos puedo recomendar investigar el crecimiento en otras especies con Harina de Plátano a 30 g de concentración u otras concentraciones, citando que en el Orquideario de la Fundación Bonanza por la Vida en donde se realizó esta investigación se han hecho estudios con Harina de plátano obteniendo excelentes resultados según el Ing. Juan Pablo Jara dueño de la Fundación.

La contaminación no fue una variable analizada en este estudio pero vale mencionar que no hubo mucha contaminación, los frascos contaminados fueron por hongos y bacterias, este sigue siendo un problema que afecta seriamente a los cultivos in Vitro. Por lo que se recomienda tener una buena asepsia y manipulación de los materiales al momento de la siembra y mantener el lugar y el ambiente de trabajo aséptico o lo más estéril posible para impedir el ingreso de patógenos y evitar contaminación.

Para toma de medidas de plántulas recomiendo se utilice el Calibrador ya que la medición se la hace fuera del frasco y así se evita la manipulación del material vegetal y por ende la contaminación.

BIBLIOGRAFIA

ARANGO, L. *Orquídeas Nativas del Ecuador*. Sociedad Colombiana de Orquideología, Ed. Compañía Litográfica Nacional S.A Medellín.1990 Vol 1 p.60-61.

BANKS, D. *Cultivo de Orquídeas*. Propagación y Variedades Edición Blume. Barcelona.2004 p. 2-23

BANDERAS, K ; RODAS, E. *Comparación del desarrollo in-vitro de dos especies de orquídeas Oncidium loxense y Cattleya hibrida (Evas melody x Laelio cattleya), aplicando distintas concentraciones de banano (Musa xparadisiaca) y leche de maíz (Zea mays) en medio de cultivo Phytamax a distintas frecuencias de replante*. Director Dra. Raffaella Ansaloni. Universidad del Azuay. Facultad de Ciencia y Tecnología. Escuela de Biología del Medio Ambiente,2007.

BEECHTEL, H. et al. *The manual Cultivated Orchid Species*. The Mit Press, Massachusetts. 1981

CALAWAY, D; BENNETT, D. *Orchids of Perú*. Icones Plantarum Tropicarum. Missouri Botanical Garden. Issued 29 December 1989.p 19.

DODSON, C; ESCOBAR, R. *Orquídeas Nativas del Ecuador*. Compañía Litográfica Nacional. Editorial Colina. Vol. 1. (s.l). 2002. p. 104.

DODSON, C. *Orchids of Ecuador*. Orchids Fotos and Drawings V2 A-Z.Program 2005.

HIRTZ, A ; et al. *El País de las Orquídeas*. Ecuador Terra Incógnita. N° 31. 2004. p. 21-26.

HIRTZ, A ; et al. *Donde están las Orquídeas?*. Ecuador Terra Incógnita. N° 31. 2004. p. 28-30.

HURTADO, D; MERINO, M. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas. Primera Reimpresión. México, D. F. 1988. p. 61-98

Información Nutricional sobre el Banano, deshidratada, en polvo o plátano.
www.elook.org/nutrition/fruits/1929.html - 10k [ref. de 20 de mayo 2009]

JARA, J. *Fundación Bonanza*. Boletín Informativo del Laboratorio de Micropropagación, Orquídeario y Laboratorio. Azogues.

MATEO, J; URBANO, P. *Multipliación Vegetativa y cultivo in vitro*. Versión Española. Universidad Politécnica de Madrid. Ediciones Mundi Prensa. Madrid 1988. P 80-190.

MERCHÁN, F. *Cultivo de Orquídeas In Vitro*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca, Ecuador. (s.l.) (s.a.) p. 1-20.

MERCHÁN, F. *Los Medios de Cultivo*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca, Ecuador. (s.l.) (s.a.) p. 1-5.

PEREZ, J; et al. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Ediciones Geo. Cuba. 1998. p. 13-155.

ROCA, W; MROGINSKI, L. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Capítulos 1,2,3,4. Publicación CIAT No 151 ISBN ed. Única. Impreso en Colombia. Mayo 1991. p.2-69.

ROJAS, M; RAMIREZ, H. *Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas*. Segunda Edición. Editorial Limusa. Mexico. 1993. p. 21-55.

REISINGER, D, ET AL. *Clonal Propagation of Phalaenopsis by means of Flower-Stalk Node Cultures*. 1976 Orchid Rev 84, p45-52

SANCHEZ, E. et al. *Reproducción de Orquídeas a partir de sus sus semillas utilizando medios de cultivo orgánicos e inorgánicos*. Instituto de Investigaciones de Ciencias Técnicas de la Universidad de Cuenca (I.I.C.T.), ed. Única, Cuenca, Ecuador. 1994. p. 86-100

SANCHEZ, E. *Orquídeas la Riqueza Escondida*. Investigador del Laboratorio "Orquídeas de los Andes".(s.l) (s.a). p. 1-3

SIGMA PLANT TISSUE CULTURE . Printed in USA. 1994.

SIGMA BIOCHEMICALS & REAGENTS,for life Science Research. Plant cell culture tested. Saint Louis Mo 63178 USA.2005, p 247.

SIGMA ORCHID CULTURE MEDIA,www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue.../orchid-culture-media.html - 87k [ref. de 20 de mayo 2009].

VALENCIA, R. N. PITMAN, S. LEÓN-YÁNEZ & P.M. JORGENSEN (eds) 2000. *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador 2000*. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

VILLENA, P; LALA, E. *Desarrollo de Protocormos de Cattleya máxima en tres fases de crecimiento utilizando los medios Cosper y Murashige y Skoog, modificados*.

Director Ing. Agr. Juan Barragán. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica. Cuenca, Ecuador. 2002.

ANEXOS

Anexo 1:

Tabla 1.1 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 1 mes de Mayo

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,40	0,47	0,65	0,50	0,70	0,30	0,44	0,60	0,50	0,55
2	0,54	0,39	0,50	0,30	0,33	0,29	0,47	0,65	0,38	0,27
3	0,44	0,39	0,54	0,56	0,31	0,30	0,30	0,46	0,60	0,30
4	0,38	0,46	0,45	0,33	0,32	0,22	0,35	0,40	0,40	0,30
5	0,33	0,30	0,66	0,50	0,31	0,30	0,70	0,45	0,32	0,34
PROMEDIO	0,42	0,40	0,56	0,44	0,39	0,28	0,45	0,51	0,44	0,35

Tabla 1.2 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 1mes de Junio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,67	0,76	0,90	0,80	0,86	0,40	0,65	0,72	0,60	0,82
2	0,80	0,60	0,64	0,67	0,50	0,52	0,68	0,83	0,42	0,44
3	0,80	0,65	0,75	0,64	0,44	0,50	0,58	0,64	0,66	0,58
4	0,65	0,66	0,66	0,65	0,40	0,36	0,50	0,54	0,52	0,43
5	0,64	0,74	0,99	0,68	0,57	0,45	0,94	0,56	0,60	0,50
PROMEDIO	0,71	0,68	0,79	0,69	0,55	0,45	0,67	0,66	0,56	0,55

Tabla 1.3 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 1 mes de Julio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,07	0,96	1,10	0,93	1,06	0,56	0,80	0,93	0,65	1,00
2	1,26	1,07	1,00	0,95	0,68	0,57	1,03	1,02	0,53	0,60
3	1,10	0,95	1,10	0,71	0,73	0,54	0,77	0,78	0,90	0,81
4	0,97	1,04	0,84	0,90	0,59	0,44	0,70	0,94	0,62	0,64
5	1,13	0,81	1,22	0,94	0,86	0,50	1,12	0,74	0,70	0,74
PROMEDIO	1,11	0,97	1,05	0,89	0,78	0,52	0,88	0,88	0,68	0,76

Tabla 1.4 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 1 mes de Agosto

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	1,39	1,44	1,15	1,14	0,96	0,99	1,17	0,85	1,05
2	0	1,40	1,43	1,10	0,87	0,84	1,50	1,25	0,70	0,62
3	0	1,18	1,40	0,97	0,95	0,75	0,97	1,05	1,00	0,99
4	0	1,22	1,16	1,16	0,90	0,70	0,90	1,30	0,85	0,81
5	0	1,13	1,38	1,27	1,27	0,74	1,21	0,94	0,87	0,91
PROMEDIO	0	1,26	1,36	1,13	1,03	0,80	1,11	1,14	0,85	0,88

0: Contaminado

Tabla 1.5 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 1 mes de Septiembre

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	1,64	1,73	1,27	1,21	0,97	1,20	1,40	1,03	1,06
2	0	1,63	1,81	1,31	1,09	0,85	1,70	1,40	0,94	0,63
3	0	1,40	1,61	1,25	1,13	0,76	1,15	1,28	1,27	1,00
4	0	1,44	1,44	1,50	1,10	0,71	1,13	1,63	1,04	1,00
5	0	1,30	1,72	1,40	1,32	1,01	1,50	1,13	1,18	0,92
PROMEDIO	0	1,48	1,66	1,35	1,17	0,86	1,34	1,37	1,09	0,92

0: Contaminado

Tabla 1.6 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 2 mes de Mayo

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,61	0,44	0,44	0,57	0,51	0,38	0,54	0,39	0,70	0,80
2	0,40	0,30	0,35	0,53	0,32	0,34	0,36	0,32	0,55	0,68
3	0,60	0,44	0,47	0,31	0,35	0,37	0,30	0,50	0,59	0,40
4	0,33	0,46	0,32	0,41	0,40	0,34	0,44	0,44	0,50	0,70
5	0,57	0,41	0,32	0,31	0,33	0,40	0,60	0,55	0,36	0,48
PROMEDIO	0,50	0,41	0,38	0,43	0,38	0,37	0,45	0,44	0,54	0,61

Tabla 1.7 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 2 mes de Junio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,72	0	0,55	0,66	0	0,40	0	0,67	0,88	0,83
2	0,50	0	0,52	0,64	0	0,35	0	0,50	0,60	0,85
3	0,68	0	0,70	0,77	0	0,70	0	0,60	0,63	0,57
4	0,84	0	0,60	0,67	0	0,46	0	0,73	0,77	0,80
5	0,60	0	0,41	0,50	0	0,38	0	0,74	0,60	0,52
PROMEDIO	0,67	0	0,56	0,65	0	0,46	0	0,65	0,70	0,71

0: Contaminado

Tabla 1.8 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 2 mes de Julio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,94	0	0,93	0,81	0	0,70	0	0,72	1,02	1,04
2	0,94	0	0,72	0,99	0	0,72	0	0,60	0,78	1,00
3	1,03	0	0,80	1,08	0	0,96	0	0,62	0,94	0,83
4	1,11	0	0,90	1,00	0	0,60	0	0,81	0,95	1,00
5	0,97	0	0,67	0,81	0	0,64	0	0,91	0,80	0,97
PROMEDIO	1,00	0	0,80	0,94	0	0,72	0	0,73	0,90	0,97

Tabla 1.9 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 2 mes de Agosto

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,23	0	1,14	0,81	0	1,00	0	1,05	1,25	1,35
2	1,31	0	0,91	0,99	0	0,97	0	0,97	1,12	1,27
3	1,27	0	1,00	1,08	0	1,15	0	1,05	1,20	1,19
4	1,32	0	1,15	1,00	0	0,81	0	1,15	1,30	1,20
5	1,11	0	0,93	0,81	0	0,86	0	1,20	1,11	1,35
PROMEDIO	1,25	0	1,03	0,94	0	0,96	0	1,08	1,20	1,27

0: Contaminado

Tabla 1.10 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 2 mes de Septiembre

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,27	0	1,25	1,14	0	1,14	0	1,34	1,54	1,60
2	1,64	0	1,10	0,91	0	1,10	0	1,27	1,43	1,64
3	1,44	0	1,15	1,00	0	1,26	0	1,33	1,43	1,36
4	1,50	0	1,25	1,15	0	0,96	0	1,42	1,40	1,54
5	1,31	0	1,09	0,93	0	1,05	0	1,55	1,48	1,70
PROMEDIO	1,43	0	1,17	1,03	0	1,10	0	1,38	1,46	1,62

0: Contaminado

Tabla 1.11 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 3 mes de Mayo

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,47	0,50	0,37	0,38	0,36	0,30	0,79	0,54	0,44	0,30
2	0,45	0,49	0,35	0,50	0,45	0,47	0,60	0,34	0,43	0,30
3	0,42	0,30	0,25	0,27	0,36	0,30	0,36	0,22	0,50	0,25
4	0,34	0,20	0,32	0,34	0,30	0,65	0,50	0,30	0,40	0,43
5	0,38	0,26	0,27	0,30	0,26	0,50	0,30	0,24	0,50	0,25
PROMEDIO	0,41	0,35	0,31	0,36	0,35	0,44	0,51	0,33	0,45	0,31

Tabla1.12 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 3 mes de Junio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,77	0,55	0,40	0,44	0,60	0,50	0	0,46	0	0
2	0,68	0,82	0,74	0,62	0,53	0,47	0	0,43	0	0
3	0,60	0,61	0,65	0,57	0,37	0,50	0	0,30	0	0
4	0,55	0,60	0,46	0,50	0,40	0,46	0	0,41	0	0
5	0,65	0,43	0,42	0,44	0,36	0,48	0	0,39	0	0
PROMEDIO	0,65	0,60	0,53	0,51	0,45	0,48	0	0,40	0	0

0: Contaminado

Tabla 1.13 Crecimiento de las plántulas en cm Tratamiento 3 mes de Julio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,80	0,80	0,72	0,70	0,61	0,70	0	0,85	0	0
2	0,97	0,86	0,91	0,83	0,54	0,91	0	0,80	0	0
3	0,64	0,92	0,70	0,84	0,38	0,73	0	0,65	0	0
4	0,77	0,87	0,70	0,90	0,41	0,84	0	0,70	0	0
5	1,00	0,86	0,75	0,76	0,36	0,86	0	0,85	0	0
PROMEDIO	0,84	0,86	0,76	0,81	0,46	0,81	0	0,77	0	0

Tabla 1.14 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 3 mes de Agosto

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,92	1,05	0,95	0,89	1,00	1,12	0	1,21	0	0
2	1,27	1,62	1,11	1,00	0,88	1,14	0	1,10	0	0
3	1,07	1,50	0,92	0,98	0,70	0,91	0	1,04	0	0
4	0,90	1,47	0,96	1,10	0,61	0,94	0	0,81	0	0
5	0,77	1,30	1,07	0,95	0,95	1,04	0	1,15	0	0
PROMEDIO	0,99	1,39	1,00	0,98	0,83	1,03	0	1,06	0	0

0: Contaminado

Tabla 1.15 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 3 mes de Septiembre

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,14	1,24	1,20	1,25	1,00	1,30	0	1,40	0	0
2	1,58	1,94	1,12	1,10	0,88	1,50	0	1,36	0	0
3	1,36	2,00	0,93	1,15	0,70	1,11	0	1,40	0	0
4	1,16	1,56	0,97	1,25	0,61	1,30	0	1,16	0	0
5	0,92	1,55	1,36	1,09	0,95	1,50	0	1,45	0	0
PROMEDIO	1,23	1,66	1,12	1,17	0,83	1,34	0	1,35	0	0

0: Contaminado

Tabla 1.16 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 4 mes de Mayo

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,20	0,40	0,53	0,37	0,41	0,50	0,57	0,30	0,32	0,35
2	0,22	0,46	0,50	0,50	0,37	0,40	0,28	0,33	0,49	0,52
3	0,32	0,32	0,56	0,20	0,38	0,33	0,42	0,32	0,53	0,27
4	0,33	0,30	0,30	0,21	0,36	0,57	0,46	0,40	0,26	0,40
5	0,45	0,44	0,33	0,20	0,30	0,58	0,49	0,35	0,37	0,35
PROMEDIO	0,30	0,38	0,44	0,30	0,36	0,48	0,44	0,34	0,39	0,38

Tabla 1.17 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 4 mes de Junio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,45	0,53	0,82	0,73	0,60	0,49	0,66	0,33	0,46	0,43
2	0,40	0,65	0,60	0,67	0,44	0,40	0,40	0,40	0,60	0,60
3	0,67	0,62	0,70	0,33	0,52	0,35	0,49	0,30	0,52	0,36
4	0,52	0,70	0,39	0,44	0,48	0,48	0,57	0,45	0,36	0,46
5	0,62	0,68	0,60	0,37	0,54	0,50	0,46	0,35	0,46	0,42
PROMEDIO	0,53	0,64	0,62	0,51	0,52	0,44	0,52	0,37	0,48	0,45

Tabla 1.18 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 4 mes de Julio

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,85	0,60	1,26	1,10	0,72	0,67	0,95	0,66	0,80	0,65
2	0,65	0,82	1,38	1,14	0,63	0,63	0,70	0,69	0,70	0,84
3	0,82	0,86	0,96	0,52	0,72	0,55	0,64	0,60	0,86	0,45
4	0,90	0,90	0,74	0,56	0,60	0,82	0,85	0,76	0,60	0,69
5	0,80	0,83	0,86	0,50	0,60	0,68	0,70	0,93	0,91	0,70
PROMEDIO	0,80	0,80	1,04	0,76	0,65	0,67	0,77	0,73	0,77	0,67

Tabla 1.19 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 4 mes de Agosto

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,00	0,60	1,26	1,10	0,72	1,00	0,95	0,66	0,74	0,65
2	0,71	0,82	1,83	1,14	0,63	0,63	0,70	0,85	0,70	0,84
3	0,80	0,86	1,14	0,52	0,72	0,55	0,64	0,60	0,86	0,45
4	0,96	1,05	0,85	0,56	0,60	0,82	0,85	0,76	0,60	0,69
5	1,06	1,04	1,04	0,50	0,60	0,68	0,85	0,93	1,10	0,70
PROMEDIO	0,91	0,87	1,22	0,76	0,65	0,74	0,80	0,76	0,80	0,67

Tabla 1.20 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 4 mes de Septiembre

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,40	0,60	1,63	1,50	0,99	1,00	0,95	0,67	0,90	0,65
2	1,14	1,10	1,30	1,44	1,00	0,63	0,70	0,86	1,16	0,84
3	1,13	1,11	2,14	0,94	1,07	0,55	0,64	0,61	1,20	0,45
4	1,20	1,17	1,49	1,00	0,96	0,82	0,85	0,77	0,84	0,69
5	1,30	1,10	1,18	1,04	0,98	0,68	1,17	0,94	1,40	0,70
PROMEDIO	1,23	1,02	1,55	1,18	1,00	0,74	0,86	0,77	1,10	0,67

Tabla 1.21 Crecimiento de las Plántulas en cm Tratamiento 5 mes de Mayo

PLANTULAS	FRASCOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,20	0,40	0,53	0,37	0,41	0,41	0,43	0,37	0,35	0,59
2	0,22	0,46	0,50	0,50	0,37	0,36	0,50	0,36	0,43	0,44
3	0,32	0,32	0,56	0,20	0,38	0,44	0,40	0,32	0,31	0,43
4	0,33	0,30	0,30	0,21	0,36	0,57	0,57	0,40	0,44	0,36
5	0,45	0,44	0,33	0,20	0,30	0,48	0,49	0,64	0,39	0,56
PROMEDIO	0,30	0,38	0,44	0,30	0,36	0,45	0,48	0,42	0,38	0,48

ANEXO 2:

2.1 Cuadro de resultados del Análisis Estadístico “a posteriori” de Sheffe con los promedios Finales de los Tratamientos.

Promedios Finales:

Summary of all Effects; design: (area basal.sta)						
Effect	Df	ms	Of	ms	F	p-level
	Effect	effect	Error	Error		
1	3	,174038	36	,051837	3,35738	0,29288

Promedios Iniciales:

Summary of all Effects; design: (area basal.sta)						
Effect	df	ms	Of	ms	F	p-level
	effect	effect	Error	Error		
1	3	0,11082	36	,005007	2,213155	,103360

ANEXO 3

3.1 Resultados del crecimiento promedio (base – ápice) en cm. de cada Tratamiento mes de Mayo.



3.2 Resultados del crecimiento promedio (base – ápice) en cm. de cada Tratamiento mes de Junio



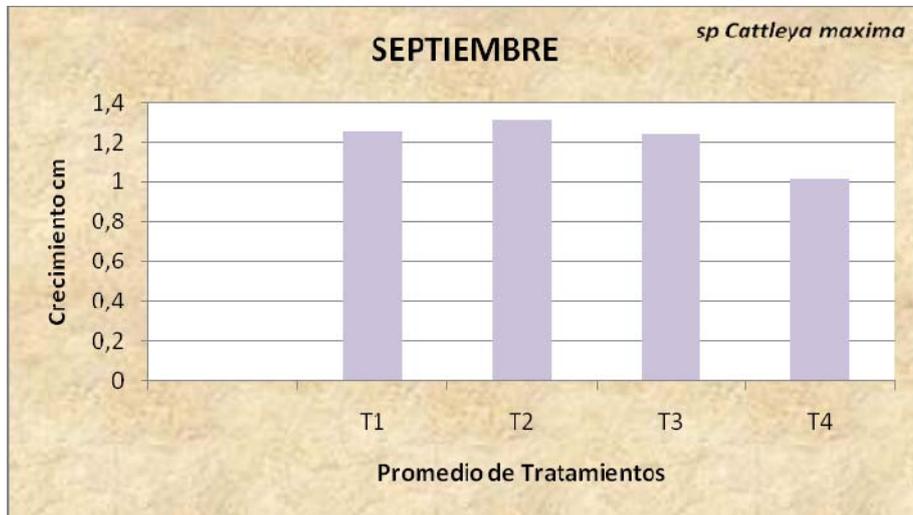
3.3 Resultados del crecimiento promedio (base – ápice) en cm. de cada Tratamiento mes de Julio



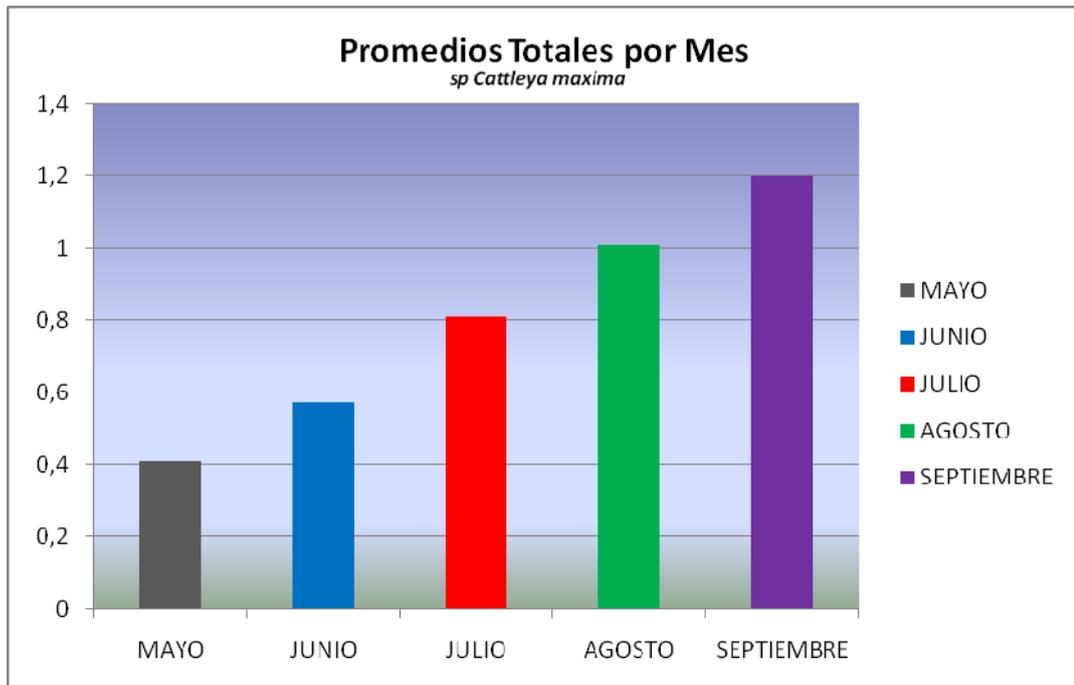
3.4 Resultados del crecimiento promedio (base – ápice) en cm. de cada Tratamiento mes de Agosto



3.5 Resultados del crecimiento promedio (base – ápice) en cm. de cada Tratamiento mes de Septiembre



3.6 Tabla del Crecimiento General de la *sp Cattleya maxima* durante los 5 meses. por mes

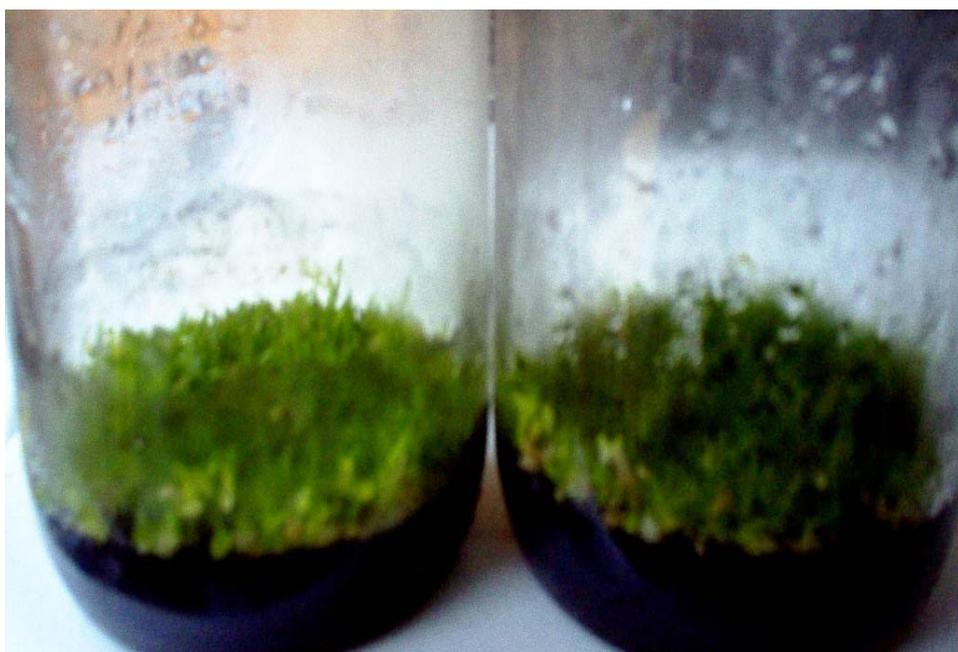


ANEXO 4:

Fotografía 4.1 Plántulas de *Cattleya maxima* para la siembra



Frascos utilizados, *Cattleya maxima* sembrada en phytamax 6793



Fotografía 4.2 Cámara de Flujo Laminar



Fotografía 4.3 Generador de Ozono



Fotografía 4.4 Instrumentos modificados para la siembra, (en remplazo de pinzas)



Fotografía 4.5 Calibrador



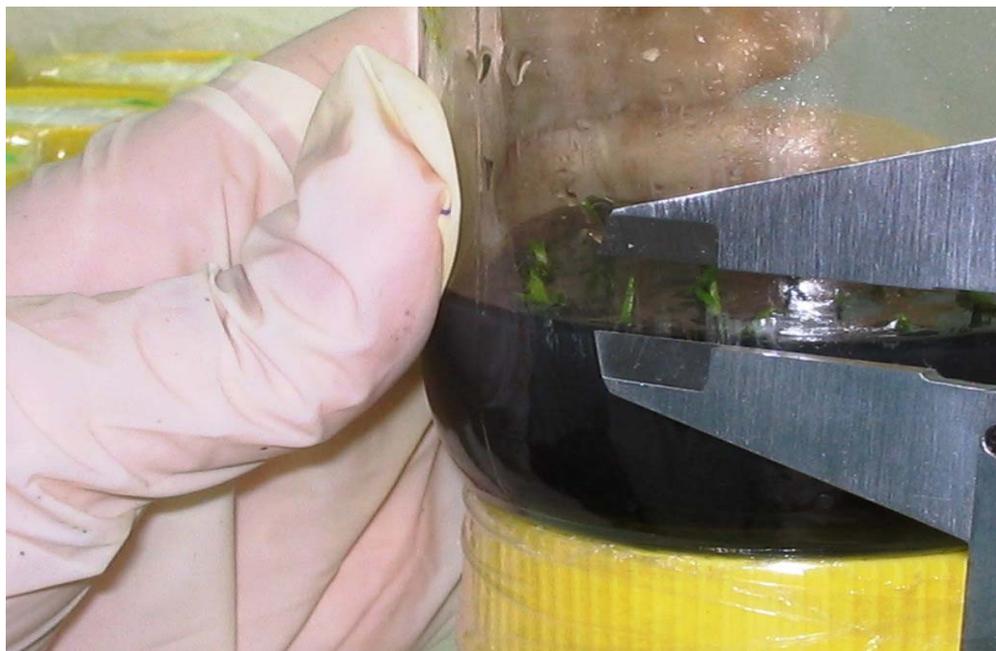
Fotografía 4.6 La Siembra



Fotografía 4.7 Ubicación de Frascos en el Cuarto de Crecimiento



Fotografía 4.8 Toma de medidas de las Plántulas con el Calibrador



Fotografía 4.9 Marcado de Frascos con un marcador permanente para Registro del Crecimiento por mes (cada mes con un color diferente)



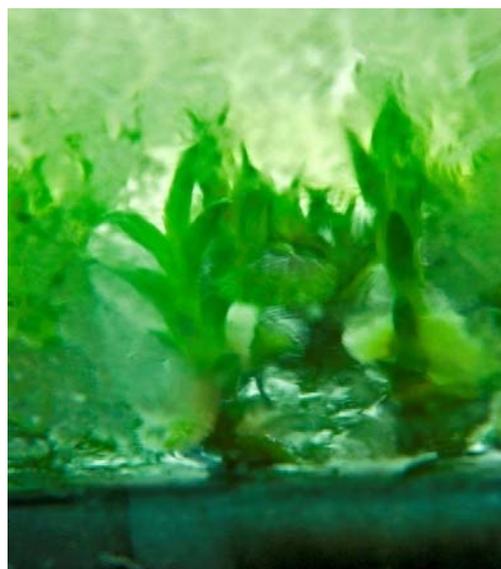
Fotografía 4.10 Registro de Crecimiento por Mes



Fotografía 4.11 Tratamiento 1 (Phytamax 6793)



Fotografía 4.12 Tratamiento 2 (Phytamax 6793 + 30g Harina de Plátano)



Fotografía 4.13 Tratamiento 3. (Phytamax 6793 + 40g de Harina de Plátano)



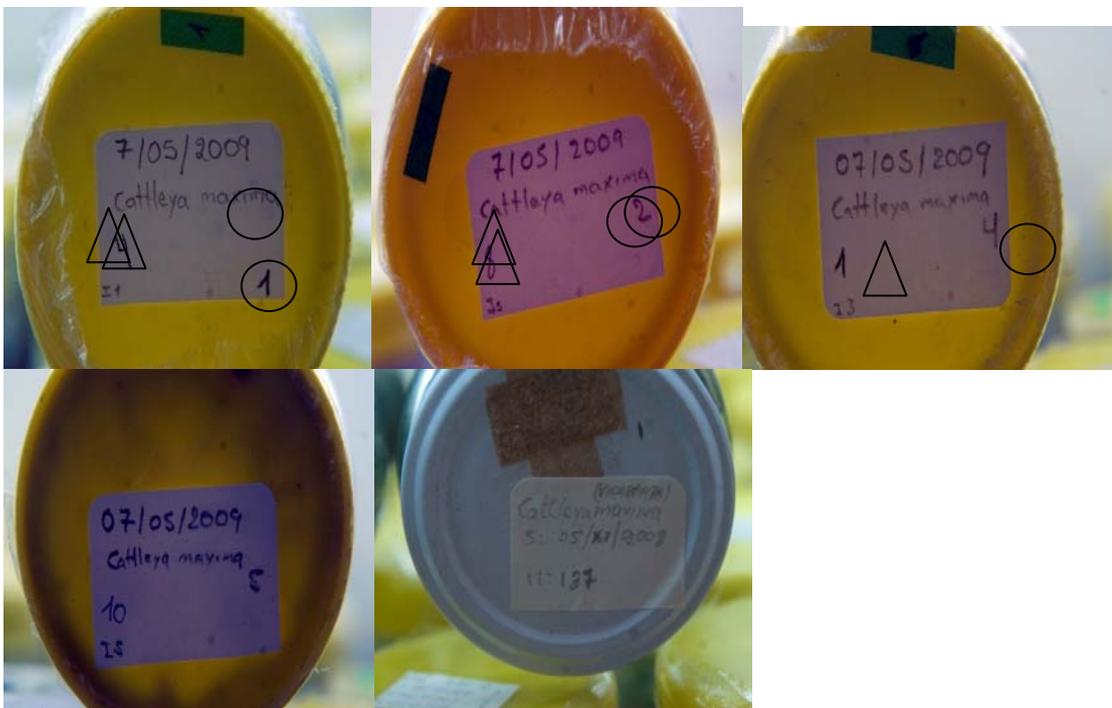
Fotografía 4.14 Tratamiento 4.(Phytamax 6793 + 50g de Harina de Plátano)



Fotografía 4.15 Tratamiento 5 (Phytamax 6793 + 60g de Harina de Platano)
Muerte de las Plántulas.



Fotografía 4.16 Identificación de Tratamientos (tapas) Fecha, ○ # de Tratamiento, △ Repetición.



Tapa Frasco Planta Madre

