



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA DEL MEDIO
AMBIENTE

**ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LA TASA DE
GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS ORQUÍDEAS
Epidendrum secundum Y *Oncidium excavatum* A TRAVÉS DE
MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES COMBINADOS
CON NATURALES**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**AUTORAS:
LUCÍA CRISTINA SARDI BARZALLO
SANDRA VIRGINIA GUZMÁN CÁRDENAS**

**DIRECTORA:
DRA. RAFFAELLA ANSALONI**

**CUENCA, ECUADOR
2007**

DEDICATORIA:

A mi amado esposo Javier y a mis
padres José y Lucía por su incondicional
apoyo durante la realización del trabajo.

A mí querida hija Paula y mi esposo Álvaro,
y a mis padres Jaime y Jeaneth, por su
paciencia que ha sabido guiarme en cada
momento trascendental de mi vida.

AGRADECIMIENTOS:

Queremos agradecer en primer lugar a Dios, por la oportunidad que nos dio de graduarnos. A la Dra. Rafaella Ansaloni que nos ha brindado la guía y orientación para realizar nuestro trabajo de grado. Al Señor Juan Pablo Jara y a la señorita Eliana Pachar, que cordialmente nos dieron una mano en la obtención de la semilla, al igual que a la señora Isabel Hidalgo y al Sr. Sergio Puma. Además agradecemos al personal del Laboratorio de Química de la Universidad del Azuay, Ing. Jimena Orellana, Ing. Mónica Tinoco y Tec. Diego Vidal por su asesoría en los análisis. Al Dr. Miguel Carrión y a nuestro amigo Javier Carrión por su apoyo en la edición de nuestra tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi

Introducción.....	1
Objetivos.....	4

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Subcapítulo 1. Las orquídeas

1.1 Generalidades de las orquídeas.....	6
1.2 Primeras fases de crecimiento de las orquídeas desde semilla.....	7
1.2.1 Crecimiento en la naturaleza.....	9
1.2.2 Crecimiento en cultivo in Vitro.....	10
1.3 Características Botánicas del Género <i>Epidendrum</i>	11
1.3.1 Clasificación botánica según el sistema de A. Cronquist.....	11
1.3.2 Etimología e historia.....	11
1.3.3 Características.....	11
1.3.4 Ecología.....	12
1.3.5 Distribución.....	12
1.4 Características Botánicas del Género <i>Oncidium</i>	13
1.4.1 Clasificación botánica según el sistema de A. Cronquist.....	13
1.4.2 Etimología e historia.....	13
1.4.3 Características.....	13
1.4.4 Ecología.....	14
1.4.5 Distribución.....	14

Subcapítulo 2. Cultivo in Vitro.....

1.5 Generalidades del Cultivo in Vitro.....	15
1.6 Fundamentos del Cultivo in Vitro	17
1.7 Medio de Cultivo para orquídeas.....	17
1.7.1 Ingredientes.....	19
1.7.2 Sales orgánicas.....	19

1.7.3	Compuestos orgánicos.....	19
1.7.3.1	Auxinas.....	19
1.7.3.2	Citoquininas.....	20
1.7.3.3	Giberelinas.....	20
1.7.4	Productos naturales.....	21
1.7.4.1	Nutrientes del plátano verde.....	21
1.7.4.2	Nutrientes del agua de coco.....	22
1.7.5	Materiales inertes de soporte.....	22
1.8	Problemas de la micropropagación	23
1.8.1	Contaminación microbiana en cultivos in Vitro.....	23
1.8.2	Plántulas amarillentas.....	24

Subcapítulo 3. Bromatología del plátano verde

1.9	Plátano verde.....	25
-----	--------------------	----

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Área de estudio.....	26
2.2	Materiales.....	26
2.3	Diseño Experimental.....	27
2.3.1	Descripción del diseño experimental.....	28
2.4	Trabajo de campo	28
2.5	Trabajo de laboratorio.....	29
2.5.1	Preparación del medio de cultivo.....	29
2.5.1.1	Preparación de soluciones madre.....	29
2.5.1.2	Procedimiento.....	30
2.5.2	Preparación de medios de cultivo con combinación de productos naturales.....	30
2.5.3	Desinfección de las cápsulas cerradas.....	31
2.5.4	Desinfección de las semillas.....	31
2.5.4.1	Siembra de semilla.....	32
2.5.4.2	Replante.....	32
2.5.5	Cuidados de las semillas sembradas.....	32
2.6	Análisis bromatológico del agua de coco.....	34
2.6.1	Métodos de análisis.....	34
2.6.1.1	Proteínas.....	34
2.6.1.2	Lípidos.....	37
2.6.1.3	Hidratos de carbono totales.....	38
2.6.1.4	Humedad.....	40
2.7	Toma de datos.....	41

2.8 Análisis de datos.....	41
----------------------------	----

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Análisis de porcentajes de germinación registradas en el transcurso del proyecto.....	43
3.2 Análisis del crecimiento registrado en el transcurso del proyecto.....	46
3.3 Análisis de promedios del número de hojas registradas en el transcurso del proyecto.....	49
3.4 Análisis de promedios de enraizamiento registrados en el proyecto.....	51
3.5 Análisis de promedios de contaminación registrados en el proyecto.....	53
3.6 Análisis estadístico de las medidas de crecimiento registradas al cabo de la observación en el laboratorio.....	56
3.7 Análisis Bromatológico.....	59
3.7.1 Agua de coco.....	59

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	61
------------------------------------	-----------

CONCLUSIÓN.....	68
------------------------	-----------

RECOMENDACIONES.....	70
-----------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA.....	71
--------------------------	-----------

ANEXOS.....	74
--------------------	-----------

INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

Figura 3.2.1 Comparación del crecimiento promedio en cm de <i>E. secundum</i> siembra vs. replante.....	46
Figura 3.3.1 Promedio del número de hojas en las observaciones de <i>E. secundum</i> ..	49
Figura. 3.4.1 Comparación del promedio del número de raíces en siembra y replante.....	51
Figura. 3.4.2 Promedio del número de raíces en la medida 1 de <i>O. excavatum</i>	52
Figura 3.6.1 Test estadístico Anova a un criterio en la primera medida.....	56
Figura 3.6.2 Test estadístico Anova a un criterio en la medida dos.....	57
Figura 3.6.3 Test estadístico Anova a un criterio en <i>O. excavatum</i>	58
Tabla 1.9.1 Nutrientes del plátano verde.....	25
Tabla 2.3.1 Diseño.....	27
Tabla 3.1.1 Porcentaje de germinación en distintas siembras de <i>E. secundum</i>	43
Tabla 3.1.2 Porcentaje de germinación en las siembras de <i>O. excavatum</i>	44
Tabla 3.2.1 Comparación del promedio de crecimiento en cm en la siembra (medida 1) y en el replante (medida 2) de <i>E. secundum</i>	46
Tabla 3.2.2 Promedio de crecimiento en cm. de <i>O. excavatum</i>	48
Tabla 3.3.1 Promedio de número de hojas de <i>E. secundum</i> en la observación 1 y 2.....	49
Tabla 3.3.2 Promedio de número de hojas en los siete tratamientos de <i>O. excavatum</i>	50
Tabla 3.4.1 Presencia de raíces y brotes de raíz, en la medida 1 y 2.....	51
Tabla 3.4.2 Presencia de raíces y brotes de raíz, en la medida uno de <i>O. excavatum</i>	52
Tabla 3.5.1 Porcentaje de frascos contaminados en las pruebas de <i>E. secundum</i>	53
Tabla 3.5.2 Porcentaje de frascos contaminados en la prueba dos de <i>O.</i>	

<i>excavatum</i>	55
Tabla 3.7.1 Nutrientes del agua de coco.....	59
Foto 1. Vista al microscopio de semilla viable de <i>Epidendrum secundum</i>	8
Foto 2. Vista al microscopio de semilla viable de <i>Oncidium excavatum</i>	8
Foto 3. <i>Epidendrum secundum</i>	11
Foto 4. <i>Oncidium excavatum</i>	13
Foto 5. Ubicación de <i>Epidendrum secundum</i>	29
Foto 6. Invernadero del Sr. Sergio Puma.....	29
Foto 7. Ubicación de <i>Oncidium excavatum</i>	29
Foto 8. Invernadero del Sr. Juan Pablo Jara.....	29
Foto 9. Recipientes en el cuarto de cultivo.....	33
Foto 10. Siembra de <i>Epidendrum</i> en chonta.....	34
Foto 11. Toma de medidas de plántulas.....	41
Foto 12. Formación de protocormos de <i>E. secundum</i>	44
Foto 13. Inhibición de crecimiento en el medio de coco de <i>E. secundum</i>	44
Foto 14. Formación de protocormos de <i>O. excavatum</i>	45
Foto 15. Crecimiento en replante de <i>Epidendrum</i>	47
Foto 16. Plántulas amarillentas de <i>E. secundum</i> en medios formulados con productos naturales.....	47
Foto 17. Comparación de crecimiento entre medios de <i>O. excavatum</i>	48
Foto 18. Pelos absorbentes en raíces de <i>Oncidium</i>	53
Foto 19. Contaminación por hongos.....	54
Foto 20. Contaminación por algas.....	54
Foto 21. Contaminación por levaduras.....	54
Foto 22. Muestra de agua de coco secada.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CITES: Convención Internacional de Comercio de Especies en Peligro de Fauna Salvaje y Flora.

C.P.: Comunicación personal.

et al : bibliografía de varios autores.

g l^{-1} : gramos por litro.

g (100 ml)^{-1} : gramos por cien mililitros de solución.

$\text{g (cm}^3\text{)}^{-1}$: gramos por centímetro cúbico.

m c g: microgramos.

mg l^{-1} : miligramo por litro.

ml l^{-1} : mililitro por litro.

MS: Medio Murashige y Skoog.

m s.n.m: metros sobre el nivel del mar.

nm: nanometros.

ppm: partes por millón.

p/p: porcentaje peso peso.

s.a: bibliografía sin año.

s.e.: bibliografía sin edición.

s.p.: bibliografía sin páginas.

RESUMEN

Nuestra investigación determinó cual es el medio de cultivo convencional (MS) con mezcla de productos naturales (agua de coco y plátano verde) que produce mayor germinación y crecimiento en *Epidendrum secundum* y *Oncidium excavatum* a partir de semilla de invernadero. Los factores en estudio fueron las dos especies en siete medios de cultivo. Como conclusiones tuvimos que en *Epidendrum* los productos naturales son beneficiosos en la germinación pero no en el crecimiento. En el número de hojas también influyeron positivamente los aditivos orgánicos así como en el enraizamiento. *Oncidium* en la germinación y el crecimiento, no requiere de productos naturales pues el mejor medio fue el testigo (MS). El medio natural junto al medio mineral es positivo en el número de hojas y enraizamiento.

ABSTRACT

The present work determined the best mixture of culture media (MS) with natural products (coconut water and green banana) that increase the germination and growth in *Epidendrum secundum* and *Oncidium excavatum* starting from green house seed. The factors studied were the two species in seven culture media. Our results showed that the natural products enhances the germination but not the growth of *Epidendrum*. Other characters such as: number of leaves and root growth were influenced by organic preservations. The germination and growth of *Oncidium* does not require the natural products because the best culture media was MS. The natural and mineral culture media increase the number of leaves and root growth.

Sardi Barzallo Lucía Cristina

Guzmán Cárdenas Sandra Virginia

Trabajo de Graduación

Dra. Raffaella Ansaloni

Junio del 2007

**ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LA TASA DE GERMINACIÓN Y
CRECIMIENTO DE LAS ORQUÍDEAS *Epidendrum secundum* Y *Oncidium
excavatum* A TRAVÉS DE MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES
COMBINADOS CON NATURALES**

INTRODUCCIÓN

El filósofo griego Theophrastus (300 años a. C.) es conocido por muchos como el primer botánico por su manuscrito “Indagaciones sobre las Plantas”, en el que describe algunas orquídeas del Mediterráneo y les da el nombre genérico de *Orchis* (en griego) que significa testículo. En el siglo primero, el cirujano de Nerón, Dioscorides, en su libro *Materia médica* atribuye a las orquídeas propiedades que influyen en la sexualidad del hombre. Por dieciséis siglos se aceptaron estas teorías médicas y se creía que la orquídea era un afrodisíaco que incrementaba la sexualidad masculina e inclusive que podía influenciar para que un niño por nacer sea varón. La Iglesia Católica consideraba a las orquídeas como el alimento de Satanás y que las orquídeas impulsaban al hombre a los excesos. En 1737, las orquídeas son rescatadas de la superstición por Carolus Linnaeus en su obra *Genera Plantarum* (Hirtz 2004).

El interés por las orquídeas en Europa inició en 1733 cuando se empezaron a llevar del Pacífico a Inglaterra, especies espectaculares de orquídeas, lo que contribuyó con una especialidad para botánicos y se convirtió en la orquideomanía de los nobles. Todos los ricos tenían que construir un orquideario acorde con su estatus. A principios del siglo veinte, la era de la orquideomanía terminó, debido a que el costo de mantenimiento de los invernaderos era muy alto. Con la depresión de 1929, el cultivo de las orquídeas pasó a manos de empresarios comerciales (Hirtz 2004).

La primera referencia sobre orquídeas americanas se encuentra en “*El Badiano*”, un manuscrito azteca de plantas medicinales, escrito en 1551 (Bustos 2006). En este

libro se describe a la vainilla, originaria de nuestro país; con el fruto de esta orquídea se preparaba el *tilxochitl*, una poción usada como perfume, especería o medicina de remedio al cansancio y las preocupaciones. La primera recolección documentada de orquídeas ecuatorianas la hizo Thaddaus Haenke en 1790, y desde allí se recolectaron muchas más (Dodson *c* y Escobar, s.a.). Hasta el 2002, según Dodson *e* fueron catalogadas 3784 especies de orquídeas que ocurren naturalmente en el Ecuador, lo cual es insólito si se toma en cuenta la superficie del país, más del 20% de las plantas vasculares son orquídeas.

En la actualidad, la deforestación de nuestra selva y la extracción indiscriminada de estas plantas de tan majestuosas flores, debido al buen precio que se obtiene por su comercialización tanto en el mercado nacional como en el extranjero, viene ocasionando que una gran cantidad de orquídeas nativas se encuentren hoy en peligro de extinción (Quiñones y Manrique 2004). El mercado internacional de estas plantas que se hibridizan naturalmente, ha hecho que mucha gente se especialice en la obtención de especímenes en grandes cantidades (Bustos 2006).

Como las poblaciones naturales de muchas especies de orquídeas requieren, para su buena reproducción, unos trechos bastante grandes de bosque sin alterar, parece que a las orquídeas ecuatorianas les espera un mal porvenir. La protección forestal ha resultado poco eficaz aun en los bosques relativamente amplios declarados como reservas por el gobierno y administrados por el departamento forestal del ministerio de agricultura (Dodson *c* y Escobar, s.a.), pese a que las orquídeas nativas están protegidas por leyes forestales y de vida silvestre y el comercio y tráfico internacional de especies de orquídeas esta regulado por CITES (Hirtz 2004).

Únicamente en centros de investigación botánica, un número muy reducido de orquideólogos y colecciones personales se interesan todavía por el cultivo de especies silvestres. Esto es una pena, porque el cultivo es el único método que asegura la supervivencia de las especies en peligro de extinción, ya que su hábitat se encuentra seriamente amenazado por la agricultura extensiva (Hirtz 2004) y por la apertura de una extensa red vial que ha provocado destrucción forestal y acceso a todas las regiones de recolección y estudio de flora orquidácea (Dodson *c* y Escobar, s.a.). Las especies de orquídeas silvestres de los géneros *Oncidium* y *Epidendrum*

requieren ser colectadas en los bosques tropicales recién talados, pues con ello se asegura la total destrucción de los ecosistemas de las áreas no declaradas como naturales, y la extinción de las especies endémicas en los sectores bajo colonización.

La dificultad en la germinación de orquídeas según señala Arditti (1967), recién se dio a conocer por Reissek en 1847, quien descubrió la presencia de un hongo micorrízico basidiomicete (*sp.* de *Rhizoctonia*) en sus raíces; Bernard en 1899 estableció que las semillas de orquídeas sólo germinaban cuando se encontraba infectadas por un hongo (germinación simbiótica); pero Knudson, en 1921 descubre la germinación asimbiótica sobre un medio simple que tuvo en su contenido azúcar. Este medio simple es el agar – agar que es una alga marina usada en la composición de medios de cultivo asimbióticos y es lo que le da consistencia al medio (Da Silva Ramos, 1969). Esta técnica mejorada se sigue aplicando hasta la actualidad y permitió el inicio de la comercialización de flores cortadas de orquídeas. Morel (1960) indica que más tarde se logra propagar orquídeas por medio del método de cultivo de ápice de vástago *in Vitro*. Esta metodología fue aplicada por numerosos cultivadores con fines comerciales, pues con ella la propagación es rápida, masiva y mantiene las características de la planta madre.

La biotecnología por medio de las técnicas de micropropagación *in Vitro* provee por tanto, de una valiosa herramienta para la conservación de orquídeas, permitiendo de esta manera tener una producción planificada y hacer un uso sostenible del mismo para disminuir la probabilidad de extinción de estas plantas (Quiñones y Manrique 2004). Se ha comprobado que dentro de un género se tiene un similar patrón de comportamiento en el medio de cultivo, con algunas variaciones entre especies. Para el género *Oncidium*, Sánchez *et al* (1994) reporta un buen porcentaje de germinación en el medio con agua de coco, en dos de las tres especies estudiadas. Otros estudios realizados por Banderas y Rodas (2007) reportan que, al utilizar banano, se dio un mejor desarrollo en el tallo y las raíces en las últimas fases de crecimiento de plántulas de *Oncidium*. Para el género *Epidendrum* no se han registrado estudios de micropropagación.

Las semillas de orquídea pueden crecer sobre medios nutritivos diferentes, dependiendo de las especies. Sánchez *et al* (1994) recopila estudios de varios

investigadores que usan mezclas de compuestos inorgánicos con extractos vegetales de banana, piña, patata, agua de coco, etc. Esto coincide con las recomendaciones de Ansaloni (2006)(Comunicación personal) que sugiere que este tipo de extractos naturales aceleran la germinación y el crecimiento, con la combinación de Murashige y Skoog (MS) que es un medio de cultivo nutritivo utilizado para orquídeas. Además está el estudio de Banderas y Rodas (2007), que utiliza medios naturales con banano y leche de maíz. En cuanto a germinación y crecimiento, se han hecho estudios de este tipo, pero no han sido publicados.

Por ello, la presente tesis propone el uso de medios de cultivo con combinación de agua de coco y plátano verde para observar su efecto en la germinación y crecimiento hasta el primer replante de los géneros *Epidendrum* y *Oncidium*.

Objetivo general

Determinar cual es el medio de cultivo que produce una mayor germinación y crecimiento de *Epidendrum secundum* Jacq. y *Oncidium excavatum* Lind.

Objetivos específicos

- Probar medios de cultivo convencionales combinados con productos naturales.
- Definir cual es el medio de cultivo más eficiente en el crecimiento de las plántulas, el enraizamiento y el número de hojas.
- Determinar cual es la composición de nutrientes del plátano verde y el agua de coco, para poder definir su influencia en las variables en estudio.

Para lograr estos objetivos se aplicó un diseño experimental tipo completamente al azar, con dos factores en estudio, los géneros y los siete medios de cultivo. Tuvimos un total de seis tratamientos y el testigo (MS), cada tratamiento tubo 25 repeticiones es decir 175 unidades experimentales para cada especie. El replante solo se realizó en *Epidendrum* (cuatro y cinco meses).

Las variables que se evaluaron fueron: germinación, crecimiento, número de hojas y enraizamiento, para la toma de estos datos se extrajeron 10 plántulas al azar y se calculó un promedio de los resultados. Finalmente los datos de las variables fueron analizados con estadística descriptiva y se realizó la comparación de los medios a través de un Anova a un criterio con el test a posteriori de Scheffé, para determinar diferencias significativas entre las variables.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se analizan trabajos relacionados con el área de estudio del presente trabajo. Se abordan generalidades sobre las orquídeas y especificaciones dentro de las dos especies estudiadas. Posteriormente se desarrolla una revisión de los aspectos de la micropropagación in Vitro y por último los datos de interés para la tesis del análisis bromatológico del plátano verde.

SUBCAPÍTULO 1. Las orquídeas

1.1 Generalidades de las orquídeas

Las orquídeas han sido una de las plantas más admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones, debido a la gran belleza y vistosidad de sus flores (Quiñones y Manrique 2004). Para el ser humano a llegado a significar una flor de culto, mitológica, medicinal, hechicería y de colección. El uso de esta planta esta más cerca de la magia y brujería aunque en la medicina se le ha atribuido durante siglos la capacidad de tratamiento médico (junto con otros ingredientes como miel, jengibre y ginseng) y de panacea de epilepsia, disentería, cólicos, cólera, etc (Ochoa 2003).

Esta familia vegetal acoge a la séptima parte de todas las especies vegetales con flores que pueblan la tierra (Bustos 2006). Comprende más de 30.000 especies, 800 géneros terrestres o epifitas y miles de híbridos; existe una variedad casi infinita de colores, formas y tamaños y se encuentran en todos los rincones del planeta (Ochoa 2003). Es la familia más grande de las monocotiledóneas (Cronquist 1971). Un estudio actualizado sobre la flora ecuatoriana clasificada determina la existencia de 17000 especies. De estas, la familia de plantas con el mayor número de especies corresponde a las orquídeas, cantidad equivalente al 24% de la flora nativa descrita (Hirtz 2004).

Se estima que en el Ecuador existen 214 de los 377 géneros del territorio americano, es decir más de la mitad de lo existe en el continente; según los estudios realizados se tienen catalogadas 3035 especies (93%) de las 3259 citadas para el Ecuador (Dodson y Escobar, s.a.). La zona selvática del oriente guarda una de las variedades más ricas de orquídeas. La región interandina y sierra ecuatoriana, son regiones altamente erosionadas por el proceso de deforestación, que albergan en su región sur más del 60% de los géneros del país. La región costa también posee muchas especies pero también presenta mucha erosión por la agricultura. Las orquídeas están en todos los sitios donde la naturaleza no ha sido talada o quemada. Las encontramos desde el nivel del mar hasta los pajonales a 4000 m de altura. Su modo de vida es muy variado (Bustos 2006). Crecen sobre los árboles, en los flujos rocosos de lava volcánica, en los despeñaderos, quebradas, en los taludes de los carreteros y, más de 400 especies, en el piso de los bosques y pajonales nativos (Hirtz 2004).

Los dos géneros que se van a estudiar en su mayoría son plantas epífitas, las cuales se las puede encontrar en diversos ecosistemas y hábitats dándose una mayor concentración de especies en las zonas tropicales y dentro de estas en los bosques subtropicales, nublado y andino, con altas precipitaciones; siendo hospederos de muchos reptiles, anfibios, macroinvertebrados e invertebrados (insectos). Tienen mecanismos de atracción a polinizadores como la coloración y el desarrollo de nectarios (Tapia 2000). Para su germinación en la naturaleza, las semillas de orquídeas, requieren de una relación simbiótica con algunos hongos, debido a que dentro de su semilla tienen muy poca o ninguna reserva alimenticia (Cuya 1997). Esto implica que el índice de germinación y crecimiento sea bajo y muy largo, lo cual representa una dificultad para su proliferación y limita su comercialización

1.2 Primeras fases de crecimiento de las orquídeas desde semilla

La semilla de orquídea es de dimensiones microscópicas y cada cápsula puede tener hasta 3000000 de semillas (Bustos 2006). Está formada por dos segmentos claramente distinguibles, el primero una red fusiforme que es una membrana exterior sencilla y seca, a veces cerrada por sus extremos y en otras abierta en uno de ellos. El segundo está formado por una pequeña masa de células indiferenciadas que forman el "proembrión", cuerpo de mayor consistencia y fácil observación. (Villena y Lala

2002). Se caracterizan por no contener en su interior material de reserva y alimento para el embrión (carentes de endosperma), durante sus primeros estados de vida (Sánchez *et al* 1994).

El embrión es pequeño, esférico o globular diferenciado solo en una masa de células comprimidas que está contenido dentro de una cubierta frecuentemente transparente o a veces pigmentada (Villena y Lala 2002). Al observar en el microscopio con aumentos de 100 a 200 veces, se puede apreciar que la semilla fértil está formada por los dos segmentos claramente distinguibles. Las semillas infértiles se presentan como cuerpos constituidos únicamente por una membrana exterior (Sánchez *et al* 1994). Una semilla, cuando tiene una buena fertilidad, comienza a germinar después de 20 días de ser sembrado. A veces germinan antes o mucho después. Algunas germinan incluso 2 meses después de la siembra. Si no germinan en este periodo, no germinan más. Hay otras razones por las que no germinan: medio de cultivo inapropiado, lugar desfavorable de germinación, etc. (Da Silva Ramos 1969).

El reposo debido a los embriones inmaduros es frecuente en las Orquidáceas y solo se elimina permitiendo que el embrión llegue a su desarrollo completo dejando la semilla en un medio favorable para la germinación (Devlin 1976). En las fotografías tomadas a través del estereomicroscopio, se observan las semillas viables de *Epidendrum* y *Oncidium* utilizadas.



Foto 1. Vista al microscopio de semilla viable de *Epidendrum secundum*



Foto 2. Vista al microscopio de semilla viable de *Oncidium excavatum*

1.2.1 Crecimiento en la naturaleza

En la naturaleza la semilla (que no tiene endosperma), requiere de una asociación con un hongo para que pueda crecer. Estas asociaciones, conocidas como micorrizas se dan entre hongos y raíces implicando relaciones simbióticas entre ellos. El hongo beneficia a la planta al descomponer la materia orgánica presente en el suelo con lo que facilite la disponibilidad de ciertos minerales. Las raíces por su parte dan al hongo azúcares, aminoácidos y algunas otras sustancias útiles. Las orquídeas no pueden germinar y crecer si no están colonizadas por un hongo (Villem *et al* 1992). Se pueden diferenciar dos tipos de micorrizas: las ectotróficas y las endotróficas. Estas últimas se encuentran en las orquídeas y son una asociación en la que el hongo vive en el interior de las células de la raíz huésped y las hifas no tienen contacto directo con el suelo (Fahn 1978). En las raíces de muchas de estas plantas se observa que las hifas arrolladas en ovillo, se comportan como parásitos en las capas exteriores de la corteza, mientras en las internas el hospedante domina sobre el intruso y digiere las hifas o las destruye (Strausburger *et al* 1974).

En las orquídeas en estado adulto, que son autótrofas respecto al carbono, es probable que el hongo suministre a las plántulas jóvenes, además del alimento ordinario determinadas vitaminas, hasta que dichas plántulas se hayan desarrollado al grado de que pueden sintetizarlas por sí mismas. Al vivir como epífitas presentan adaptaciones diversas; a menudo por ejemplo, acumulan en gruesas hojas coriáceas o en tubérculos caulinares el agua de lluvia que reciben de manera muy irregular, muchas también forman raíces aéreas que a veces actúan incluso como órganos asimiladores (Strausburger *et al* 1974).

Con frecuencia los hongos más importantes que tienen relaciones simbióticas con las orquídeas, pertenecen al género *Rhizoctonia*. La micropropagación permite la propagación *in Vitro* de las orquídeas sin la simbiosis con hongos. Knudson demostró que las semillas eran capaces de germinar asimbióticamente *in Vitro*, en el medio de cultivo que reemplaza la micorrización con todos los elementos nutritivos y energizantes como el azúcar. Usando esta técnica hoy en día la colección de orquídeas va aumentando cada año (Cuya 1997).

Por lo general, las especies florecen una sola vez al año, siempre por la misma fecha, esto es determinado por factores ambientales tales como: disminución o elevación de la temperatura, aumento en las horas de luz, cambios estacionales, variaciones en la humedad ambiental, etc. Su 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 (Merchán, s.a.).

1.2.2 Crecimiento en cultivo in Vitro

La primera floración de las orquídeas depende de las especies y las condiciones de cultivo. En algunos casos, ocurre a los siete años de ser sembrada. Muchos aficionados prefieren hacerlas crecer desde semilla, pero otros lo hacen desde pequeñas plantas para poder tener más variedad (Obsarrac, 2002).

Dos orquídeas son cuidadosamente seleccionadas como padres, eligiendo las específicas cualidades de las flores. La polinización manual resulta ser mejor en flores recién abiertas y se comprueba si se forma la vaina de la semilla. Hay que polinizar varias flores de la misma planta y de diferentes edades, para asegurarse (Seaton y Ramsay 2005). Cuando la vaina esta madura o mientras aún esta verde, las pequeñas semillas son plantadas en soluciones de nutrientes dentro de frascos estériles bajo condiciones asépticas. Las semillas de orquídea no tienen su propio suministro de alimento; se nutren de los brotes de partes carnosas hasta que las raíces y hojas puedan funcionar. Las semillas de orquídeas son plantadas en mezclas especiales (las cuales pueden contener leche de coco, azúcar y otros ingredientes) y son selladas dentro de los frascos. Si todo va bien, luego pueden distinguirse plantas individuales en el agar (Noble 1971).

Cuando las pequeñas plantas son suficientemente grandes pueden sacarse de su incubación, ser plantadas en comunidad, colocando entre una docena o más en una maceta. El medio es de fina textura, la siembra se guarda de la humedad y oscuridad. Las pequeñas plantas crecen hasta alcanzar varios tamaños de madurez y las plantas muy pequeñas son desechadas. Creciendo las plantas bajo luz de días largos y con el cuidado de condiciones controladas se podrían obtener flores más rápidamente. Algunos géneros maduran más rápido que otros (Obsarrac, 2002).

1.3 Características Botánicas del Género *Epidendrum*

1.3.1 Clasificación botánica según el sistema de A. Cronquist

Reino: PLANTAE

División: MAGNOLIOPHYTA

Clase: LILIOPSIDA

Orden: ORCHIDALES

Familia: ORQUIDACEAS

Subfamilia: EPIDENDROIDEAE

Tribu: EPIDENDREAE

Género: *Epidendrum*

Especie: *secundum*

Nombre científico o latino: *Epidendrum secundum* (Jacquin, 1760)

Nombre común o vulgar: Flor de Cristo



Foto 3. *Epidendrum secundum*

1.3.2 Etimología e historia

Desde la Grecia *epi* (en) y *dendrom* (árbol), en referencia al hábito de epífita de la mayoría de las especies. El género fue propuesto por Linnaeus en 1763; incluía todas las orquídeas que se conocían de la región tropical y fueron reportadas como epífitas, hasta que fueron separadas por filogenia. El género es pobremente conocido en los países andinos como Colombia, Ecuador y Bolivia (Dodson d 2002).

1.3.3 Características

Caracterizadas por plantas con tallos tipo caña o pseudobulbos, no superiores, las hojas anchas, la inflorescencia terminal (raramente lateral), las flores sin articulación entre el ovario y el pedicelo (Dodson d 2002). Sus principales polinizadores son mariposas y polillas diurnas y nocturnas aunque hay especies que son polinizadas también por colibríes (Club Peruano de las Orquídeas, 2005). Tiene crecimiento monopodial o planta que tiene un solo tallo (Obsarrac, 2002). El *Epidendrum secundum* (flor de Cristo) posee un tallo en forma de caña que alcanza hasta 3m de altura (Bustos 2006). Inflorescencia apical, alargada con numerosas flores en el ápice en una bola capitada, color rojo, rosado, blanco o amarillo; labio erecto callo grande

a menudo de color diferente al de las otras partes florales; lóbulos de labio finbriados (Dodson _b y Mármol, s.a.) (ver Anexo I).

1.3.4 Ecología

Es pariente del género *Cattleya*, y los tipos con pseudo bulbos podrían crecer con *Cattleyas*. Este género requiere de sol para crecer en la altura pero también crecen en invernadero si la luz es brillante. Es muy variada en su apariencia y tiene varios híbridos (Noble 1971). Las especies son encontradas cercanas a todos los hábitats, pero en su mayoría son epífitas en bosques húmedos lluviosos en las pendientes de los Andes (Dodson _b 2002). Tienden a crecer en áreas abiertas, expuestas en vertientes rocosas y empinadas. En los taludes de la carreteras existen verdaderas poblaciones de *Epidendrum* que, muchísimas veces, producen híbridos naturales de variados colores y gran belleza (Bustos 2006). *Epidendrum secundum* puede ser epífita o terrestre y establecerse sobre cuevas empinadas de bosque húmedo tropical o bosque lluvioso montano (Dodson _b y Mármol, s.a.).

1.3.5 Distribución

Es un género amplio con más de 1000 especies, distribuidas alrededor de América tropical desde el nivel del mar hasta los 3700 m de altura. Algunos autores tienen estudiado material de 442 especies de Ecuador de las cuales 324 fueron identificadas mientras que 116 todavía no lo han sido. Algunas de estas especies no identificadas probablemente son representadas por una cantidad de 45 especies reportadas por otros autores, pero las cuales no fueron colectadas por sí mismos sino por sus colaboradores o podría ocurrir su rango de extensión sea en los países vecinos (Dodson _d 2002). En el Ecuador su distribución natural está en la región oriental, en la provincia de Napo y en el cantón Sucúa (Dodson _g, s.a.). *Epidendrum secundum* se encuentra en el cantón de Loja, Epíndola, Puyando, Chaguarpamba y Zapotillo. La altura a la que se ubican va desde 200 a 3500 m s.n.m. y el clima en el que se encuentran es de 8 a 26 °C (Bustos 2006). También se encuentra en Azuay: Cuenca (2400 m), Bolívar (1300 m), Cañar (1700 a 1900 m), Carchi (1200 m), Manabí (300 m), Pastaza: Puyo (1000 m), Pichincha: Quito – Santo Domingo (1600 m) y Tungurahua: Baños (2000 m) (Dodson _b y Mármol, s.a.) (ver Anexo I).

1.4 Características Botánicas del Género *Oncidium*

1.4.1 Clasificación Botánica según el sistema de A. Cronquist

Reino: PLANTAE

División: MAGNOLIOPHYTA

Clase: LILIOPSIDA

Orden: ORCHIDALES

Familia: ORQUIDACEAS

Subfamilia: EPIDENDROIDEAE

Tribu: EPIDENDREAE

Género: *Oncidium*

Especie: *excavatum*

Nombre científico o latino: *Oncidium excavatum* (Lindley ,1838)

Nombre común o vulgar: *Oncidium*, Dama danzante



Foto 4. *Oncidium excavatum*

Este es un género difícil y complejo en el que muchas especies están reclasificadas. Esto a la larga seguramente conducirá a dividir este género en otros (Dodson c y Escobar, s.a.). Son llamadas *dama danzante* por su labelo que se asemeja a una bailarina (Noble 1971).

1.4.2 Etimología e Historia

Desde la Grecia *onkos* (tumor), en referencia al callo verrugoso de el labio. El género fue propuesto por Olaf Swartz en 1800 y es muy amplio y polimórfico. Garay y Stacy (1974), realizaron una sinopsis del género en la cual dividieron el género en secciones y dieron claves para realizar secciones (Dodson f 2003).

1.4.3 Características

Se caracterizan por la presencia de pseudobulbos unifoliales o bifoliales de un solo internudo, la inflorescencia muy variable, solitaria o algunas veces paniculada. Las flores sin espuela, la parte de el labio extendido paralelo a la columna, algunas veces unido de una pequeña distancia a la base, el labio usualmente con callo en el disco, la columna sin un pie, usualmente con alas elaboradas en cada sitio del estigma

(Dodson *f* 2003). Las *Oncidium* se pueden hibridar con géneros cercanos dando lugar a especies ínter genéricas tales como *Miltonidium*, *Brassidium*, *Odontocidium* (Noble 1971). Tiene crecimiento simpodial, es decir tiene varios tallos (Obsarrac 2002).

Oncidium excavatum posee una inflorescencia erecta, el pedúnculo largo y el callo formando un oblongo (Königer 2004). Flores amarillas manchadas con café – rojo, con pétalos más anchos que los sépalos, labio trilobado; rizoma corto (Dodson *a et al* 1989) (ver Anexo II).

1.4.4 Ecología

El género *Oncidium* crece durante los meses templados y requiere buena parte de luz, agua y fertilizantes. Se puede dar menos luz a los tipos con hojas duras en el follaje. Durante el otoño y el invierno las *Oncidium* toman reposo y necesitan menor cantidad de agua. Cuando florecen en invierno y primavera, tienen flores en abundancia. Estas crecen mezcladas con otras plantas; algunas tienden a crecer bien en árboles de helecho. Algunas pocas especies de este género de grandes altitudes de clima frío crecen bien con *Cattleyas*. Existen híbridos del género. Hay pocas colecciones de estas orquídeas (Noble 1971).

Oncidium excavatum es común en sus hábitats conocidos, cuando el crecimiento es terrestre es menos efectivo por los cambios de periodo de sequía y humedad y no tiene floración constante. Las plantas en floración pueden encontrarse alrededor del año y observarse a grandes distancias por su color amarillo brillante (Königer 2004).

1.4.5 Distribución

Las *Oncidium* son un género de orquídeas originario de la América tropical (desde Argentina hasta la Florida) de dimensiones muy variables según la especie, con más de 435 especies, de las cuales 127 han sido reportadas en el Ecuador. (Dodson *f* 2003). Se desarrollan desde el nivel del mar hasta las zonas montañosas 4000 m y en todos los niveles intermedios. El género es uno de los más importantes entre las orquídeas. La temperatura en la que se encuentran varía entre 8 y 26 ° C (Bustos 2006). Se ha registrado distribuido en todos los Andes (en el norte). En el país en las

provincias de Cañar, Carchi, Chimborazo, Napo, Pichincha y el cantón Sucúa (Dodson g s.a.).

Oncidium excavatum en el Ecuador se encuentra distribuida en la provincia del Azuay: Cuenca - Loja a (2600 m); en la provincia del Oro: Loja – Zaruma (Chinches, 2600 m); en la provincia de Loja: Loja – La Toma (2800 m), Loja – San Lucas (2300 m); Loja – Cariamanga (2000 m), Catacocha – Macará (2250 m), Celica – Pindal (1900 m) (Königer 2004) (ver Anexo II).

SUBCAPÍTULO 2. Cultivo in Vitro

1.5 Generalidades del cultivo in Vitro

Desde hace más de 140 años (1860), en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica del cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros e inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, anteras y polen (Hurtado y Merino 1988).

En la actualidad, se siguen investigando nuevos recursos para mejorar la micropropagación in Vitro que constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico a brindado; sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma y el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección in Vitro (Moran s.a.).

A nivel mundial se ha desarrollado toda una industria de micropropagación que se inició en países desarrollados como Estados Unidos y Europa extendiéndose a países de América Latina, Asia y África. Hoy en día, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y en especies leñosas. Según Morán (s.a.) en algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación.

En el caso de las orquídeas, que poseen características especiales de semilla y de condiciones de crecimiento, hoy en día la práctica in Vitro es fundamental para poder conservarlas, tomando en cuenta que:

- Las semillas de orquídeas son muy pequeñas y contienen poca o nada de reserva alimenticia. Por lo tanto, la germinación tiene más probabilidades de éxito en condiciones in Vitro (Cuya 1997).
- En la Naturaleza la germinación depende de una relación simbiótica con un hongo. Sin embargo, in Vitro es posible sustituir la acción del hongo, por un medio de cultivo nutritivo (Cuya 1997).
- Al realizar un cruce se obtienen un número limitado de semillas. Eligiendo un medio nutritivo apropiado, se puede conseguir que la mayoría de semillas germinen in Vitro (Cuya 1997).
- La siembra in Vitro permite germinar embriones inmaduros de orquídeas, como consecuencia se acorta el ciclo de mejora (Cuya 1997).
- La germinación y el desarrollo tiene lugar mucho más rápidamente in Vitro, ya que se realiza en un ambiente acondicionado, y sin competencia con hongos y bacterias (Cuya 1997). Estas epífitas tienen un desarrollo que dura mínimo tres años hasta su floración.
- Existe una mayor posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existen pocos individuos (Moran, s.a.).
- A consecuencia de estas ventajas, es posible multiplicar grandes cantidades de plantas en una especie reducida a bajos costos (Moran, s.a.).

1.6 Fundamento del cultivo in Vitro

En un laboratorio de cultivo in Vitro deben tomarse en cuenta principalmente las condiciones de asepsia, que se requieren para el establecimiento de cultivos. Se entiende por asepsia al conjunto de métodos destinados a preservar de gérmenes infecciosos al organismo en nuestro caso el cultivo in Vitro. Se controlan los fotoperiodos, temperatura, intensidad lumínica, etc., de acuerdo a las diferentes fases de crecimiento de los inóculos (Hurtado y Merino 1988).

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, el cual puede interactuar con la temperatura óptima de crecimiento, la luz y la composición del medio (Merchán, s.a.). Un rango de temperatura entre 22 – 25°C es el adecuado para las orquídeas (Cuya 1997).

La luz tiene una parte de la energía radiante (algunas de las radiaciones infrarrojas y ultravioletas próximas) que tiene influencia conocida sobre el desarrollo de las plantas. Es un factor principal que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos (Merchán, s.a.).

Los aspectos relacionados con la luz que son importantes en los cultivos in Vitro son:

- La cantidad de luz: la irradiación
- La calidad de la luz: el espectro
- La alternancia de los ciclos de luz con los de oscuridad: el fotoperiodo

1.7 Medio de cultivo para orquídeas

Las semillas pueden crecer sobre medios diferentes, dependiendo de las especies (Cuya 1997). Es muy difícil conocer todos los requerimientos que las semillas de una especie de orquídea tienen con respecto a las sales minerales y nutrientes en general (Sánchez *et al* 1994). Arditti (1977) señala que existe gran heterogeneidad en cuanto

al medio de cultivo a usarse, algunos medios utilizados en el cultivo de tejido de orquídeas son productos que contienen gran cantidad de compuestos y sus concentraciones varían considerablemente entre los medios. Sin embargo el medio nutritivo utilizado en nuestro estudio para las orquídeas es el de Murashige y Skoog (MS) (1962), desarrollado para lograr un crecimiento rápido de los tejidos de tabaco (Hurtado y Merino 1988). Esta formula contiene grandes cantidades de macro nutrientes y una alta concentración de Nitrógeno (Pérez 1998). En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies (Hurtado y Merino 1988).

Existe una infinidad de medios específicos para especies de orquídeas, que varían su composición dependiendo de las necesidades y objetivos del estudio (Pérez 1998). En nuestro estudio se utilizó un MS (1962) con sus macroelementos diluidos a la mitad (ver Anexo III: Tabla 3.1). Hay otras propuestas de mezclar compuestos inorgánicos con extractos orgánicos del tipo vegetal como son la banana, piña, agua de coco, etc. (Sánchez *et al* 1994). Hurtado y Merino (1988), manifiestan que el éxito que se obtenga en cultivos vegetales depende del uso del medio nutritivo apropiado, así como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc.; usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes.

Se sabe que entre las sustancias nutricionales que son captadas por las semillas de orquídea tenemos:

- Elementos primarios: Carbono, Oxígeno, Hidrógeno
- Nutrientes primarios: Nitrógeno, Fósforo, Potasio
- Nutrientes secundarios: Calcio, Magnesio, Azufre)
- Nutrientes terciarios: Boro, Cloro, Cobre, Hierro, Manganeso, Molibdeno, Zinc (Sánchez *et al* 1994)

La tendencia actual en la propagación de plantas es el empleo de medios de cultivo cada vez mas 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).

1.7.1 Ingredientes

Los ingredientes de un medio de cultivo se pueden clasificar como:

- Sales inorgánicas
- Compuestos orgánicos
- Productos naturales
- Materiales inertes de soporte (Hurtado y Merino 1988).

1.7.2 Sales inorgánicas

Con el fin de optimizar las necesidades específicas de las plantas, se ha formulado varias mezclas salinas, que constituyen los medios nutritivos (Hurtado y Merino 1988). Los medios de cultivo para orquídeas están basados en las mezclas de elementos minerales, de sus fertilizantes (pueden ser usados como fertilizantes con éxito en las orquídeas crecidas desde semilla), es decir su adición mejora y acelera sus procesos de desarrollo (Seaton y Ramsay, 2005) (ver Anexo III: Tabla 3.1).

1.7.3 Compuestos orgánicos

Podemos clasificarlos en tres grupos: carbohidratos (azúcares), fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) y vitaminas (tiamina). Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean ciertos aminoácidos, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos (Hurtado y Merino 1988).

1.7.3.1 Auxinas

Es una sustancia reguladora de crecimiento, que está presente en las plantas superiores. De forma natural las concentraciones más altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento (ápice del coleóptilo, yemas, ápices de crecimiento de las hojas). El transporte de las auxinas en la planta puede ser metabolizado en la célula. Las auxinas estimulan la división y el alargamiento celular (Hurtado y Merino 1988). Según Sánchez (s.a.) en yemas existentes como en adventicias, promueven el

enraizamiento e influyen sobre la floración y fructificación, actúan en la elongación de los tallos por el alargamiento celular, promueven el alargamiento de las raíces, estimulan la formación de raíces en estacas, y el mantenimiento de la dormancia apical inhibiendo la formación de brotes laterales; también impiden la formación de la capa de células de abscisión.

1.7.3.2 Citoquininas

Actúan en la división celular. Generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo estimular en muy bajas concentraciones la iniciación del crecimiento de raíces laterales. Igualmente inhiben la elongación del tallo pero, estimulan el alargamiento de las hojas, promueven el retraso de la senescencia, intervienen en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in Vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo (Hurtado y Merino 1988). Se producen en las raíces y van a los brotes y hojas, tiene efecto en la división celular, interactúan con las auxinas para la floración, rompen la dormancia apical, estimulando el desarrollo de los tallos laterales. Cuando la proporción de citoquinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece el enraizamiento, un balance en la proporción auxina:citoquinina es necesario para la formación de la parte aérea y raíces en plantas de origen meristemal (Rojas y Ramírez 1993).

1.7.3.3 Giberelinas

Estas fitohormonas juegan un papel regulatorio principal de crecimiento. Pueden producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos, fenómeno que puede ser atribuible a la estimulación de la división y alargamiento celular. Además tiene muchos efectos regulatorios en el desarrollo vegetal, debido a que son responsables de la hidrólisis de las reservas de almidón en el endospermo durante la germinación de la semilla. Promueve la floración y actúan en la maduración de los frutos; la senescencia y la dominancia de las yemas pueden ser alteradas por la aplicación de giberelinas. La acción exacta de las giberelinas aún es desconocida pero, se ha sugerido que en algunos casos actúa promoviendo la síntesis de auxinas (Hurtado y Merino 1988). Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su

función principal es el alargamiento de las regiones subapicales. En la mayoría de especies en el estado de desarrollo, promueven el cambio de sexo dando flores masculinas (Rojas y Ramírez 1993).

1.7.4 Productos naturales

Muchas preparaciones de composición indefinida han sido empleadas para enriquecer los medios de cultivo; frecuentemente se han empleado como última alternativa, cuando han fallado los ingredientes químicos.

Ingredientes	Concentración
Pulpa de plátano	150 g l ⁻¹ (Hurtado y Merino 1988)
Endospermo de coco	10 a 20 % (Hurtado y Merino 1988)
Agua de coco	100 ml l ⁻¹ (Sánchez <i>et al</i> 1994)
	150 ml l ⁻¹ (Silva 1972)
	30 ml l ⁻¹ (Ansaloni 2006)(C. P.)

La pulpa de plátano se usa principalmente en medios de cultivo para orquídeas. El endospermo de coco tiene un uso más general, su efectividad o acción depende de la edad del fruto (Hurtado y Merino 1988).

1.7.4.1 Nutrientes del plátano verde

Una fuente utilizada como producto natural en los medios de cultivo es la pulpa de plátano verde. Su uso es preferido al del plátano maduro debido a que este genera en el medio, una fuente tóxica de etileno que mata a las plántulas. En su mayoría esta constituido por agua, vitaminas, carbohidratos, proteínas y componentes inorgánicos (Calcio, Hierro y Fósforo). Las vitaminas que lo constituyen son: Vitamina A (actividad: 380 m c g), Tiamina (0.07 mg), Riboflavina (0.04 mg), Niacina (0.5 mg), Ácido ascórbico (28 mg) (Montes 1969). Se puede asumir que la banana, que es también una Musaceae, tiene similares productos nutritivos que el plátano (Sánchez 2007)(C. P.), en el cual encontramos auxinas, citoquininas, etc.; estos cumplen la

función de acelerar el desarrollo y favorecer el crecimiento (Código Latinoamericano de Alimentos 1980 citado en Banderas y Rodas 2007). Los productos aditivos como plátano y jugo de piña son beneficiosos para el crecimiento. Las ventajas son probablemente confinadas a las plántulas antes que a las semillas germinantes, las cuales podrían ser inhibidas por estos aditivos. El principal problema de estos productos naturales es su falta de efecto reproductivo (Seaton y Ramsay 2005).

1.7.4.2 Nutrientes del agua de coco

En 1942, se inició el cultivo in Vitro utilizando endosperma líquido de coco (*Cocos nucifera*), como suplemento de un medio de cultivo estándar y de allí aparecieron otros usos. El agua de coco muy raras veces resulta tóxico o deficiente a causa de los microelementos; es un medio complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos (ver Anexo III: Tabla 3.2). Además tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales minerales en ella. El agua de coco es muy rica en Magnesio y Fosfato, y contiene alrededor de 2,5 % de azúcar. Las hormonas vegetales que posee el agua de coco son: auxinas, giberelinas, 1, 3 – Difenilurea, Zeatina, Glucósido de zeatina y Ribósido de zeatina. (Roca y Mroginski 1991).

1.7.5 Materiales inertes de soporte

El agar es un alga marina que tratada, es un vehículo para los constituyentes de cada fórmula en las orquídeas (Sánchez *et al* 1994). Las algas cafés, las algas rojas del género *Chondrus crispus* (musgo irlandés), *Rhodymenia* (alga marina comestible) y la *Gelidium* han sido fuente de agentes gelificantes, tales como el agar – agar que se usa para espesar o elaborar medios de cultivo. El agar tiene las mejores características que el bacteriólogo puede pedir, pues muchas de las bacterias no se mueven dentro de un gel de agar (Walter *et al* 1980).

Otros geles son la poliacrilamida y la silicagel. El carbón ayuda a absorber sustancias de desecho (Hurtado y Merino 1988).

1.8 Problemas en la micropropagación

1.8.1 Contaminación microbiana en cultivos in Vitro

La contaminación es uno de los principales y más severos problemas para quien trabaja en micropropagación y es un factor que debe tenerse en cuenta principalmente dentro de un laboratorio. Factores como el acondicionamiento físico del lugar de trabajo, la procedencia y la edad del explante inicial, la higiene ambiental o las técnicas de siembra de los operarios, entre otros, puede favorecer al control de la incidencia de contaminantes microbianos (Pérez 1998).

Como contaminantes frecuentes del cultivo in Vitro se puede mencionar a los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras (Pérez 1998). Se puede distinguir fácilmente a los hongos por su micelio algodonoso visible, en cambio las bacterias tienen aspecto gelatinoso y brillante. La apariencia de limo verde revela contaminación por algas y colonias rosadas indican la presencia de levaduras (Seaton y Ramsay 2005). Los microorganismos pueden provocar grandes pérdidas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación; son generalmente introducidos en el laboratorio, los habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente; saprofitos o patógenos de las plantas; así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano (Pérez 1998).

La contaminación puede ingresar también del explante inicial utilizado. Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos en su totalidad, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares, en donde quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos periodos de tiempo (Pérez 1998).

Los frascos que muestran signos de contaminación pocos días después de su siembra habitualmente fueron inoculados fuera y el proceso de esterilización no eliminó a los

contaminantes o la contaminación ocurrió durante el proceso de siembra de la semilla. Si las colonias están esparcidas al azar en la superficie del medio, es probable que fueran introducidos de la atmósfera durante el proceso de siembra. Si los frascos llegan a contaminarse luego de pocas semanas esto puede deberse a que las bacterias y esporas de hongos ingresan al medio a través de las tapas, por la condensación de humedad que ocurre alrededor, lo cual puede ser reducido con el uso de parafina (Seaton y Ramsay 2005).

1.8.2 Plántulas amarillentas

Después del crecimiento satisfactorio de algunos meses, algunos frascos con plántulas saludables de apariencia cambian a amarillas y mueren. Esto podría ser debido a la formación de gas etileno (una potente hormona vegetal), o a la formación de dióxido de carbono dentro de los frascos cuando la azúcar en el medio es metabolizada. Por ello es apropiado remover siempre el material muerto de los frascos tan pronto como aparezca e incorporar un tubo respirador en las tapas de los frascos que permita el intercambio de gas con la atmósfera (Seaton y Ramsay 2005).

Cuando hay exceso de luz (Sánchez 2007) (C. P.), acumulación de hormonas o exceso de sales (Ansaloni 2007) (C. P.) se observa también una coloración amarillenta sobre las hojas y no un verde intenso que es lo normal.

SUBCAPÍTULO 3. Bromatología del plátano verde

1.9 Plátano verde

Tabla 1.9.1 Nutrientes del plátano verde.

Nutrientes	Valores Teóricos *	Valores obtenidos en laboratorio **
Proteínas (g)	1,2	3,56
Lípidos (g)	0,1	0,28
Carbohidratos utilizables (g)	35,3	63,13
Ceniza (g)	0,8	0,83
Humedad (%)	62,6	58,05

Fuente: * Montes, 1969 (Banana var. Verde: *Musa acuminata*)

** Tinoco 2002

Los datos presentados, tienen similitudes en algunos nutrientes entre los valores teóricos y valores obtenidos en el laboratorio, como es el caso de los lípidos, cenizas y humedad. Por otro lado, los valores que se diferencian uno del otro son los de proteínas y carbohidratos utilizables (Tinoco 2002).

Las diferencias entre la cantidad de nutrientes de las muestras y los datos tomados del libro pueden deberse a diferentes factores como: la variedad de clases de plátano, el tipo de suelo en el que se cultivó que puede tener influencias en la cantidad de minerales, además del tipo de muestreo, lo cual no se tomó en cuenta en este trabajo (Tinoco 2002).

El capítulo nos permite conocer las características de las orquídeas y de forma particular las de nuestras especies estudiadas. Además nos presenta la forma de realizar los métodos de micropropagación junto con la realización de medios de cultivo y sus problemas. La presencia de hormonas vegetales en el agua de coco y el plátano verde con sus implicaciones dentro de las variables estudiadas. La revisión de los métodos bromatológicos de análisis de plátano verde, que fueron tomados de los datos realizados por la Ing. Mónica Tinoco (2002), se redactan en el Anexo V, debido a que ellos solo aportan respaldo a nuestra investigación.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describirán los métodos utilizados en el laboratorio para la realización del trabajo experimental de tesis, junto con nuestro diseño experimental utilizado. También se presenta el análisis bromatológico del agua de coco.

2.1 Área de estudio

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador. Durante el proyecto se mantuvieron las siguientes condiciones de laboratorio: temperatura de 18-20° C en el día, humedad relativa 80% propia, luz artificial proporcionada a través de lámparas de neón que remplazan la luz solar, durante 16 horas. El análisis bromatológico del agua de coco se realizó en el Laboratorio de Química de la Universidad de Azuay.

2.2 Materiales

Equipos:

- Cámara de Flujo Laminar.
- Balanza analítica: capacidad 100 g
sensibilidad 0.001 g
- Balanza técnica: capacidad 500 g
sensibilidad 0.1 g
- Autoclave.
- Potenciómetro.
- Refrigerador.
- Licuadora.

Materiales de vidrio:

- Cajas petri.
- Erlenmeyers (500 ml, 1000 ml).
- Pipetas graduadas (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)
- Probetas (100ml).
- Varillas.
- Frascos de vidrio.

Otros:

- Mecheros de alcohol.
- Pinzas.
- Bisturí.
- Ollas metálicas.
- Cucharas.
- Aspersores.
- Algodón.
- Mascarillas.
- Cinta masquin.
- Etiquetas.
- Lápices.
- Marcadores permanentes.
- Calibrador.
- Parafina.

Reactivos:

- Medio de cultivo (MS).
- Agua estéril.
- Reactivos Químicos:
 - Alcohol (75% y 80%).
 - Reactivo comercial: Ajax R. (NaO Cl: 5%).
 - Formol (0,5%).
 - Jabón líquido.
 - Detergente.

Productos Naturales:

- Agua de coco (30 ml l⁻¹)
- Pulpa de plátano (150 g l⁻¹)

2. 3 Diseño Experimental

Tabla 2.3.1 Diseño

Tipo de diseño	Factores en estudio	Variables	Tratamientos
Completamente al azar	Dos spp: <i>Epidendrum secundum</i> , <i>Oncidium excavatum</i>	Germinación	Murashige (MS) + agua de coco (30 ml)
	Siete medios de cultivo	Crecimiento en altura	MS + plátano verde (150 g)
		Número de hojas	MS + coco (30 ml) + plátano verde (150 g)
		Enraizamiento	Plátano verde (150 g)
			Coco (30 ml)
			Plátano verde (150 g) + coco (30 ml)
			MS (testigo)

2.3.1 Descripción del diseño experimental

Las semillas del género *Epidendrum* y *Oncidium* fueron sembradas en medio de cultivo MS el mismo que fue enriquecido con pulpa de plátano (150 g l^{-1}) y agua de coco (30 ml l^{-1}). Para cada tratamiento se sembraron 25 frascos, incluyendo el testigo (MS), para poder comparar los resultados con el resto de tratamientos. Se tuvieron un total de siete tratamientos, cada uno con 25 repeticiones. En total, se realizaron 175 unidades experimentales para cada especie. En el replante de *Epidendrum* también se realizó, un número igual de unidades. En las dos especies para cada tratamiento después de su siembra, se observaron en los primeros 60 días los indicios de germinación (protocormos) y se esperaron entre cuatro y cinco meses para su revisión y evaluación de las medidas crecimiento, número de hojas y enraizamiento.

Para la toma de datos, fueron elegidas al azar 10 plántulas por cada uno de los tratamientos en los cuales se midió: crecimiento en altura (desde la base de la raíz hasta el ápice de las hojas) con la ayuda de un calibrador, enraizamiento y número de hojas; a partir de estos datos se calculó un valor promedio para cada una de las variables. Las unidades experimentales fueron controladas al menos dos veces por mes, para prevenir cualquier tipo de contratiempo como contaminación, muerte, daño del medio, etc.

En *Epidendrum* se realizó el primer replante y se efectuaron las mismas mediciones. Las medidas del primer replante fueron tomadas a los siete y ocho meses después de su siembra. En *Oncidium* no se pudo realizar el replante debido a que las condiciones del laboratorio no eran las adecuadas.

2.4 Trabajo de campo

La semilla de *Epidendrum secundum* se obtuvo del invernadero del Sr. Sergio Puma ubicado en el sector de Ochoa León. Las coordenadas del sitio son: S $02^{\circ}49.999'$ y WO $78^{\circ}59.202'$. La altura a la que se encuentra es de 2516 m s.n.m.



Foto 5. Ubicación de *Epidendrum secundum*



Foto 6. Invernadero del Sr. Sergio Puma

La semilla de *Oncidium excavatum* fue donada del invernadero del Sr. Juan Pablo Jara ubicado en la autopista Cuenca-Azogues.

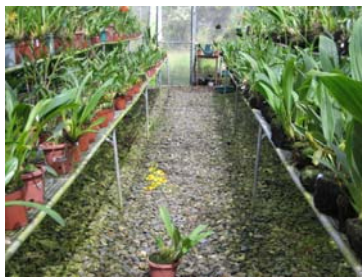


Foto 7. Ubicación de *Oncidium excavatum*



Foto 8. Invernadero del Sr. Juan Pablo Jara

2. 5. Trabajo de laboratorio

2. 5.1 Preparación del medio de cultivo MS

2.5.1.1 Preparación de soluciones madre

Las soluciones madre de sales inorgánicas se deben preparar combinándolas para evitar su precipitación. La solución salina madre de Murashige y Skoog se diluyó en 100 ml de agua destilada colocando la siguiente cantidad de macroelementos:

SOLUCIONES	g (100 ml)⁻¹
Solución A (Nitratos)	8,25
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	9,50
Nitrato de potasio (KNO ₃)	
Solución B (Sulfatos)	
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	1,85
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ . 4 H ₂ O)	0,223
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ . 4 H ₂ O)	0,086
Sulfato cúprico (CuSO ₄ . 5 H ₂ O)	0,00025
Solución C (Halógenos)	
Cloruro de calcio (CaCl ₂ . 2 H ₂ O)	2,2
Yoduro de potasio (KI)	0,0083
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ .6 H ₂ O)	0,005025
Solución D (PO₄, BO₃, MoO₄)	
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0,850
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	0,062
Molibdato de sodio (Na ₂ MO ₄ . 2 H ₂ O)	0,0025
Solución E (Na, Fe, EDTA)	
Sulfato ferroso (FeSO ₄ . 7 H ₂ O)	0,2781
Ácido etildiaminotetracético (sal disódica) (Na ₂ EDTA)	0,3731

2.5.1.2 Procedimiento

1. Colocar 10 ml l⁻¹ de cada solución madre de MS.
2. Aforar a 1000 ml l⁻¹ con agua destilada.
3. Añadir 6 g de agar – agar.
4. Colocar 20 g de azúcar.
5. Calibrar el pH a 5,6 y hacer hervir por 1 minuto
6. Añadir 1 ml de Tiamina (10 mg l⁻¹), 1 ml de ácido Nicotínico (2 mg l⁻¹) y 1 ml de Mioinositol (100 mg l⁻¹).
7. Poner en los tubos o frascos y tapar
8. Esterilizar en la autoclave a 15 atm. de presión durante 30 minutos
9. Dejar enfriar y colocar en la cámara de flujo.

2.5.2 Preparación de medios de cultivo con combinación de productos naturales

En los medios de cultivo de combinación de MS con productos naturales se agregó a la solución 150 g l⁻¹ de plátano verde licuado o 30 ml l⁻¹ de agua de coco respectivamente, o ambos productos para los medios mixtos. En el caso de los

medios de cultivo sin MS, se siguió el mismo proceso, sin agregar las soluciones madre.

La cantidad de agua de coco que utilizamos fue de 30 ml l⁻¹, debido a que decidimos probar una nueva concentración. En la bibliografía de Sánchez *et al* (1994) utilizaron 100 ml l⁻¹ de solución y lo recomendado según Silva (1972) para el cultivo de orquídeas de semilla o cultivo meristemático es de 150 ml l⁻¹ de agua de coco verde, por tratarse de una sustancia rica en elementos asimilables para las plantas. Villena y Lala (2002) dicen, que el agua de coco puede ser añadida al medio como fuente de citoquininas mejorando el crecimiento de células u órganos in Vitro. Morel (1974) observó en *Cattleya* que el agua de coco promovía la división de células epidérmicas originando protocormos, estos eran generados rápidamente y el porcentaje de explantes que no crecía sufría necrosis y era menor.

2. 5. 3 Desinfección de cápsulas cerradas

Las cápsulas de semilla inicialmente fueron limpiadas con un suave cepillo y lavadas con agua y jabón, para remover todo vestigio de polvo y material que pueda contaminar. Después la cápsula fue sumergida en solución de NaOCl (Ajax R), con 5% de cloro activo durante 20 minutos, fue lavada con agua esterilizada y colocada en la caja petri también estéril para proceder al corte y siembra.

2. 5. 4 Desinfección de las semillas

Para desinfectar las semillas se utilizó un tubo de ensayo con aproximadamente siete ml de una solución de cloro (NaOCl con 5% de cloro activo), diluida al 20%, en la cual se colocó una punta de espátula de semillas. Luego de agitar rigurosamente el tubo de ensayo, se procede a lavar las semillas varias veces con agua estéril, eliminando las aguas de lavado. Por último se conservan cuatro o cinco ml de agua con las semillas que serán utilizados para la siembra sobre el medio de cultivo estéril, el cual se disperse en tubos de ensayo o frascos diseñados para el propósito, los que fueron sellados adecuadamente con parafina; esto disminuye o elimina las posibilidades de contaminación.

2.5.4.1 Siembra de semilla

El trabajo se realizó en condiciones de esterilidad (utilizando desinfectantes como cloro, alcohol y formol 0.5% sobre los utensilios y el lugar de trabajo) y bajo cámara de flujo laminar (que filtra el aire eliminando toda partícula extraña).

Se realizaron dos métodos de siembra, uno con siembra directa y otro con desinfección. Cuando la cápsula está cerrada, se la abre en la cámara de flujo y se deja caer un poco de semilla sobre el medio de cultivo. Cuando se desinfecta la semilla, que esta en agua estéril, se coloca entre uno y dos cm³ de esta sobre el medio de cultivo. Posteriormente se sella el frasco y se lleva al cuarto de crecimiento.

2.5.4.2 Replante

Para el replante de *Epidendrum secundum*, se seleccionaron varios frascos sembrados de cada medio que presentaban las plántulas de mejores características (crecimiento, enraizamiento, etc.). Estos frascos fueron llevados a la cámara de flujo y en condiciones de asepsia de destaparon; en ellos se ubicó a las plantas más fuertes al azar. Las plántulas se colocaron en una caja petri estéril y de allí fueron colocadas con una pinza sobre los medios nuevos. Se sembró aproximadamente 15 plántulas por frasco, se flameó y selló. Por último, los frascos fueron trasladados al cuarto de incubación en donde, se mantuvieron por el lapso de tiempo establecido para nuestro estudio.

2. 5. 5 Cuidados de las semillas sembradas

Los recipientes en los que se sembraron las semillas fueron mantenidos a una temperatura de 18 a 20°C, las 24 horas del día, con iluminación de 100 pies de luz, lo que ayuda a la germinación, además se conservaron expuestos a luz neon con fotoperíodos de 16 horas al día.

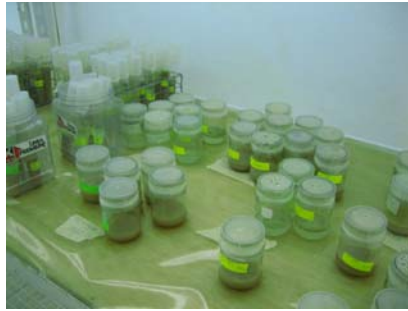


Foto 9. Recipientes en el cuarto de cultivo

Cuando se observaron signos visibles de germinación (dos semanas a cuatro meses) se evidenció la formación de protocormos, que más tarde desarrollaron pequeñas hojas y raicillas. El primer replante se efectuó en *Epidendrum* luego de cuatro a cinco meses, colocando las plántulas en otro medio que aportó nutrientes, favoreciendo su desarrollo.

El clima de Cuenca es sano y favorece la implantación y desarrollo de un laboratorio de micropropagación. Las condiciones extremas de temperatura y humedad, son condiciones adversas para lograr satisfacciones en este sentido. Cuando las plántulas estuvieron entre siete y ocho cm, en el caso de *Epidendrum* entonces estaban listas para su siembra fuera del medio de cultivo. Se realizó un lavado en agua tibia para eliminar el agar, que permite contaminación. Luego se las dejó reposar en el mismo frasco del cual fueron extraídas por alrededor de 24 horas, para lograr la cicatrización de pequeños cortes y daños producidos por el tratamiento que brindamos.

El sustrato de siembra que se utilizó fue de corteza desintegrada de helecho gigante (chonta: *Cyathea sp.*). La siembra fue en comunidad entre 15 y 20 plántulas por recipiente y se la mantuvo con poca humedad durante una semana en la sombra. Luego, se las colocó en un sitio donde les diera una hora de luz de la mañana y se las roció diariamente durante un mes hasta que las raicillas se prendan. Se colocó abono foliar una vez al mes. Las plántulas muy pequeñas fueron desechadas.



Foto 10. Siembra de *Epidendrum* en chonta.

2. 6 Análisis bromatológico del agua de coco

Para el análisis bromatológico del agua de coco, se siguieron los métodos que se describen a continuación:

2.6. 1 Métodos de Análisis

2.6.1.1 Proteínas

Método de Kjeldhal

Consiste en una mineralización del nitrógeno total por acción de un ácido fuerte en presencia de catalizadores y coloración del amoníaco formado en tal proceso.

Reactivos:

- Peróxido de hidrógeno al 30%.

- Solución de selenio
4,2584 g de dióxido de selenio al 99% en 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y aforar a un litro.

- Ácido sulfúrico concentrado.

- Solución de ácido sulfúrico
50 cm³ de ácido sulfúrico concentrado, aforar a un litro con agua destilada.

- Sulfato de sodio.

- Medio de dilución básico
32 g de hidróxido de sodio y 56 g de tartrato de sodio y potasio y aforar a un litro.

- Solución de hipoclorito de sodio al 30%.

- Agente de salicilato
80 g de salicilato de sodio y 0,7 g de nitro prusiato de sodio, aforar a un litro.

- Solución madre de Nitrógeno 1000 ppm
4,714 g de sulfato de amonio, aforar a un litro.

a) Mineralización de la muestra

Se pesó 0,5 g de muestra desecada, se la coloca en tubos Kjeldhal. Se realizaron cuatro muestras y un blanco. Se añadió 2 ml de peróxido de Hidrógeno al 30%, 2 ml de solución de selenio y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (se debe tener la precaución de colocar los tubos en la base apropiada con un poco de agua para evitar que el ácido se caliente y se derrame). Y se procedió a la extracción en presencia de sulfato de sodio, el cual capta el agua y eleva la temperatura favoreciendo la mineralización.

El ataque en el Micro Kjeldhal debe seguirse hasta que la solución pierda totalmente el color:

Destrucción previa: 30 minutos de 37 - 39°C.

Destrucción: 2 horas aproximadamente a 36 a 41°C *.

* Nota: El tiempo de mineralización en nuestro caso fue de cinco días, para conseguir una correcta mineralización (cantidad mínima de N).

Después de esto se deja enfriar completamente y se afora con agua destilada a 100 cm^3 (se afora poco a poco y mezclando bien las soluciones).

Las soluciones se pasan a un matraz y están listas para la lectura en el espectrofotómetro.

Para la curva de calibración se deben preparar los patrones de Nitrógeno, así:

De la solución madre de nitrógeno (1000 ppm) se toma 1, 3, 5, 7, 9, 12 cm^3 y se afora con solución de ácido sulfúrico a 100 cm^3 obteniendo concentraciones de 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, 90 ppm y 120 ppm respectivamente

b) Determinación

La muestra, el blanco y los patrones se trabajan por igual.

En un matraz se coloca un cm^3 de solución de muestra, seis cm^3 de medio de disolución básico, $4,2\text{ cm}^3$ de hipoclorito de sodio y $4,2\text{ cm}^3$ de agente de salicilato.

Se espera hasta que desarrolle el color por 15 minutos y luego se lee la absorbancia de cada uno de ellos en un espectrofotómetro a 654 nm.

Con las lecturas de los patrones se prepara la curva de calibración, poniendo en ordenadas la lectura del espectro y en abscisas la concentración de los patrones.

En esta curva se puede determinar la concentración de cada muestra a base de la lectura del espectro, restando el valor correspondiente al blanco (Carrión, 1968).

2.6.1.2 Lípidos

Método de Soxhlet

Reactivos:

- Éter de petróleo

a) Determinación

- Se preparó éter de petróleo.
- Se analizaron dos muestras.
- Se pesó 5 g de muestra y se transfirió el residuo seco a un cartucho de extracción.
- Se limpió la cápsula de desecación con pequeños copos de algodón humedecidos con éter de petróleo y se colocó los copos en el cartucho.
- Se colocó el cartucho en el extractor en dos balones tarados que contenían 100 ml y 250 ml de éter respectivamente. Se conectó el extractor a un condensador Soxhlet.
- Se colocó un tapón en el condensador para que no se evapore el éter y se calentó a temperatura media – baja.
- Se extrajo la muestra, bajo reflujo, sobre baño de agua o de vapor durante dos a tres horas *.

* Nota: En este caso, debido a la poca cantidad de grasa, la muestra estuvo 3,5 horas durante cinco días.

- Se evaporó el éter del balón que contenía la muestra de grasa en la estufa de aire a 75°C hasta eliminar las últimas trazas.

- Se enfrió la muestra resultante en desecador y luego se la pesó. Este proceso se repite hasta obtener un peso constante.

Cálculo:

Peso de la muestra antes de la desecación: W1

Peso del balón sin grasa: W2

Peso del balón con grasa: W3

$$\{(W3 - W2)/W1\} * 100 = \text{grasa extraíble \%}.$$

$$\left[\frac{(W3 - W2)}{W1} \right] * 100 = \% \text{ grasa extraíble}$$

(Montes 1969).

2.6.1.3 Hidratos de carbono totales

Método de Fehling (Determinación de azúcares totales)

Para la determinación de almidón se realiza el siguiente análisis.

Reactivos:

- Solución al 5% de glucosa.
- Reactivo de Fehling A y B.

Preparación de Fehling A

Se pesó 6,9268 g de sulfato cúprico para el análisis y aforamos en 100 ml con agua destilada.

Preparación de Fehling B

Se pesó 34,6 g de tartrato sódico potásico y 10 g de sosa, se mezcló y se aforo a 100 ml con agua destilada.

Procedimiento para valorar Fehling: se tomo 5 cm³ de Fehling A, y 5 cm³ de Fehling B, y se los coloca en un erlenmeyer de 100 cm³ de capacidad; se agregó 30 cm³ de agua destilada se sometió a ebullición y así se dejó caer desde la bureta la solución de glucosa hasta que la solución del erlenmeyer pase de azul a incoloro observándose un precipitado pardo rojizo de óxido de cobre en el fondo del recipiente.

Calculo del factor de fehling:

100 cm³ sol glucosa 0.5 g de glucosa
 10 cm³ sol glucosa 0.05 g de glucosa

10 cm³ de solución de Fehling deberían ser reducidos por 0.05 g de glucosa contenidos en 10 cm³ de solución de glucosa; cuanto se requiere (X) para reducir 10ml de fehling, por tanto:

$$\begin{array}{rcl} 10 \text{ ml} & 0.05 \text{ ml} & \\ 8.6 \text{ ml} & & = 0.043 \text{ (X) g de glucosa} \end{array}$$

Procedimiento para la muestra

Se tomaron 10 ml de la muestra y se calentó directamente en refrigerante de reflujo con una mezcla de 50 cm³ de agua destilada y 2,8 cm³ de ácido clorhídrico concentrado durante 2 horas y media. Se dejó enfriar, y se agregó 2 ml de crema de alúmina recién precipitada por acción entre el sulfato de aluminio y sosa al 5%. Se alcalinizó débilmente con sosa al 20%. Se trasladó a un matraz aforado de 100 cm³, luego fue filtrado. Se tomó 5 cm³ de solución A y 5 cm³ de solución B de Fehling. Se puso en un erlenmeyer y se agrega 30 cm³ de agua destilada, se calentó a ebullición y se va agregando desde la bureta la solución de glucosa filtrada (muestra) hasta que la solución pase de azul a incoloro y se obtuvo un precipitado pardo rojizo.

Cálculos:

Peso de la muestra = 10 ml aforados a 100 ml

Volumen de filtrado empleado = 13.2 ml (Z)

$$\begin{array}{r} Z \\ 100 \text{ ml} \end{array} \quad \begin{array}{l} X \text{ de glucosa} \\ x = Y \text{ de glucosa} \end{array}$$

$$\begin{array}{r} 10 \text{ ml de muestra} \\ 100 \text{ ml} \end{array} \quad \begin{array}{l} Y \text{ g de glucosa} \\ x = W \text{ g de glucosa} \end{array}$$

Factor de conversión de glucosa a almidón: 0.9

Hidratos de carbono expresados como almidón = $W \times 0.9 =$ % de hidratos de carbono (p/p) (Osborne y Voogt 1986).

2.6.1.4 Humedad

Se desecó el vaso de precipitación en la estufa durante 15 minutos, se enfrió en el desecador. Se colocó 534,5 ml de agua de coco en un vaso de precipitación. Se secó la muestra en la estufa en temperatura alta durante 5 horas hasta que se obtuvo un residuo viscoso. Este residuo se dejó enfriar y se colocó en una cápsula previamente pesada.

La cápsula se llevó a la estufa para secar a 75°C durante 8 días. Con ello se obtuvo un caramelo color café negruzco y se puso en el desecador durante 8 días. Se pesó la cápsula con muestra.

Cálculos:

P inicial (P0)= peso del agua de coco*

P1= cápsula vacía

P 2 = cápsula + muestra desecada

$P_2 - P_1 =$ Peso de materia seca

$P_0 -$ Peso de materia seca = Peso del agua evaporada

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso de agua evaporada}}{\text{peso } 0} * 100$$

*Como la densidad del agua de coco de acuerdo a la tomada con un densímetro en el laboratorio, es prácticamente igual a $1 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$, entonces el volumen en mililitros es como el peso del líquido en gramos.

2.7 Toma de datos

Para realizar la toma de datos, las plántulas fueron extraídas de los frascos con una pinza y colocadas sobre una superficie plana. Para medirlas se utilizó el calibrador y también se tomaron los datos de número de hojas y enraizamiento.



Foto 11. Toma de medidas de plántulas

2.8 Análisis de datos

Para el análisis del porcentaje de germinación en las distintas siembras (dos meses de observación), para el promedio de crecimiento (base raíz – ápice), para el promedio del número de hojas y enraizamiento de las dos especies estudiadas (cuatro y cinco meses de observación) en los seis tratamientos y el testigo (MS), se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2003 y para el análisis de las medidas de crecimiento, se empleó el programa Statistica 6.0 (Anova a un criterio) y el Test a posteriori Scheffé. En el caso del replante del género *Epidendrum secundum* (siete y

ocho meses de observación), se utilizó la misma metodología, para el análisis de datos.

Todo el capítulo nos puede servir para la continuación de estudios en estas mismas especies, la replicación de los métodos con otras especies de *Oncidium* y *Epidendrum* o también con otros géneros de orquídeas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados de las metodologías aplicadas en la germinación y crecimiento de las especies de orquídeas de *Epidendrum secundum* y *Oncidium excavatum*.

3.1 Análisis de porcentajes de germinación registradas en el transcurso del proyecto

Resultados de la germinación promedio en porcentaje de *E. secundum* en los primeros dos meses de observación

Tabla 3.1.1 Porcentaje de germinación en las siembras de *E. secundum*.

MEDIOS	Prueba 1	Prueba 3
MS	72,73	75
COCO+MS	90,91	75
PLÁTANO VERDE+MS	100	50
COCO+PLÁTANO+MS	81,82	75
COCO	100	100
PLÁTANO VERDE	72,73	100
COCO+PLÁTANO	90,91	75

La siembra de *Epidendrum secundum* se realizó en tres ocasiones; con cápsula cerrada en la prueba uno y dos (3 y 8 de mayo del 2006) y con desinfección sobre semilla en la prueba tres (9 de mayo del 2006). No se tomó en cuenta la prueba dos pues ingresó cloro en la semilla a través de la cápsula y germinó escasamente, ni tampoco la que se realizó con semilla conservada en refrigeración por tres meses que perdió fertilidad (28 de abril del 2006).

Los resultados que se obtuvieron en la germinación de la semilla, en relación al tiempo de observación desde la siembra hasta dos meses, con los siete tratamientos para *Epidendrum secundum*, fueron los siguientes: una germinación mayor al 72% en la prueba uno, en todos los tratamientos debido a que se realizó la desinfección con cápsula cerrada.

Cuando se analiza la prueba tres se puede ver que la germinación va desde el 50%, cuando se realiza una desinfección en la semilla; con lo que se asume que la semilla es más sensible al cloro.



Foto 12. Formación de protocormos de *E. secundum*

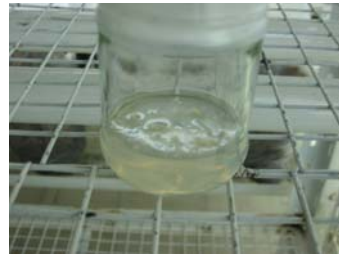


Foto 13. Inhibición de crecimiento en el medio de coco de *E. secundum*

Resultados de la germinación promedio en porcentaje de *O. excavatum* en los primeros dos meses de observación

Tabla 3.1.2 Porcentaje de germinación en las siembras de *O. excavatum*.

MEDIOS	Prueba 1	Prueba 2
MS	84,21	83,34
COCO+MS	78,95	83,34
PLÁTANO VERDE+MS	0	66,67
COCO+PLÁTANO+MS	36,84	33,34
COCO+AGAR	0	0
PLÁTANO VERDE	0	0
COCO+PLÁTANO	0	0

La siembra del género *Oncidium* se realizó en dos ocasiones con desinfección de semilla (4 y 7 de julio del 2006). No se tomaron en cuenta otras pruebas por lo siguiente: semilla en refrigeración por 1 mes (perdió viabilidad: 28 de abril del 2006), prueba con una cápsula muy verde (dormancia de semilla: 21 de junio del 2006) y por último se realizaron en dos ocasiones (7 y 10 de julio) pruebas con semilla que estuvo muy madura (cápsula abierta de algunos días).

Los resultados que se obtuvieron de la germinación en relación al tiempo en la semilla de *O. excavatum* con los siete tratamientos, con observación desde la siembra hasta dos meses, fueron los siguientes: una germinación bastante irregular en los distintos medios; solo existe germinación en el testigo (MS) y en los medios de combinación de MS con coco y MS con coco y plátano.

En la prueba dos, la germinación permanece similar a la prueba uno, con la variación de que en la combinación de MS con plátano verde, si hay germinación.

En ambos casos la desinfección fue sobre semilla abierta, debido a que no se pudo conseguir en cápsula. En los medios formulados con MS existe la mayor fase de germinación.

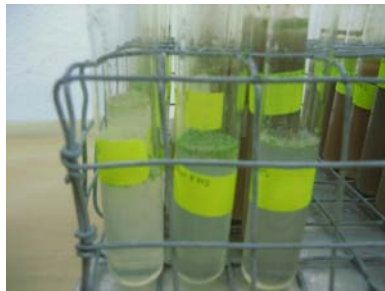


Foto 14. Formación de protocormos de *O. excavatum*

3.2 Análisis del crecimiento registrado en el transcurso del proyecto

Resultados del crecimiento promedio en cm. de *E. secundum* en la siembra (cuatro y cinco meses) y en el replante (siete y ocho meses)

Tabla 3.2.1 Comparación del promedio de crecimiento en cm en la siembra (medida 1) y en el replante (medida 2) de *E. secundum*.

MEDIOS	Medición 1 (cm)	Medición 2 (cm)
MS	1,18	3,57
COCO+MS	1,145	2,47
PLÁTANO VERDE+MS	0,455	1,56
COCO+PLÁTANO+MS	1,74	2,92
COCO	0	0
PLÁTANO VERDE	0,4	1,51
COCO+PLÁTANO	1,18	1,495

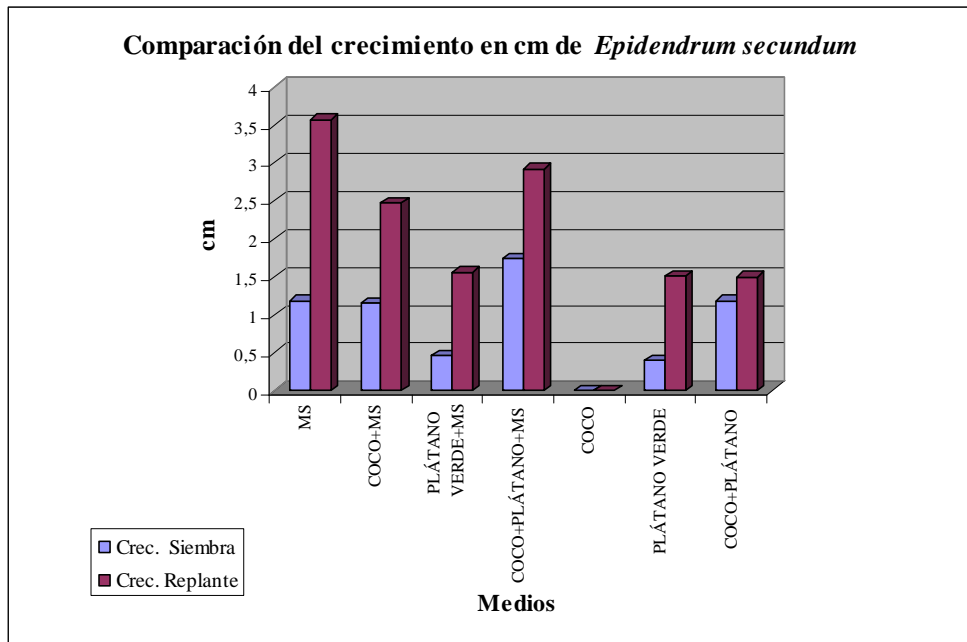


Figura 3.2.1 Comparación del crecimiento promedio en cm de *E. secundum* siembra vs. replante

Los resultados que se obtuvieron del crecimiento en altura (cm), en la medida 1 de los siete tratamientos para *E. secundum*, fueron: varios grupos en forma descendente de tamaño, un primer grupo de crecimiento mayor en el tratamiento de MS con coco y plátano; un segundo grupo en el testigo (MS), en coco con plátano y en MS con coco; un tercer grupo de crecimiento en MS con plátano y en plátano, y un cuarto grupo sin crecimiento en coco.



Foto 15. Crecimiento en replante de *Epidendrum*

Los datos en el replante nos demuestran que hay un crecimiento del triple de altura en relación con la medida inicial, en el replante del testigo (MS). MS con coco y plátano le continúa en crecimiento con diferencia de más de un cm en solo dos o tres meses. MS con coco, MS con plátano y plátano verde también notó buen crecimiento. En coco no se observó ningún crecimiento y por tanto no hubo replante. Los medios de plátano verde y coco más plátano en el replante, no dieron las condiciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de las plantas.



Foto 16. Plántulas amarillentas de *E. secundum* en medios formulados con productos naturales

Resultados del crecimiento promedio de *O. excavatum* en los cuatro y cinco meses de observación

Tabla 3.2.2 Promedio de crecimiento en cm. de *O. excavatum*.

MEDIOS	Crecimiento promedio (cm)
MS	2,08
COCO+MS	1,17
PLÁTANO VERDE+MS	0,96
COCO+PLÁTANO+MS	0,67
COCO	0
PLÁTANO VERDE	0
COCO+PLÁTANO	0

Los resultados que se obtuvieron del crecimiento en altura (cm), en las plántulas de los siete tratamientos para *O. excavatum*, en relación al tiempo de observación de cuatro a cinco meses fueron los siguientes: existen tres grupos bien definidos en forma descendente. El primer grupo con el mayor tamaño lo forma el medio testigo (MS); el segundo grupo lo constituyen los medios de combinación de MS con productos naturales y un tercer grupo que no posee ningún crecimiento en proporción dos a cero con respecto al testigo (MS) que son: coco, plátano verde y coco con plátano verde.



Foto 17. Comparación de crecimiento entre medios de *O. excavatum*

3.3 Análisis de promedios del número de hojas registradas en el transcurso del proyecto

Resultados del crecimiento del número de hojas promedio de *E. secundum* en la observación 1 (cuatro y cinco meses) y en la observación 2 (replante: siete y ocho meses)

Tabla 3.3.1 Promedio de número de hojas de *E. secundum* en la observación 1 y 2

MEDIOS	Promedio de hojas Observación 1	Promedio hojas Observación 2
MS	2	7
COCO+MS	4	4
PLÁTANO VERDE+MS	2	4
COCO+PLÁTANO+MS	3	5
COCO	0	0
PLÁTANO VERDE	2	3
COCO+PLÁTANO	2	3

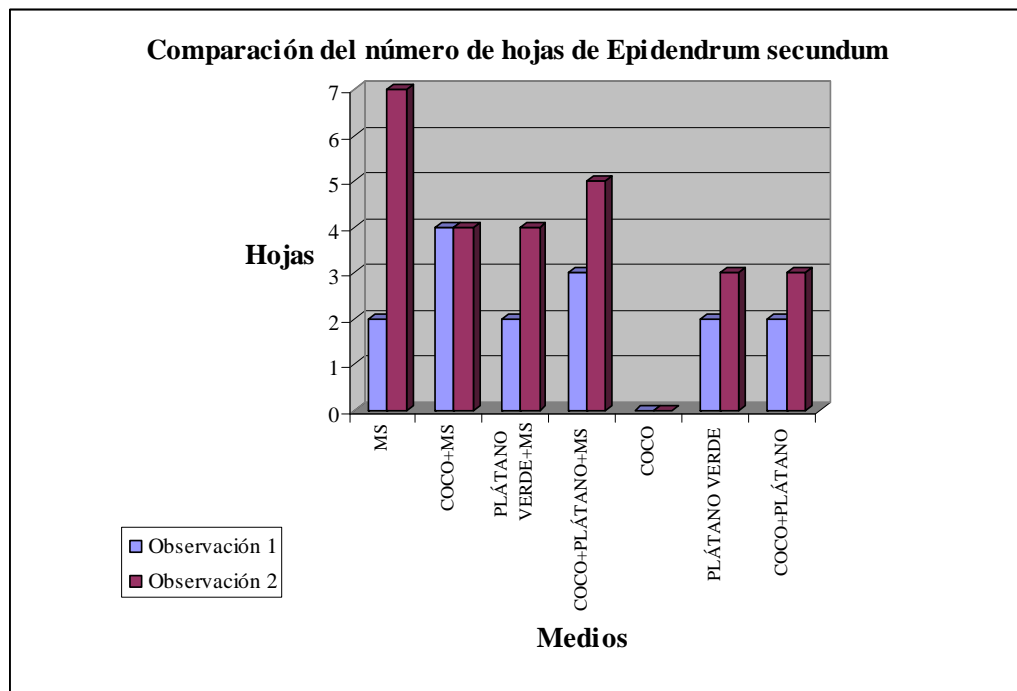


Figura 3.3.1 Promedio del número de hojas en las observaciones de *E. secundum*.

En la observación 1 a los cuatro y cinco meses desde la siembra, el número de hojas en el tratamiento de coco más MS, es el que da mejores resultados, pues obtiene el mayor promedio. Le continúa el medio de MS con coco y plátano; de allí se forma un grupo de dos hojas entre el testigo (MS), MS con plátano, plátano verde y coco plátano. En el medio de coco no se registra crecimiento, por lo que no se puede reportar presencia de hojas.

En la observación 2, después de los siete y ocho meses de la siembra, el número de hojas en el tratamiento de testigo (MS) es el que da mejores resultados aumentado considerablemente en el replante. Le continúa el medio de coco más plátano y MS con cinco hojas; en tercer forman un grupo coco más MS y Plátano verde más MS, tomando en cuenta que el promedio de hojas en coco y MS, no aumentó. Y por último el crecimiento de hojas en el replante tanto en plátano verde y coco más plátano solo aumentó en una hoja. En el medio de coco no hubo crecimiento y por lo tanto tampoco hojas.

Resultados del crecimiento promedio de hojas de *O. excavatum* en los cuatro y cinco meses de observación

Tabla 3.3.2 Promedio de número de hojas en los siete tratamientos de *O. excavatum*.

MEDIOS	Promedio hojas
MS	3
COCO+MS	3
PLÁTANO VERDE+MS	4
COCO+PLÁTANO+MS	2
COCO+AGAR	0
PLÁTANO VERDE+ AGAR	0
COCO+PLÁTANO+AGAR	0

Como se observa en la figura, el medio de MS con plátano verde, es el que mejores resultados obtuvo. De allí le continúa el grupo del testigo (MS) y MS con coco; el tercer resultado es el tratamiento de coco y plátano más MS. No existe ningún crecimiento en los medios sin combinación de MS.

3.4 Análisis de promedios de enraizamiento registrados en el proyecto

Resultados del enraizamiento promedio de *E. secundum* en la medida uno y dos

Tabla 3.4.1 Presencia de raíces y brotes de raíz, en la medida 1y 2.

MEDIOS	Raíz siembra *	Raíz replante*
MS	1	1 - 2
COCO+MS	1	1 - 2
PLÁTANO VERDE+MS	1	1 - 2
COCO+PLÁTANO+MS	1	1 - 2
COCO	0	0
PLÁTANO VERDE	0	0
COCO+PLÁTANO	0	1

* Equivalencia: Si = 1, No = 0, Brotes = 2

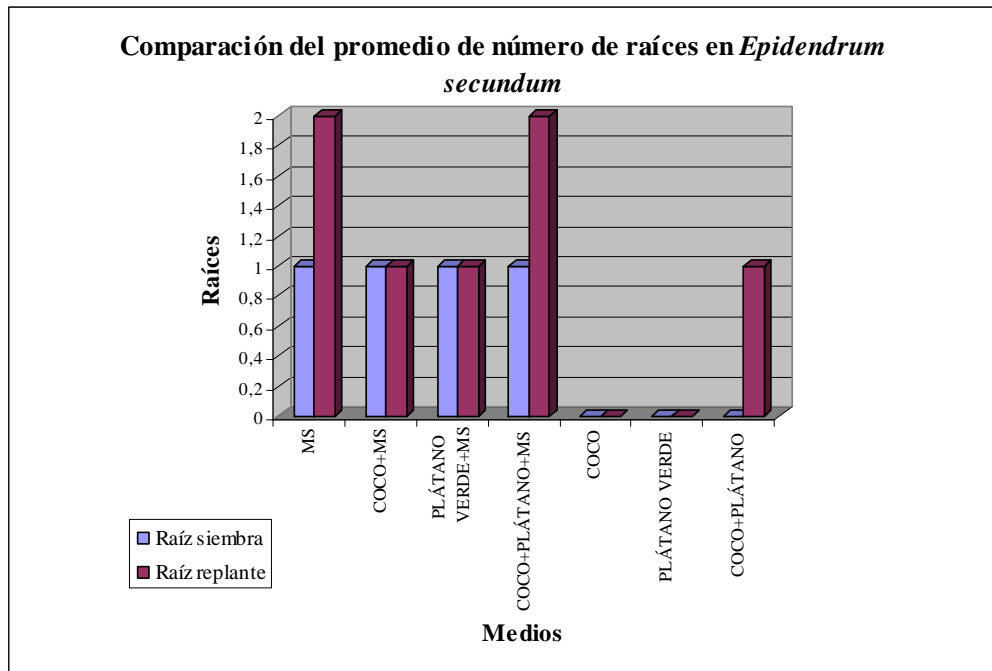


Figura. 3.4.1 Comparación del promedio del número de raíces en siembra y replante.

En la figura se puede ver que en la primera medida, hay el mismo número de raíces en los medios de combinación con MS y en el testigo (MS). En los medios que no poseen MS, las plántulas no tienen raíces. El coco no posee ningún crecimiento.

En la segunda medida después del replante, el número de raíces aumenta en el testigo (MS) y MS con plátano y coco. Las otras mezclas con MS, no presentan cambios. Coco más plátano presenta crecimiento de raíz en el replante y en coco y en plátano verde no hay raíces. Hay que evidenciar que en el replante (medida 2), solo en el MS y en sus combinaciones con productos naturales, se presentan pequeños brotes de raíz.

Resultados del enraizamiento promedio de *O. excavatum* en la medida uno a partir de la siembra (cuatro y cinco meses)

Tabla 3.4.2 Presencia de raíces y brotes de raíz, en la medida uno de *O. excavatum*.

MEDIOS	Raíz siembra *
MS	1
COCO+MS	1
PLÁTANO VERDE+MS	1 - 2
COCO+PLÁTANO+MS	1
COCO	0
PLÁTANO VERDE	0
COCO+PLÁTANO	0

* Equivalencia: Si = 1, No = 0, Brotes = 2

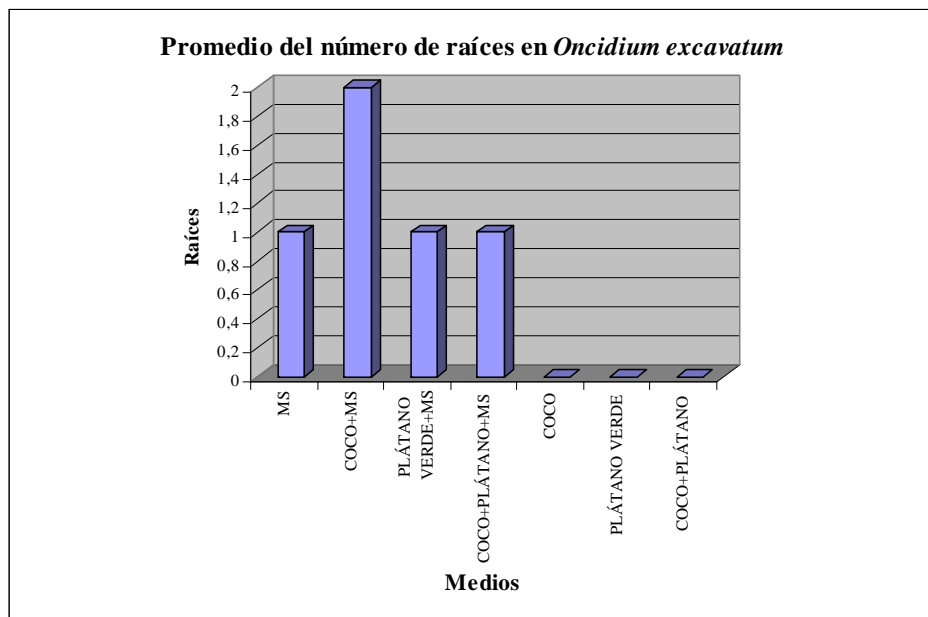


Figura. 3.4.2 Promedio del número de raíces en la medida 1 de *O. excavatum*.

En *Oncidium excavatum* hay mayor crecimiento de raíces en coco + MS. Le continúa el testigo (MS) y sus mezclas restantes. Los medios sin MS, no presentan ningún crecimiento.



Foto 18. Pelos absorbentes en raíces de *Oncidium*

3.5 Análisis de promedios de contaminación registrados en el proyecto

Resultados de la contaminación promedio de *E. secundum* en la siembra

Tabla 3.5.1 Porcentaje de frascos contaminados en las pruebas de *E. secundum*.

MEDIOS	Contaminados	
	Prueba 1	Prueba 3
MS	27,28	25
COCO+MS	9,09	25
PLÁTANO VERDE+MS	0	25
COCO+PLÁTANO+MS	18,18	25
COCO	0	0
PLÁTANO VERDE	27,27	0
COCO+PLÁTANO	9,09	25

El nivel de contaminación en las pruebas es relativamente bajo. La prueba uno con cápsula cerrada demostró obtener menor contaminación en general. Solo MS y plátano verde fueron superiores al 25 % de contaminación. Esta contaminación puede deberse a incorrectas normas de asepsia en la siembra, a las cuales contribuyo que el ambiente del cuarto de crecimiento no era el adecuado. La prueba tres con

desinfección sobre semilla obtuvo mayor contaminación en casi todos los medios, lo cual nos indica que es mejor realizar la esta limpieza en cápsula cerrada.

La contaminación en el crecimiento no fue registrada, debido a que esta se atribuye a las condiciones de la sala de incubación, las cuales permitieron ingresar contaminación a los frascos en la primera medida. En el replante siempre se tiene riesgo de contaminación en la sala de siembra y en la sala de incubación por lo que tampoco se tomó en cuenta. De acuerdo a la observación de los frascos tanto en la germinación como en el crecimiento se puede decir que tuvimos contaminación por: hongos, algas y levaduras.



Foto 19. Contaminación por hongos



Foto 20. Contaminación por algas

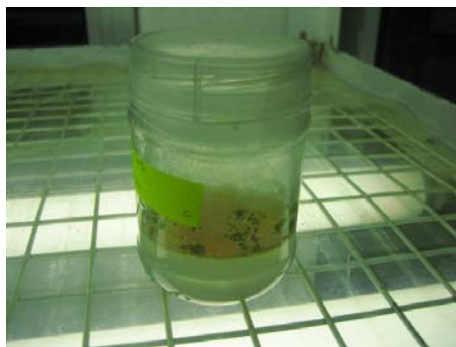


Foto 21. Contaminación por levaduras

Resultados de la contaminación promedio de *O. excavatum* en la siembraTabla 3.5.2 Porcentaje de frascos contaminados en la prueba dos de *O. excavatum*.

MEDIOS	Prueba 2
MS	0
COCO+MS	0
PLÁTANO VERDE+MS	33,34
COCO+PLÁTANO+MS	50
COCO	16,67
PLÁTANO VERDE	0
COCO+PLÁTANO	66,67

No hubo contaminación en la prueba uno; todo el porcentaje faltante fue de semilla no germinada posiblemente debido a que perdió viabilidad en la desinfección, le afectó la permanencia en refrigeración o a que las condiciones externas no eran las adecuadas. En la prueba dos, con excepción del testigo (MS) y coco más MS, las combinaciones de MS con productos naturales, se contaminaron y el crecimiento en los frascos germinados fue muy escaso. Los medios sin MS, también se contaminaron pero en este caso no tuvieron ninguna germinación. La contaminación en el crecimiento no fue registrada.

3.6 Análisis estadístico de las medidas de crecimiento registradas al cabo de la observación en el laboratorio

Análisis estadístico de las medidas crecimiento en cm. de la variable altura vs. tratamiento de *E. secundum* al cabo de cuatro y cinco meses.

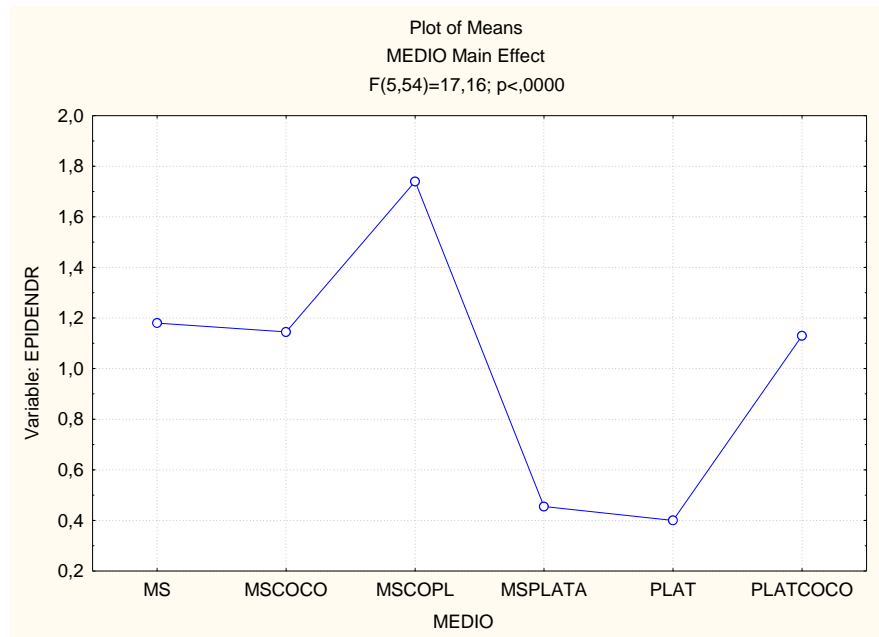


Figura 3.6.1 Test estadístico Anova a un criterio en la primera medida.

Al analizar con el test estadístico Anova a un criterio, la variable dependiente (altura) con la variable independiente (tratamiento) de los datos registrados a los cuatro y cinco meses (primera medida) de *E. secundum*, se obtuvo que el mayor crecimiento en altura es el tratamiento MS con coco y plátano (150 g de pulpa de plátano y 30 ml de agua de coco), en segundo lugar se ubico el testigo (MS) y el tratamiento plátano y coco (150 g de pulpa de plátano verde y 30 ml de agua de coco), en tercer lugar el tratamiento MS más coco (MS con 30 ml de agua de coco) y en cuarto lugar MS con plátano (150 g de pulpa de plátano) y por último el plátano (150 g de pulpa de plátano verde) con los valores más bajos (ver Figura 3.6.1). El tratamiento con agua de coco no registró ningún crecimiento.

El test a posteriori de Scheffé mostró tres grupos homogéneos diferenciados (ver Anexo IV: tabla 4.1). En el primer grupo plátano y MS más plátano difieren

significativamente de los otros dos grupos. Plátano con coco difiere significativamente de MS con coco y plátano. MS más coco y MS están ubicados en la mitad y no difieren significativamente de MS con coco y plátano.

Análisis estadístico de las medidas de replante en cm de la variable crecimiento vs. tratamiento de *E. secundum* al cabo de siete y ocho meses

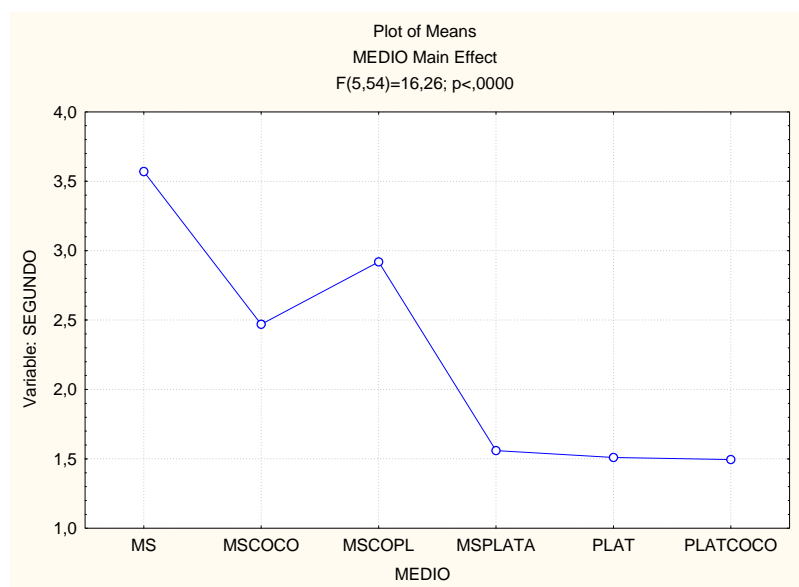


Figura 3.6.2 Test estadístico Anova a un criterio en la medida dos.

Al aplicar el test estadístico Anova a un criterio para evaluar la variable crecimiento en replante en las medidas finales (siete y ocho meses) de *E. secundum* se observó que el testigo (MS) dio los mejores resultados, el siguiente tratamiento con mejores resultados fue MS con coco y plátano, en tercer lugar se tuvo el tratamiento de MS con coco y con valores más bajos en forma descendente estuvieron MS con plátano, plátano y plátano más coco (ver Figura 3.6.2).

El test a posteriori de Scheffé nos dio tres grupos homogéneos (Ver Anexo IV: tabla 4.2). El primero lo conforma plátano con coco, plátano, MS más plátano y MS más coco; este último está en la mitad pues también forma parte del grupo dos junto con MS con coco y plátano el cual también forma parte del grupo tres, dentro del tercer grupo asimismo está MS. MS con coco y plátano difiere significativamente del primer grupo y MS difiere significativamente de los otros dos grupos.

Análisis estadístico de las medidas crecimiento en cm de la variable altura vs. tratamiento de *O. excavatum* al cabo de cuatro y cinco meses

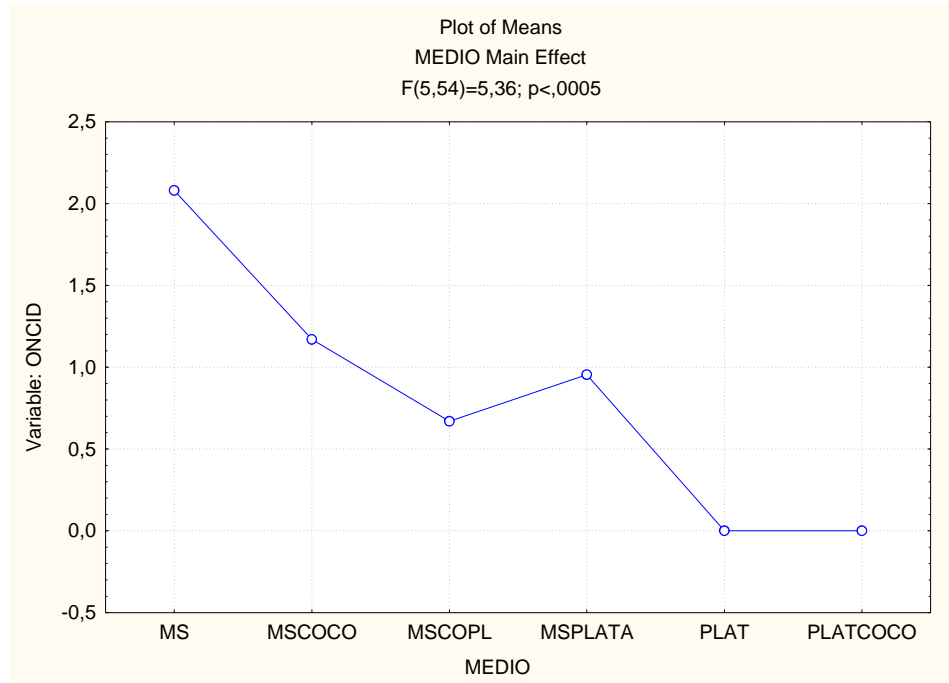


Figura 3.6.3 Test estadístico Anova a un criterio en *O. excavatum*.

El mayor crecimiento de altura en *O. excavatum* al analizar la variable tratamientos se dio en el testigo (MS) con un promedio de 2,08 cm, el segundo lugar lo ocupó el tratamiento MS con coco (MS con 30 ml de agua de coco), plátano más MS (MS con 150 g de pulpa de plátano verde) se encontró en tercer lugar, en cuarto lugar MS más coco con plátano y por último tenemos a los tratamientos sin MS que no registraron ningún crecimiento (ver Figura 3.6.3).

El test a posteriori de Scheffé nos demuestra que hay dos grupos homogéneos (Ver Anexo IV: tabla 4.3). El primer grupo lo conforman plátano con coco, plátano, MS con coco y plátano, MS y plátano, y MS con coco. Estos difieren significativamente de MS. MS con coco y plátano, MS y plátano, y MS con coco también forman junto a MS parte del grupo dos. Esto nos dice que el medio de MS es el más adecuado para el crecimiento de *Oncidium*, MS con sus combinaciones si demuestra crecimiento pero reducido.

Todos estos resultados nos permiten saber que la influencia de los productos naturales en los medios de cultivo es positiva de acuerdo a cada variable en estudio. El comportamiento de las dos especies es distinto frente a los medios. Además las condiciones del laboratorio influyeron en los resultados así como la manipulación y desinfección de la semilla que fue diferente en cada caso.

3.7 Análisis bromatológico

3.7.1 Agua de coco

Tabla 3.7.1 Nutrientes del agua de coco.

Nutrientes	Valores Teóricos *	Valores obtenidos ** en laboratorio (%)
Proteínas (g)	0,2	0,085
Lípidos (g)	0,1	0,056
Carbohidratos utilizables (g)	4,1	2,93
Humedad (%)	95,1	95,29

Fuente: * Montes, 1969 (Leche de coco: *Cocos nucifera*). Composición por 100 g de porción comestible.

** La densidad es prácticamente $1\text{g (cm}^3\text{)}^{-1}$ por los resultados que se tomaron en el laboratorio con un densímetro, es decir el peso es igual al volumen.

De acuerdo a los datos existe uno similar únicamente en el porcentaje de humedad de la muestra (ver cálculos en Anexo V).

Los valores obtenidos en el laboratorio de proteínas, carbohidratos y lípidos fueron bajos en relación a los teóricos. La diferencia en los resultados, puede deberse al tipo de agua de coco analizada, que parece haber sido muy madura o tal vez al proceso de secado demasiado prolongado que altera (carbonización de proteínas y de grasas) la materia orgánica.



Foto 22. Muestra de agua de coco secada

Los resultados de proteínas, grasas y carbohidratos son complementarios debido a que de esta manera se obtiene una dieta balanceada, para las plántulas, en este caso. Los productos naturales de agua de coco y plátano verde son complementarios en el medio de cultivo, debido a la presencia de hormonas que tienen dentro de sus componentes. Según la bibliografía, en el agua de coco y el plátano verde existen hormonas vegetales las cuales influyeron en la germinación y favorecieron el crecimiento de tallos, hojas y raíces.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

En esta investigación se observó que la germinación de *Epidendrum secundum* fue mejor en todos los medios en la prueba uno con cápsula cerrada., debido a que la semilla tiene menos contacto con el exterior, por lo que hay menos riesgo de contaminación y sufre menos al momento de la desinfección con el cloro. Esto coincide con lo reportado por Seaton y Ramsay (2005), quienes observan que al utilizar la cápsula cerrada no son necesarias las técnicas de esterilización sobre la semilla. La tercera prueba, en la que la semilla se desinfectó directamente con el correcto protocolo de asepsia, los resultados de germinación fueron algo inferiores en la mayoría de los medios, en comparación con la prueba uno. No fue tomada en cuenta la prueba dos pues tuvo un error en la desinfección pues ingresó cloro a la semilla y la prueba en que la semilla perdió fertilidad por la refrigeración.

Para *Oncidium excavatum* la desinfección se realizó sobre semilla, lo cual si logró tener buenos resultados. Esta semilla era más pequeña y débil que *Epidendrum*, considerando que tiene un menor material de reserva, tal como dice Sánchez (2007) (C.P.). Por tanto en el momento de la siembra la manipulación fue más difícil. Se realizaron también tres pruebas más, las cuales no pudieron ser registradas debido a que no hubo germinación. En el primer caso la cápsula que sembramos estuvo inmadura, siendo el resultado consecuente con el reportado por Devlin (1976) que cita que en embriones inmaduros es frecuente el reposo y solo se elimina permitiendo que el embrión llegue a su desarrollo completo. En el segundo caso la semilla dejó de ser viable debido a que la cápsula no fue recolectada a tiempo y se abrió. En la otra prueba la semilla permaneció mucho tiempo en refrigeración y no germinó.

En cuanto a la germinación se pudo obtener que en *Epidendrum secundum* en la prueba uno, el medio de coco (100 %) y el de plátano con MS (86,37 %) obtuvo la mejor germinación pero, el crecimiento en coco se detuvo significativamente a partir del segundo mes. Los otros medios de MS con productos naturales y el coco más plátano verde, consiguió una germinación mayor al 75%. En el testigo (MS) la

germinación fue menor (73,87 %). Estos resultados coinciden con el trabajo de Morel (1974) que observó en *Cattleya* que el agua de coco promueve la división de células epidérmicas originando protocormos, pero según nuestras pruebas no se puede comparar las respuestas a los medios entre los géneros.

En la prueba tres con desinfección de semilla, la germinación mejoró en coco y en plátano verde. Esto puede deberse a que el agua de coco según Roca y Mroginski (1991) contiene auxinas y giberelinas, y citoquininas según Villena y Lala (2002) en su composición las cuales actuaron en la germinación, mejorando el crecimiento de células. En el plátano verde al tener presencia de auxinas y citoquininas (Rodas y Banderas, 2007) cumplen la función de acelerar el desarrollo y el crecimiento en las plántulas pero en la germinación su efecto es negativo según Seaton y Ramsay (2005). Rojas y Ramírez (1993) afirman que en ocasiones, las hormonas determinan efectos similares, pero hay momentos de desarrollo en los que sobre sus propiedades comunes, cada hormona suscita respuestas específicas. Las hormonas parecen ser “reguladoras” en el mantenimiento de ciertas funciones y estructuras, pero varían de acuerdo a los requerimientos de la especie con la que se este trabajando. Según Villena y Lala (2002) la variabilidad en el crecimiento de una plántula a otra está determinada por las dosis de los tratamientos, relacionado con el contenido total de sales, macro y micro nutrientes absorbidos y las necesidades específicas de cada especie. Por esta razón se puede asumir que el comportamiento de cada especie dentro de un mismo género puede ser distinto frente a los tratamientos y en cada fase de desarrollo.

En *Oncidium excavatum* la germinación fue la mejor en el testigo (MS) (83,78%), seguido por coco más MS (81,45%) y en los otros medios formulados con productos naturales y MS, la germinación fue en menor proporción. De acuerdo a los resultados, podemos decir que este género no requiere de adición de productos naturales para la germinación in Vitro; con agua de coco no hay efecto de germinación, lo cual es contrario con Sánchez *et al* (1994) que dice que la germinación de especies de *Oncidium* en medio con agua de coco es positiva para dos de las tres especies que estudiaron.

Banderas y Rodas (2007) obtuvieron los mejores resultados, en plántulas trabajadas con anterioridad en laboratorio, en relación con el crecimiento y enraizamiento en *Oncidium loxense* con Phytamax (ver Anexo III: tabla 3.1) combinado con 150 g de pulpa de banano el cual tiene similar composición que el plátano. Sin embargo nuestra experimentación dio resultados contrarios en *Oncidium excavatum*. Ello puede deberse a que es probable que el plátano o banano, es recomendable para el último replante como lo confirma Arditti (1979), y no para la germinación. Arditti (1977) además señala que existe gran heterogeneidad en cuanto al medio a usarse, algunos medios usados en el cultivo de tejido de orquídeas son complejos que contienen gran cantidad de compuestos y sus concentraciones varían considerablemente entre los medios. En nuestro estudio utilizamos el medio de MS (ver Anexo III: tabla 3.1), con los macroelementos diluidos a la mitad, lo cual pudo influenciar en las variables estudiadas en *Oncidium excavatum* y *Epidendrum secundum*.

No se registró crecimiento de *Epidendrum secundum* en el medio con agua de coco. En la medida uno (cuatro y cinco meses de observación), se demostró superiores resultados en el medio de agua de coco más plátano con MS (1,74 cm) y coco con plátano (1,18 cm). Esto puede deberse a que de acuerdo con Seaton y Ramsay (2005) el plátano es mejor utilizarlo en el crecimiento y no en la germinación; la combinación con agua de coco puede haber sido beneficiosa solo en la germinación. Las condiciones del laboratorio no eran favorables debido a que en el mismo no está destinado solamente a la investigación de micropropagación de orquídeas. Sánchez (2007) (C.P.), dice que el crecimiento en laboratorio de *Epidendrum* en cinco meses es de 2,91 cm trabajando en condiciones favorables, lo cual demuestra que el crecimiento de nuestras plántulas, no fue muy favorable.

Banderas y Rodas (2007) observaron que, al realizar los replantes con frecuencia a los diez meses los mejores resultados. Los replantes efectuados con mayor frecuencia (dos y cuatro meses) presentaron un mayor índice de contaminación y muerte, es decir, mientras menor fue la manipulación y exposición de los explantes con el ambiente exterior mejores fueron los resultados. La frecuencia con la que se realicen los replantes es independiente para cada caso según las exigencias de la especie con la que se trabaje, aunque algunos estudios reportan que replantar cada

dos y cada cuatro meses es lo óptimo. En nuestro estudio, el replante se realizó a los cuatro y cinco meses de germinadas las plántulas, lo cual pudo influir en su tamaño y en la contaminación. En la medida dos del replante (siete y ocho meses de observación) hubo mayor crecimiento en el testigo (MS: 3,57 cm) por poseer todos los nutrientes disponibles en el medio; seguido por coco más plátano (2.92 cm). Sánchez (2007) (C.P.), que trabajó con MS observó un crecimiento óptimo de 4,6 cm en *Epidendrum*, es decir que en trabajo de tesis el crecimiento no fue más o menos positivo.

En el proceso de crecimiento *Oncidium excavatum* demostró que el tratamiento con mejor crecimiento es el testigo (MS) con 2,08 cm (cuatro y cinco meses a partir de su germinación), le continúa coco más MS (1,17 cm), lo que demuestra que el resultado fue muy favorable en comparación con Sánchez *et al* (1994) y Sánchez (2007) (C.P.) que dice que *Oncidium* crece 1,25 cm en este periodo. Los medios de productos naturales sin MS no registraron ningún crecimiento. Entonces podemos decir que el medio natural debe ser añadido al medio mineral para hacer efecto, pero que esto difiere entre las especies. Sánchez *et al.* (1994), dice que el medio de coco y el medio con banana junto con otros químicos es recomendado para la germinación de las semillas de orquídeas de *Oncidium* y no para el crecimiento, propósito que se logra al realizar uno o varios trasplantes a otros medios formulados para este fin. Por tanto decimos, que *Oncidium excavatum* necesita de MS para poder germinar y crecer y los productos naturales como el plátano le ayudan más en la última fase de crecimiento de replante como lo confirma Arditi (1979) y Banderas y Rodas (2007).

En cuanto al crecimiento de hojas en *Epidendrum secundum*, en la medida uno coco más MS obtuvo las plántulas con mayor número de hojas. Esto puede deberse a la presencia de auxinas en el agua de coco (Roca y Mroginski 1991), las cuales estimulan el crecimiento de los ápices de las hojas. En la medida dos el testigo (MS) fue el mejor, debido a la presencia de sustancias favorables para este fin.

En *Oncidium excavatum* plátano con MS, alcanzó más hojas en las pequeñas plantas. El plátano verde, que posee fitohormonas en su composición, actuaron en el crecimiento y alargamiento de las hojas. Esto concuerda con Sánchez *et al* (1994) dice que al utilizar el banano en *Oncidium cucullatum* se da el primer brote de hojas.

El enraizamiento de *Epidendrum secundum* en la medida uno (cuatro y cinco meses de observación), fue constante (una raíz) en los medios del testigo (MS) y en sus combinaciones con coco y plátano, lo cual nos dice que en la aparición de raíces no influyen los productos naturales para ese tiempo. En el replante medida dos (siete y ocho meses de observación) el testigo (MS) y coco más plátano con MS, aumentó en una raíz y en pequeños brotes. En el medio de coco y plátano creció una raíz lo cual puede deberse a la presencia de fitohormonas, presentes en los productos naturales, las cuales permitieron la formación y crecimiento de raíces.

En el enraizamiento de *Oncidium excavatum* el mejor tratamiento fue el de coco con MS que presentó dos raíces, conjeturando que esto se debe a que están presentes las auxinas y giberelinas en el agua de coco (Roca y Mroginski 1991). En el testigo (MS), en MS con plátano y en MS más coco y plátano se obtuvo una raíz. Estos resultados son contrarios a lo que obtuvo Sánchez *et al* (1994) el cual probó en tres especies de *Oncidium* medios con coco y banano y no obtuvo ningún resultado de crecimiento radicular debido a que según estos mismos autores, este proceso metabólico se alcanza con el transplante de plántulas.

La concentración de los productos naturales pudo influir en los resultados de germinación, crecimiento, enraizamiento y número de hojas, debido a que la cantidad de agua de coco utilizada (30ml l^{-1}) fue una nueva prueba en el medio para orquídeas, pues Sánchez *et al* (1994), recomienda utilizar 100 ml l^{-1} y Silva (1972) dice que en orquídeas se usa 150 ml l^{-1} . En el caso del plátano verde (150 g l^{-1}) la concentración coincide con Hurtado y Merino (1988) que dice que este medio es el recomendado para orquídeas.

La contaminación registrada en la investigación de *Epidendrum secundum* fue más baja en cápsula cerrada. Podemos decir coincidiendo con Seaton y Ramsay (2005) que la infección de agentes patógenos en la germinación se debió a que estos fueron introducidos en el momento de la siembra o debido a que la desinfección no fue suficiente para erradicar todos los contaminantes los cuales pudieron quedar encapsulados. En el crecimiento en la medida uno después del segundo mes hubo influencia del ambiente del cuarto de crecimiento que al condensarse ingresó al

frasco (Seaton y Ramsay 2005). Este ambiente estuvo contaminado debido a la presencia de siembras de hongos comestibles. En la medida de replante el riesgo de contaminación de la nueva siembra y el cuarto de crecimiento fueron las causas de la contaminación.

En *Oncidium excavatum* la contaminación se presentó solo en algunos medios de la prueba dos, debido a que las normas de asepsia en la desinfección y siembra no fueron las adecuadas. Esto lo confirma la prueba uno en la cual se realizó un proceso de desinfección muy fuerte lo cual provocó cero contaminación pero además semilla infértil por quemado, que no germinó en plátano verde más MS.

Los medios de productos naturales produjeron en las plántulas del replante color amarillento y luego muerte. Esto se puede deber según Seaton y Ramsay (2005) a la producción de gas etileno (potente hormona vegetal) o a la presencia de CO₂ dentro del frasco debido a la metabolización de la azúcar del plátano (que maduró). Cuando hay acumulación de hormonas o exceso de sales, se observa también una coloración amarilla sobre las hojas y no un verde intenso que es lo normal (Ansaloni 2007)(C.P.). Con esto podemos expresar que el medio de plátano verde y el medio de coco más plátano verde produjo por cualquiera de estas causas color amarillento y posterior muerte en los explantes de replante de *Epidendrum*.

Los productos naturales en *Epidendrum secundum* tuvieron diferentes aportes. Estos no se pueden discutir, debido a que nuestro estudio es pionero en este género. En el medio de agua de coco se obtuvo la mejor germinación, pues este influyó positivamente en la formación de protocormos; pero, la falta de compuestos minerales, detuvo el crecimiento. Es por ello, que la mezcla de MS con agua de coco, si obtuvo buen resultado en germinación y crecimiento en fase inicial y replante. La combinación de plátano y coco con MS fue buena en la germinación y en el crecimiento; esta mezcla sin MS obtuvo germinación pero limitado crecimiento. Esto confirma que estos dos productos naturales son complementarios y demuestran resultados más positivos para las orquídeas. El plátano verde con complejos químicos y sin MS logró buena germinación pero poco crecimiento, lo que confirma lo dicho por Arditi (1979) y Banderas y Rodas (2007), el plátano es positivo en el último replante en crecimiento de tallos y raíces.

La contribución de los medios orgánicos es distinta en cada etapa de desarrollo de las semillas de *Oncidium*. En nuestro estudio con plátano verde no se obtuvo buen resultado en la germinación, ni en las primeras fases de crecimiento de *Oncidium excavatum*, pero si hubo un desarrollo positivo de raíces. Esto es contradictorio con Sánchez *et al* (1994) que dice que los productos orgánicos como el banano son específicos para la germinación y no para el crecimiento de algunas especies de *Oncidium*. Sin embargo en Banderas y Rodas (2007) la aplicación sobre plántulas madres en último replante de 150 g de pulpa de banano obtuvo los mejores resultados para el desarrollo del tallo como de raíces de *Oncidium loxense*. Con agua de coco la germinación fue positiva pero en el crecimiento fue pobre en relación al testigo (MS), lo cual coincide con Sánchez *et al* (1994).

CONCLUSIÓN

En nuestra tesis podemos concluir que a nuestro mejor conocimiento, no se han desarrollado estudios sobre el cultivo de orquídeas del género *Epidendrum*, por lo cual nuestro trabajo es un aporte en el estudio de este género. En cuanto a *Oncidium* nuestros resultados han sido muy positivos comparado con otros estudios y es complementario con el estudio de Banderas y Rodas (2007), para este género. La proveniencia de la semilla es determinante para asegurar la fertilidad de la misma, es mejor si se utiliza semilla recién colectada de invernadero y en cápsula cerrada.

Los productos naturales en *Epidendrum secundum* tuvieron diferentes aportes. En general el agua de coco, que tiene auxinas, giberelinas y citoquininas dentro de su composición, influye positivamente en la formación de protocormos y en el crecimiento en fase inicial y replante. El plátano verde, que tiene auxinas y citoquininas, obtuvo resultados positivos en la formación de hojas y enraizamiento, pero presentó plántulas amarillentas en la segunda medida. Por ello decimos que el testigo (MS) es un medio formulado para el crecimiento de hojas en las siguientes fases de maduración de las plántulas. En el estudio se comprobó que los productos naturales son positivos en la germinación de *Epidendrum* y en el caso del agua de coco más MS en el en el crecimiento.

Por ello concluimos que el medio de cultivo más eficiente para *Epidendrum secundum* es distinto en cada variable. En la germinación son beneficiosos los productos naturales (agua de coco y plátano verde), pero en el medio de agua de coco el crecimiento se detuvo a partir del segundo mes debido a la falta de nutrientes. En el crecimiento de *Epidendrum secundum* en la medida uno (cuatro y cinco meses de observación) el medio de coco con plátano más MS fue el mejor, por lo cual afirmamos que el medio si influyó significativamente en el crecimiento de *E. secundum* en su primera medida. Para la segunda medida (siete y ocho meses de observación) el testigo (MS) logró plántulas más altas y se puede decir que es óptimo para el crecimiento de *E. secundum*. Por tanto el medio también influyó significativamente en el crecimiento del replante. En el número de hojas el MS con coco fue mejor en la observación uno y el testigo (MS) mejoró la variable en la

observación dos. En el enraizamiento es el testigo (MS) y plátano más coco con MS el que obtuvo mayor número. En general el testigo (MS), fue el mejor medio en las variables estudiadas, sin contar con la germinación.

El aporte de los medios orgánicos es distinto en cada etapa de desarrollo de las semillas de *Oncidium excavatum*. En nuestro estudio con plátano verde solo se obtuvo buen número de hojas, puesto que los aportes de plátano son más positivos en el último replante. Con agua de coco el enraizamiento fue mejor, aunque también obtuvo un buen nivel de germinación. Podemos decir entonces, que no es necesario utilizar las combinaciones de MS con productos naturales en esta especie, pues estos no mejoraron la germinación y crecimiento en comparación con el testigo (MS), pero si se optimiza el número de hojas y el enraizamiento.

En *Oncidium excavatum* podemos concluir que el medio de cultivo más eficiente es el testigo (MS) en germinación y crecimiento. Los medios de productos naturales más MS produjeron germinación y crecimiento en menor proporción, por tanto el medio si influyó significativamente en el crecimiento. Los medios de productos naturales no obtuvieron germinación ni crecimiento debido a que las exigencias de la semilla son más especializadas que *Epidendrum*. Para el número de hojas es mejor plátano más MS y en el enraizamiento es coco con MS.

En la composición de los nutrientes del agua de coco podemos decir que los valores obtenidos en el laboratorio de proteínas, carbohidratos y lípidos fueron algo inferiores en relación a los teóricos. La diferencia en los resultados, se debió a que el agua de coco analizada fue muy madura o a que el proceso de secado demasiado prolongado alteró la materia orgánica. Los resultados de proteínas, grasas y carbohidratos son complementarios debido a que de esta manera se obtiene una dieta balanceada, para las plántulas, en este caso.

La adición de agua de coco y plátano verde brinda un aporte complementario en el medio de cultivo, debido a la presencia de fitohormonas que tienen dentro de sus componentes. Estas hormonas vegetales influyeron en la germinación y favorecieron el crecimiento de tallos, raíces y hojas. Los resultados de medios con combinación de coco y plátano son óptimos, pues mejoraron las variables en estudio.

RECOMENDACIONES

Trabajar en un laboratorio destinado solo a la micropropagación de orquídeas, el cual guarde las correctas normas de asepsia.

Publicar todos los estudios en micropropagación de orquídeas pues son muy escasos y se requieren como base informativa para otros estudios.

Realizar análisis específicos de hormonas vegetales en el plátano verde y en el agua de coco para poder validar la presencia de estos productos en estas fuentes naturales.

Probar diferentes concentraciones de los medios formulados con productos naturales para favorecer su densidad y viabilidad, debido a que los 150 gr l⁻¹ de plátano verde, hacen difícil el manejo del medio debido a que es muy denso y que los 30 ml l⁻¹ de agua de coco parecen haber sido una cantidad muy mínima para optimizar las variables en estudio. Esto es necesario debido a que la cantidad de productos vegetales puede determinar un cambio en los resultados de las variables que se estudiaron.

Efectuar nuevos estudios del género *Epidendrum*, teniendo como base inicial nuestra tesis. Utilizar las combinaciones con productos naturales en la germinación y no para la fase de crecimiento de *Epidendrum secundum*.

En *Oncidium excavatum* alguna desinfección provocó quemadura de las semillas, por lo cual recomendamos utilizar la cápsula cerrada. Usar el medio de cultivo MS sin productos naturales que es el mejor, aunque el agua de coco estimula la germinación y la formación de raíces y el plátano verde el crecimiento de hojas.

La cápsula de semilla de orquídea debe ser obtenida de preferencia de invernadero, pues su formación puede ser inducida entre plántulas compatibles, con ello se asegura la fertilidad de la misma y por tanto existe una mayor probabilidad de crecimiento. Además se disminuye la probabilidad de contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

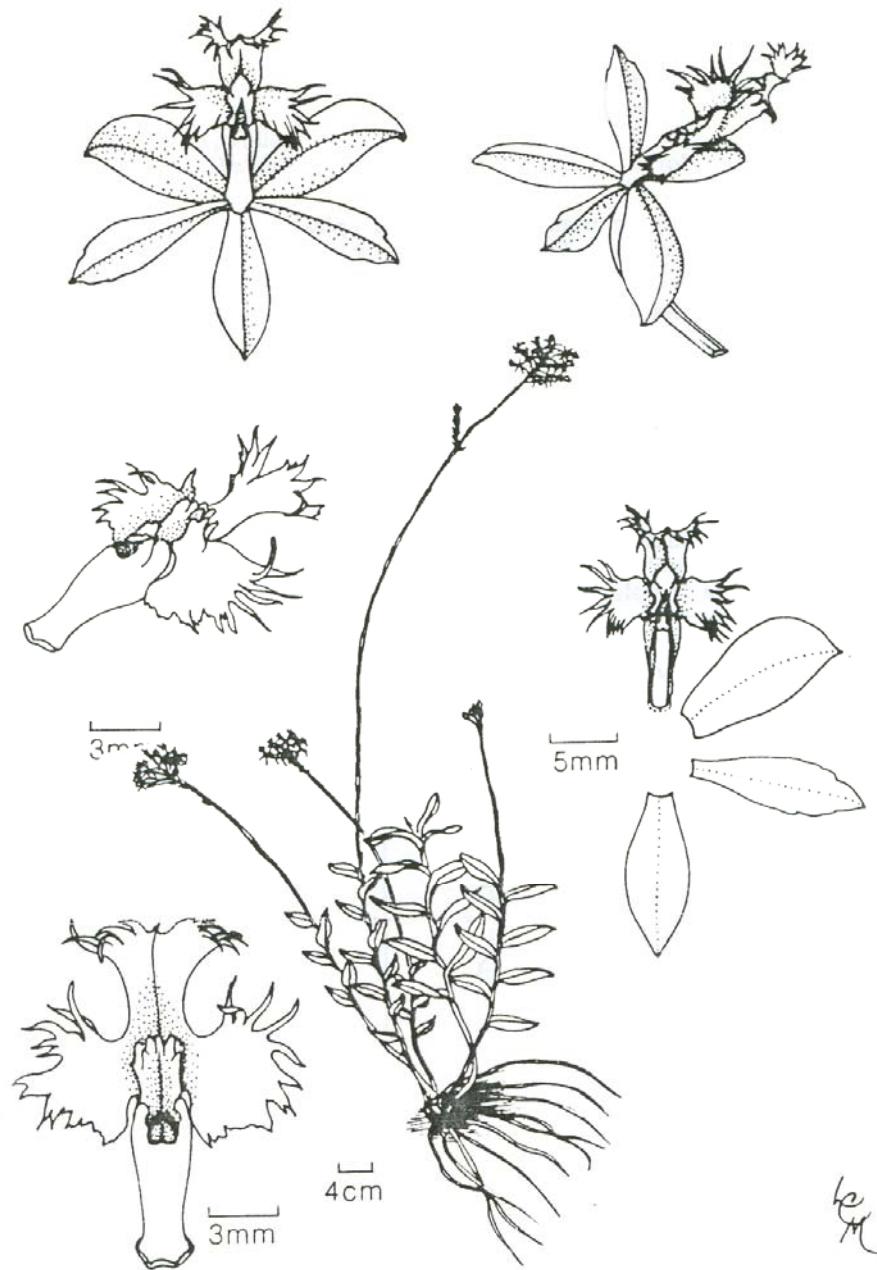
- ARDITTI J. Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev. 33. 1967. 1-97 pp. 1ra Edición.
- ARDITTI J. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture un manual. Vol 1. N.Y. EE.UU. Cornell University Press. 1977. 293 pp. 1ra Edición.
- ARDITTI J. Aspects of the physiology of orchids. Adv. Bot. Res 7. EE. UU. Sin editorial. 1979. 655 pp. 1ra Edición.
- BANDERAS C. RODAS E. Comparación del desarrollo in Vitro de dos especies de orquídeas *Oncidium loxense* y *Cattleyas hibrida*, aplicando distintas concentraciones de banano (*musa*) y leche de maíz (*zea mays*) en medio de cultivo Phytamax a distintas frecuencias de replante. Tesis de Biólogo. Cuenca. Ecuador. Universidad del Azuay. 2007. 90 pp.
- BUSTOS T. Ecuador patria de orquídeas (Loja y Zamora Chinchipe). Loja. Ecuador. Editorial Universidad Técnica Particular de Loja. 2006. 286 pp. 1ra Edición.
- CARRIÓN M. Estudio de la adaptación industrial de la remolacha azucarera en esta zona. Tesis de Doctor en Química Industrial. Cuenca. Ecuador. Universidad de Cuenca. 1968. 119 pp.
- CRONQUIST A. Introducción a la Botánica. México 22 D. F. México Compañía Editorial Continental S. A. México 22 D. F. México. 1971. 848 pp. 2da. Edición
- CUYA M. 1997. Micropropagación de Orquídeas *In-vitro*: documento electrónico fuente de Internet (en línea).
<http://www.lamolina.edu.pe/FACULTAD/Agronomia/horticultura/propagacion/biotecnologia/cuya_resumen.htm>. Consulta: 15 de marzo del 2006
- CLUB PERUANO DE LAS ORQUÍDEAS. 2005. Documento electrónico fuente de Internet (en línea).
<http://www.peruorchids.com/galeria/e/epidendrum/epidendrum.htm>
Consulta en línea: 12 de abril del 2006.
- DA SILVA RAMOS M. A orquídea e sua reprodução pela semente. Sao Paulo. Brasil. Editorial Industria Gráfica Saraiva S. A. Campiñas. 1969. 103 pp. 1ra Edición.
- DEVLIN R. Fisiología Vegetal. Barcelona. España. Ediciones Omega. 1976. 517 pp. 3ra Edición
- DODSON_a C, MÁRMOL P, VÁZQUEZ R, HAMER F, MORA D, ATWOOD J, BENNETT D. Icones Plantarum Tropicarum. Orchids of Ecuador. EE.UU. Editorial The Marie Selby Botanical Garden. St. Lenis Missouri. 1 CD. 1989.
- DODSON_b C. MÁRMOL P. Icones Plantarum Tropicarum. Orchids of Ecuador. Florida. EE.UU. Editorial The Marie Selby Botanical Garden. (s.a.). (s.n). (s.e).
- DODSON_c C. ESCOBAR R. Orquídeas nativas del Ecuador. Volumen 1. Quito. Ecuador. Editorial Colina. (s.a.). 207 pp. 1ra Edición.
- DODSON_d C. Native ecuadorian orchids. Volumen 2. Quito. Ecuador. Soluciones Gráficas D & G Cía Ltda. 2002. 417 pp. 1ra Edición
- DODSON_e C. Native ecuadorian orchids. Volumen 3. Quito. Ecuador. Soluciones Gráficas D & G Cía Ltda. Imprenta Mariscal. 2002. 651 pp. 1ra Edición

- DODSON_f C. Native ecuadorian orchids. Volumen 4. Quito. Ecuador. Soluciones Gráficas D &G Cía Ltda. 2003. 883 pp. 1ra Edición.
- DODSON_g C. Orchid of Ecuador. In.pret. (s.a). (s.n). (s.e.).
- FAHN A. Anatomía Vegetal. Madrid. España. Ediciones Rosario. 1978. 643 pp. 1ra Edición
- HIRTZ A. El país de las orquídeas. terra incognita N° 31. Quito. Ecuador. Imprenta Mariscal. 2004. 48 pp.
- HURTADO D. MERINO M. Cultivo de tejidos vegetales. México, D. F. México. Editorial Trillas. 1988. 232 pp. Primera reimpresión.
- KÖNIGER W. *Oncidium*. Münche. Alemania. Publica H. Königler. Sin Editorial. 2004. 256 pp. 1ra Edición.
- SIGMA CELL CULTURE REAGENTS. EE.UU. List Printed in the EE.UU. Catalogue Price. 1991. 283 pp. (s.e.).
- MERCHÁN F. Cultivo de orquídeas *in-vitro*. Cuenca. Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. (s.a.). 1-20 pp.
- MERCHÁN F. Materiales y equipos para la micropropagación. Cuenca. Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. (s.a.). 1-7 pp.
- MONTES A. Bromatología. Tomo II. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Buenos aires. Argentina. 1969. 716 pp. Ediciones Previas
- MOREL G. Producing virus – free *Cymbidium*. Amer Orchid Soc. Bull. 29. 1960. 497 pp. 1ra Edición.
- MOREL G. Clonal multiplication of orchids. New York. EE.UU. En CI. Withner (ed). The Orchids: scientific studies. Wiley Interseciencie. 1974. 222 pp. (s.e.).
- MORÁN E. Propagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos: Apuntes Teóricos. Cuba. Universidad de Oriente. Departamento de Biología. (s.a.). 150 pp. (s.e.).
- NOBLE M. You can grow orchids. EE.UU. Sin Editorial. 1971. 151 pp. 3ra Edición
- OBSARRAC, S. Orquídeas en su vida. Cuenca. Ecuador. Sin Editorial. 2002. 7 pp. 1ra Edición.
- OSBORNE D. R. VOOGT P. Análisis de los nutrientes de los alimentos. España. Editorial Acribia S. A. 1986. 147 pp. (s.e).
- OCHOA M. El gran libro de las orquídeas. Barcelona. España. Editorial de Vecchi S.A. 2003. 191 pp. 1ra Edición.
- PÉREZ J. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Ediciones Geo. 1988. 155 pp. (s.e.).
- QUIÑONES M. S. MANRIQUE. 2004. Dirección de Biotecnología e Ingeniería Genética: documento electrónico fuente de Internet (en línea). Perú. <<http://www.concytec.gob.pe/investigacion/biotecnologia/orqui.htm>>. Consulta: 16 de marzo del 2006.
- ROCA, W. L. MROGINSKI. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Cali – Colombia CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. 969 pp. 1ra Edición.
- ROJAS M. H. RAMIREZ. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. México. Editorial Limusa. 1993. 55 pp. 2da. Edición

- SÁNCHEZ, E. VÁZQUEZ D. R. AGUILAR. Reproducción de Orquídeas a partir de sus semillas utilizando medios de cultivos orgánicos e inorgánicos. Cuenca. Ecuador. Editorial Talleres del I.I.C.T. 1994. 135 pp. Edición Única
- SÁNCHEZ, E. Orquídeas la Riqueza Escondida. Investigador del Laboratorio "Orquídeas de los Andes". Ecuador. (s.a.). 3 pp. (s.e.).
- STRAUSBURGER E. NOLL F. SHENCK H. SCHIMPER A. Tratado de Botánica. España. Editorial Marín S. A. 1974. 798 pp. 6ta Edición.
- SEATON P. RAMSAY M. Growing Orchids from seeds. Italia. Royal Botanic Gardens, Kew. Editorial Mandatory Printing. 2005. 83 pp. 1ra Edición.
- SILVA W. Cultivo de Orquídeas No Brasil. Sao Paulo. Brasil. Editorial Livraria Novel S.A.. 1972. 96 pp. 2da Edición
- TAPIA I. Aspectos ecológicos de las epífitas en un bosque nublado de las estribaciones noroccidentales de los Andes ecuatorianos. Herbario QCA. Quito-Ecuador. Departamento de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2000. (s.p.).(s.e).
- TINOCO M. Cambios Nutricionales en productos amiláceos: plátano, maíz y patatas al ser sometidos al proceso de fritura. Tesis de Ingeniería en Alimentos. Cuenca. Ecuador. 2002. 99 pp.
- VILLE C. SOLOMON E. MARTIN C. MARTIN D. BERG L. DAVIS P. Biología. México D. F. – México. Editorial Interamericana McGraw – Hill. 1992. 1404 pp. 2da Edición.
- VILLENA P. LALA M. Desarrollo de Protocormos de *Cattleyas maxima* en tres clases de crecimiento utilizando los métodos de Cospers y Murashige y Skoog modificados. Tesis de Ingeniería Agropecuaria. Cuenca. Ecuador. 2002. 100 pp.
- WALTER W. McBEE R. TEMPLE K. Introducción a la Microbiología. México. Editorial Continental S.A. Montana State University. 1980. 409 pp. 1era Edición.

ANEXO I

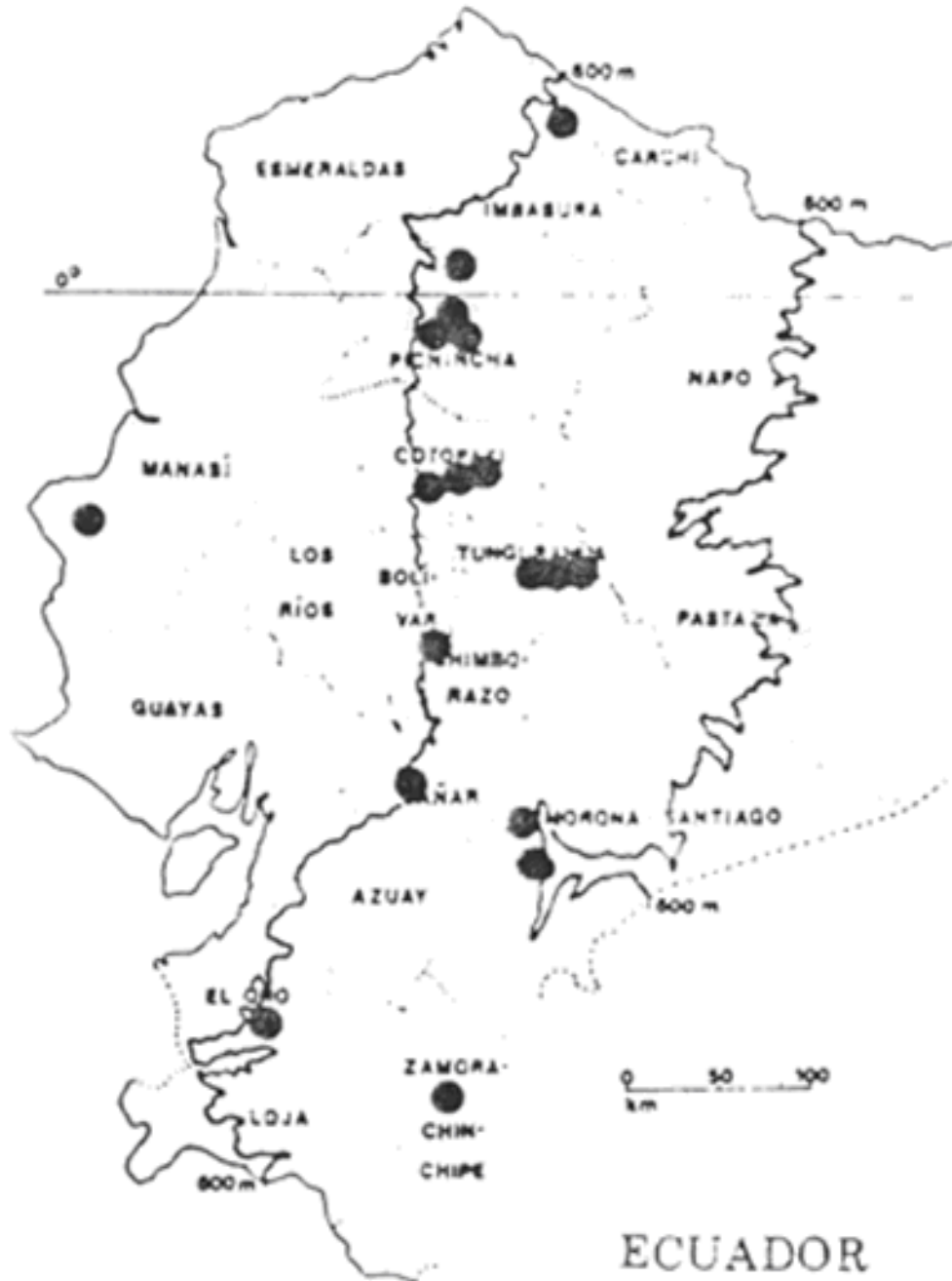
Características de *Epidendrum secundum*



EPIDENDRUM SECUNDUM Jacq.
Text on reverse side.

PLATE 096
Icones Plantarum Tropicarum

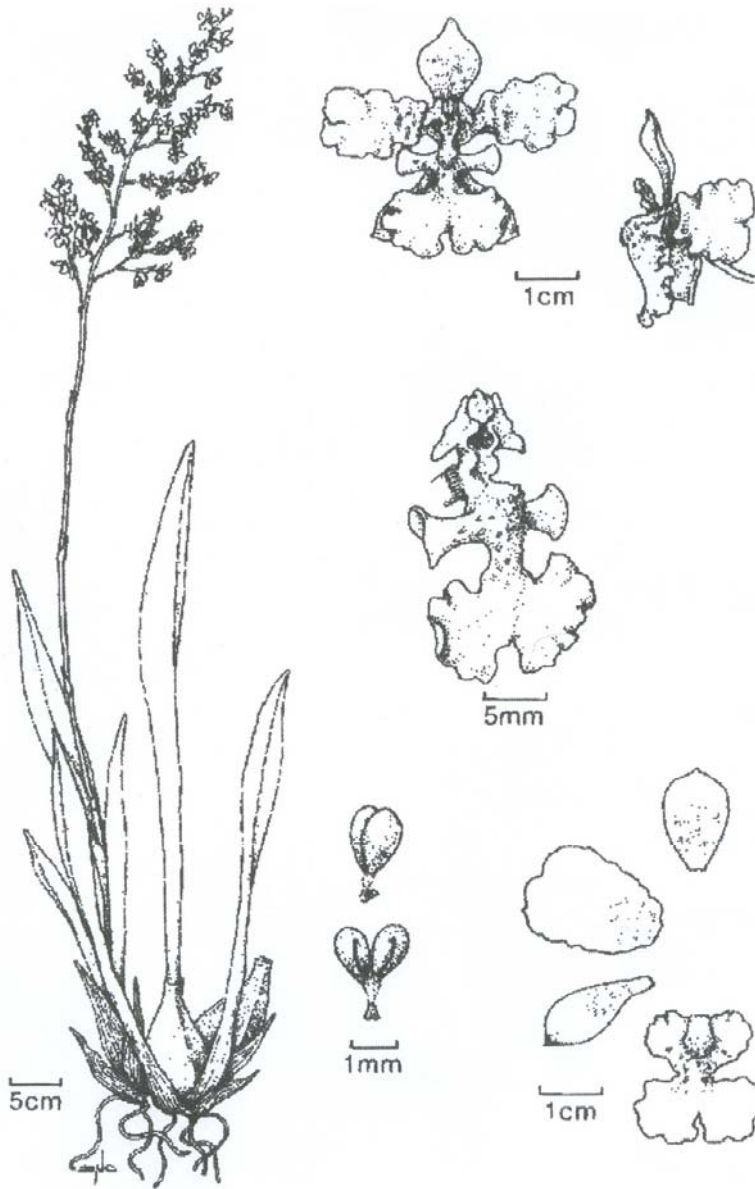
Distribución en el Ecuador de *Epidendrum secundum*



Fuente: Dodson *et al* 1989

ANEXO II

Características de *Oncidium excavatum*

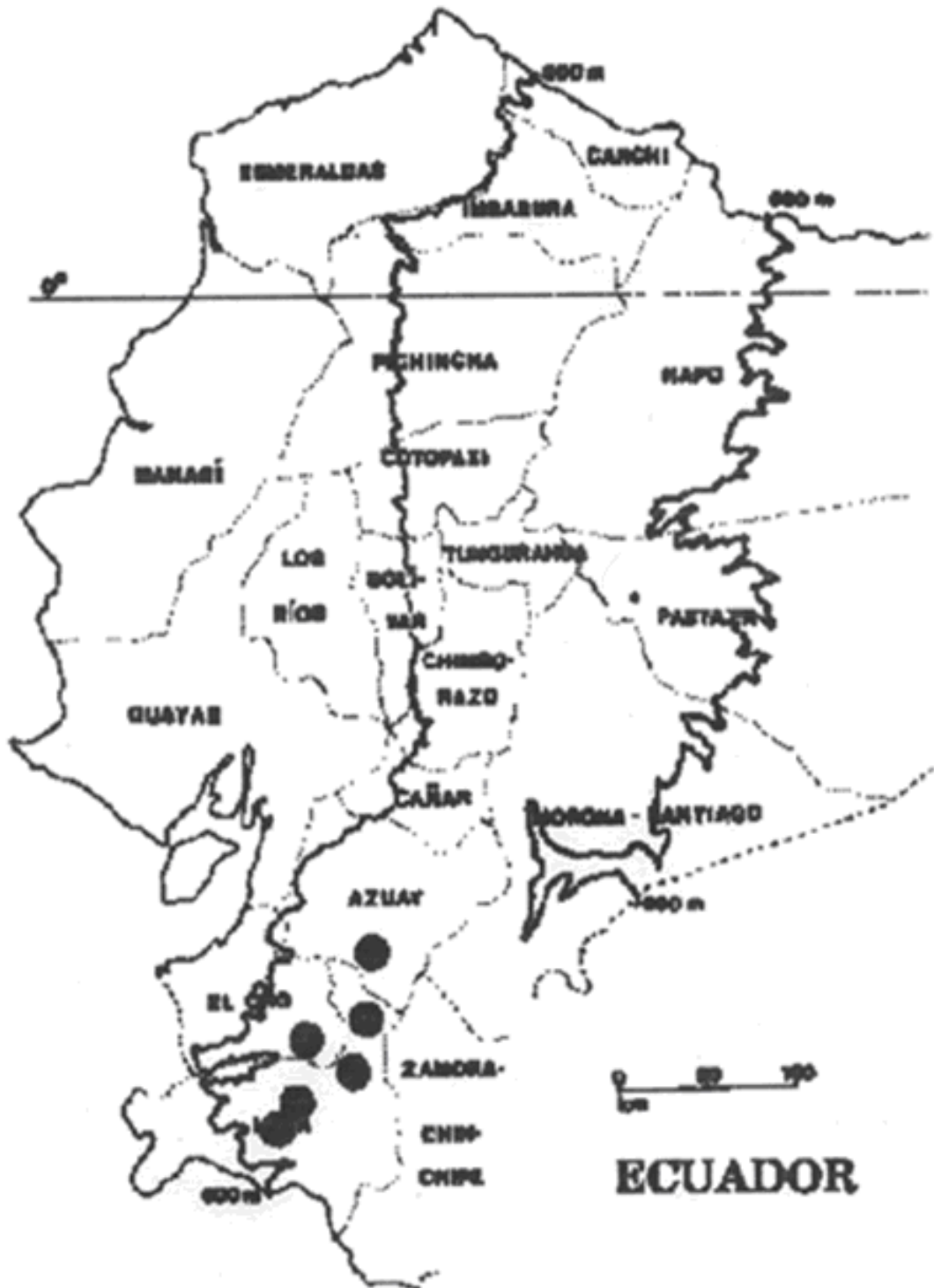


ONCIDIUM EXCAVATUM Lindl.
Text on reverse side

PLATE 474
Icones Plantarum Tropicarum

Fuente: Dodson ^a et al 1989

Distribución en el Ecuador de *Oncidium excavatum*



Fuente: Dodson ^a *et al* 1989

ANEXO III

Tabla 3.1 Mezcla de sales de medios de cultivo (mg l^{-1}) para orquídeas

		FORMULACIÓN		
		Murashige y Skoog (original) *	Murashige y Skoog (utilizado)	Phytamax (recomendado)**
Nomenclatura	Sales	1962		P6797
		mg l^{-1}	mg l^{-1}	mg l^{-1}
Nitrato de amonio	$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	1650	825	825
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	0	0
Ácido bórico	H_3BO_4	6.3	6.2	3.1
Cloruro de calcio	Ca Cl_2	440	220	0
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0	0	0
Nitrato de sodio	NaNO_3	0	0	0
Cloruro de cobalto	Co Cl_2	0.025	0.5025	0.0125
Sulfato ferroso	Fe SO_4	27.8	27.8	27.85
Sulfato de magnesio	MgSO_4	370	185	90.35
Sulfato de manganeso	MnSO_4	16.9	22.3	8.45
Ioduro de potasio	KI	0.83	0.83	0.415
Nitrato de potasio	KNO_3	1900	950	950
Fosfato de potasio	$\text{K}_2 \text{PO}_4$	170	85	85
Sal sódica de etilen dinitril tetracetato	EDTA	37.3	37.3	27.85
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4$	0.25	0.25	0.0125
Sulfato de zinc	ZnSO_4	8.6	8.6	5.3
MES (buffer)		0	0	1000

*Fuente: Hurtado y Merino 1988.

** Fuente: Sigma Cell Culture Reagents 1991.

Tiamine	10	mg l^{-1}
A..		
Nicotínico	5	mg l^{-1}
Mioinositol	100	mg l^{-1}
Sacarosa	20	gramos
Agua	aforar a 1000 cm^3	
Agar	6	gramos
pH	5.5	5.6
Plátano verde	150	gr l^{-1}
Agua de coco	30	ml l^{-1}

Tabla 3.2 Algunos componentes orgánicos del agua de coco

Aminoácidos

Aspartico, glutámico
 Serina, aminobutírico
 Asparagina, Glicina
 β - Alanina, Treonina
 Histidina, Glutamina
 Arginina, Lisina
 Valina, Metionina
 Tirosina, Prolina
 Homoserina
 Fenilalanina
 Hidroxiprolina

Otros compuestos nitrogenados

Amonio, Etanolamina
 Dihidroxifenilalanina

Ácidos orgánicos

Shikímico, quínico
 Pirrolidona – carboxílico
 Succínico, málico
 Cítrico y desconocidos

Azúcares

Sacarosa, Glucosa
 Fructuosa

Alcoholes de azúcar

Sorbitol

m- Inositol
 Siloinositol

Vitaminas

Ácido nicotínico
 Ácido pantoténico
 Biotina, Riboflavina
 Ácido fólico
 Tiamina
 Piridoxina
 Ácido ascórbico

Sustancias de crecimiento

Auxinas
 Giberelinas
 1, 3 – Difenilurea
 Zeatina
 Glucósido de zeatina
 Ribósido de zeatina

Otros

ARN – Polimerasa
 Uracilo, Adenina
 Leucoantocianinas
 Fosfatasa ácida
 Diastasa
 Deshidrogenasa
 Peroxidasa
 Catalasa

Fuente: Roca y Mroginski 1991

ANEXO IV

TEST A POSTERIORI DE SCHEFFÉ

Análisis de Medidas Crecimiento en cm. de la Variable Altura vs. Tratamiento de *Epidendrum secundum* al cabo de 4 y 5 meses

Tabla 4.1 Test Scheffé en la primera medida de *Epidendrum secundum*

Scheffe test; variable EPIDENDR (new.sta)				
GENERAL MANOVA		Homogeneous Groups, alpha=,05 MAIN EFFECT: MEDIO		
MEDIO	Mean	1	2	3
PLAT {5}	,400000	xxxx		
MSPLATA {4}	,455000	xxxx		
PLATCOCO {6}	1,130000		xxxx	
MSCOCO {2}	1,145000		xxxx	xxxx
MS {1}	1,180000		xxxx	xxxx
MSCOPL {3}	1,740000			xxxx

Análisis de Medidas de Replante en cm. de la Variable Crecimiento vs. Tratamiento de *Epidendrum secundum* al cabo de 7 y 8 meses

Tabla 4.2 Test Scheffé en la segunda medida de *Epidendrum secundum*

Scheffe test; variable SEGUNDO (new.sta)				
GENERAL MANOVA		Homogeneous Groups, alpha=,05 MAIN EFFECT: MEDIO		
MEDIO	Mean	1	2	3
PLATCOCO {6}	1,495000	xxxx		
PLAT {5}	1,510000	xxxx		
MSPLATA {4}	1,560000	xxxx		
MSCOCO {2}	2,470000	xxxx	xxxx	
MSCOPL {3}	2,920000		xxxx	xxxx
MS {1}	3,570000			xxxx

**Análisis de Medidas Crecimiento en cm. de la Variable Altura vs. Tratamiento
de *Oncidium excavatum* al cabo de 4 y 5 meses**

Tabla 4.3 Test Scheffé en la primera medida de *Oncidium excavatum*

Scheffe test; variable ONCID (new.sta)			
GENERAL MANOVA		Homogeneous Groups, alpha=,05 MAIN EFFECT: MEDIO	
MEDIO	Mean	1	2
PLATCOCO {6}	0,000000	xxxx	
PLAT {5}	0,000000	xxxx	
MSCOPL {3}	,670000	xxxx	xxxx
MSPLATA {4}	,955000	xxxx	xxxx
MSCOCO {2}	1,170000	xxxx	xxxx
MS {1}	2,080000		xxxx

ANEXO V

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

PLÁTANO VERDE

Proteínas (Determinación de nitrógeno total)

Método del azul del Indofenol

Reactivos:

- Solución de Selenio

4,2584 g de dióxido de selenio al 99% en 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y aforar a un litro.

- Medio de solución básico

32 g de hidróxido de sodio y 56 g de tartrato de sodio y potasio y aforar a un litro.

- Hipoclorito de sodio al 30%

-Agente de salicilato

80gr de salicilato de sodio y 0,7 g de nitro prusiato de sodio, aforar a un litro.

- Solución de ácido sulfúrico

50 cm³ de ácido sulfúrico concentrado, aforar a un litro.

- Solución madre de nitrógeno 1000 ppm

4,714 g de sulfato de amonio, aforar a 1 litro.

- Peróxido de hidrógeno al 30%

a) Extracción de la muestra

Se pesa de 0,1 a 0,2 g de muestra desecada, se la coloca en el tubo Kjeldahi. Se añade 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, 2 ml de solución de selenio y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (se debe tener la precaución de colocar los tubos en la base apropiada con un poco de agua para evitar que el ácido se caliente y se derrame). Y se procede a la extracción.

La destrucción debe seguirse hasta que la solución pierda totalmente el color:

Destrucción previa: 30 minutos a 90 – 100 °C

Destrucción: 2 horas aproximadamente a 380 – 400 °C

Después de esto se deja enfriar completamente y se afora con agua destilada a 100 cm³ (se afora poco a poco y mezclando bien las soluciones). Las soluciones se pasan a un matraz.

Para la curva de calibración se debe preparar los patrones de Nitrógeno:

De la solución madre de nitrógeno (1000 ppm) se toma 1, 2, 3, 4, 5 cm³ y se afora con solución de ácido sulfúrico a 100 cm³ obteniendo concentraciones de 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50ppm respectivamente.

b) Determinación

La muestra, el blanco y los patrones se trabajan por igual.

En un matraz se coloca 1 cm³ de solución de muestra, 6 cm³ de medio de disolución básico, 4,2 cm³ de hipoclorito y 4,2 cm³ de salicilato.

Se colocan en baño maría a 37 °C por 15 minutos hasta que se desarrolle el color (azul), luego se lee la absorbancia de cada uno de ellos en un espectrofotómetro a 654, 4 nm.

Fórmula:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{\text{ppm}(\text{leídos}) * 6.25}{10}$$

(Tinoco 2002).

Carbohidratos utilizables

Método manual de la Antrona de Glegg

El método de antrona se basa en la capacidad que tienen algunos azúcares en deshidratarse al estar en contacto con el ácido sulfúrico y que en presencia de esta forman compuestos de color azul.

Reactivos:

- Ácido perclórico al 52%
- Ácido sulfúrico al 69%
- Reactivo de la antrona al 0,1% (9,10 dihidro – 9 – oxoantraceno)
- Solución patrón de glucosa (1000 ppm)
- Solución patrón de glucosa diluida (50, 100, 200 ppm)

a) Extracción de la muestra

- Pesar 1 g de muestra desecada o 2.5 g de muestra húmeda conteniendo 60 – 300 mg de carbohidratos utilizable total.
- Transferir cuantitativamente a una probeta graduada de 100 ml provista de tapón.
- Añadir 10 ml de agua y agitar con una varilla para dispersar completamente la muestra.

- Añadir 13 ml de reactivo de ácido perclórico al 52%.
- Agitar frecuentemente con la varilla durante 20 minutos como mínimo.
- Lavar la varilla con agua y diluir el contenido a 100 ml.
- Mezclar y filtrar hacia un matraz volumétrico de 250 ml.
- Lavar la probeta con agua y transferir los lavados al matraz volumétrico.
- Diluir hasta la señal de enrase con agua y mezclar perfectamente.

b) Determinación

- Diluir 10 ml de extracto de muestra extraída a 100 ml con agua destilada.
- Pipetear 1 ml de filtrado diluido a un tubo de ensayo.
- Pipetear como blanco 1 ml de agua y de igual manera con las soluciones patrones previamente separadas.
- Pipetear rápidamente a todos los tubos 5 ml de reactivo de antrona recientemente preparado. Tapar los tubos y mezclar perfectamente.
- Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 12 a 15 minutos para que desarrolle color.
- Una vez frías las muestras, transferir las soluciones a cubetas de vidrio de 1cm de camino óptico y leer la absorbancia de la muestra y patrones de 626,0 nm frente al blanco preparado con los reactivos.

Fórmula:

$$\frac{ppm(leídos) * 10 * 250}{10000(pesomuestra)} = \% \text{ Hidratos de carbono}$$

Nota: los patrones de glucosa y la antrona se deben preparar para el análisis (Tinoco 2002).

Lípidos

Método de Soxhlet *

Reactivos:

- Éter de petróleo.

a) Determinación

- Se recomienda trabajar con la muestra desecada.

- Transferir el residuo seco a un cartucho de extracción.

- Limpiar la cápsula de desecación con pequeños copos de algodón humedecidos con éter de petróleo y transferir los copos al cartucho.

- Colocar el cartucho en el extractor y conectar un balón tarado conteniendo aproximadamente 100 ml de éter. Conectar el extractor a un condensador Soxhlet.

- Extraer la muestra, bajo reflujo, sobre baño de agua o de vapor durante 2-3 horas.

- Desecar el balón conteniendo el residuo de grasa en estufa de aire a 100 °C hasta eliminar las últimas trazas de éter.

Cálculo:

Peso de la muestra antes de la desecación: W1

Peso del balón sin grasa: W2

Peso del balón con grasa W3

$$\{(W3 - W2)/W1\} * 100 = \text{grasa extraíble \%}.$$

$$\left[\frac{(W3 - W2)}{W1} \right] * 100 = \% \text{ grasa extraíble}$$

* (Tinoco 2002: Método adecuado a las condiciones de laboratorio).

Humedad

- Desecar la cápsula vacía en la estufa durante 15 minutos, enfriar en el desecador y pesar.

- Colocar 5 g de muestra en cápsula y pesarla.

- Desecar hasta peso constante.

- Enfriar la cápsula y pesar nuevamente una vez que ya este fría.

Cálculos:

M 1 cápsula vacía

M 2 cápsula + muestra

M 3 cápsula + muestra desecada

$$\left[\frac{M2 - M3}{M2 - M1} \right] * 100 = \% \text{ Humedad}$$

(Tinoco 2002).

Cenizas

Desecar 5 g de muestra.

Esta muestra desecada será calcinada en una mufla a 400 °C aproximadamente por dos horas o hasta obtener cenizas de color gris claro.

Nota: si se desea obtener las cenizas completamente blancas se puede adicionar unas gotas de ácido nítrico.

Cálculo:

M 1 cápsula vacía

M 2 cápsula + muestra

M 3 cápsula + muestra calcinada

$$\left[\frac{M3 - M1}{M2 - M1} \right] * 100 = \% \text{ Cenizas}$$

(Tinoco 2002).

AGUA DE COCO

Proteína

Método de Kjeldhal

A partir de la lectura de los patrones se prepara la curva de calibración, poniendo en ordenadas la lectura de absorbancia y en abscisas la concentración de los patrones, así:

Tabla. 5.1 Lectura.

PPM	Absorbancia
0	0
10	0,032
30	0,11
50	0,23
70	0,347
90	0,363
120	0,718

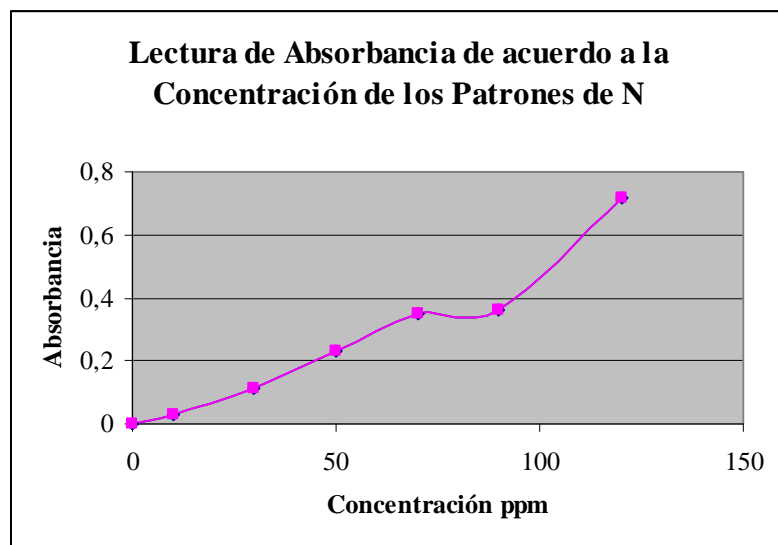


Figura 5.1 Lectura de absorbancia de patrones de N.

A partir de la curva anterior se obtuvo la siguiente gráfica de regresión lineal:

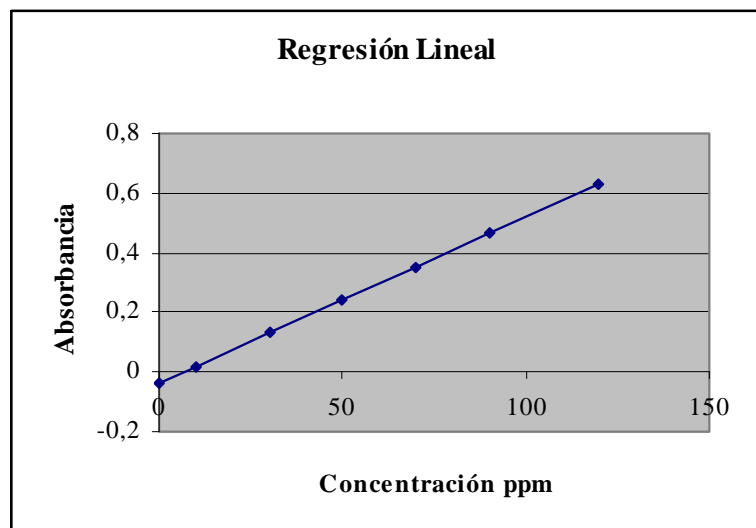


Figura 5.2 Regresión lineal

Para obtener la concentración de las muestras nos basamos en la curva de calibración de los patrones de 0 a 30 ppm (debido a que es en esta zona en donde están los valores de absorbancia de las muestras) en la cual a base de la lectura del espectrofotómetro, se obtiene la concentración en ppm. Para determinar el valor real de cada muestra de acuerdo a la lectura del espectro, se resta el valor correspondiente al blanco, que tiene el color de los reactivos del espectro de las muestras.

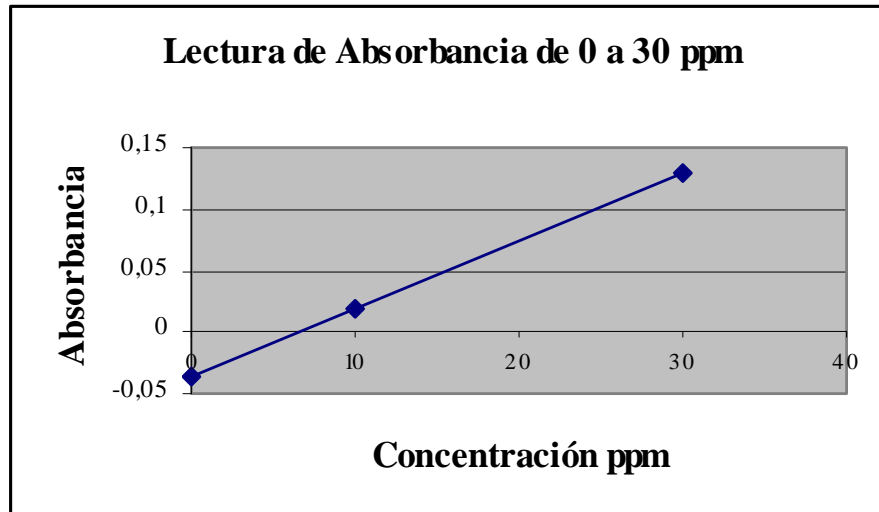


Figura 5.2 Lectura de espectrofotómetro

Tabla 5.2 Lectura corregida

Muestra	Absorbancia	Absor. real
1	0,07	0,059
2	0,062	0,051
3	0,064	0,053
4	0,045	0,034
Blanco	0,011	

A partir de ello se puede determinar la concentración de las muestras en función a los patrones de concentración de N. En la gráfica se coloca el valor de absorbancia de la muestra en las ordenadas hasta la curva de calibración y de allí con una perpendicular se obtiene el valor en la concentración en ppm en las abscisas.

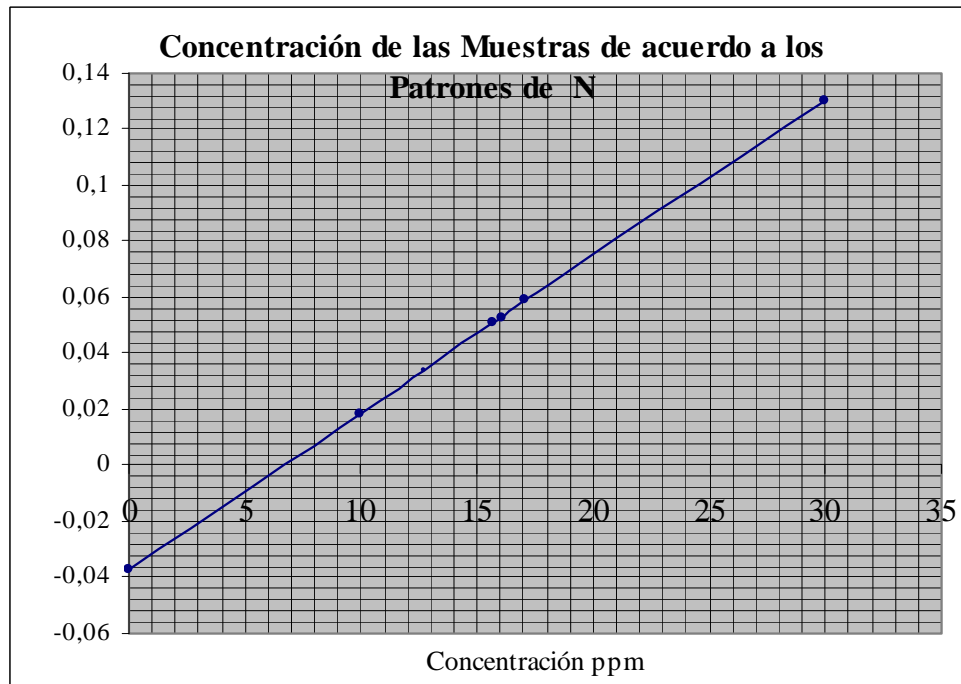


Figura 5.3 Concentración de muestras

Tabla 5.3 Absorbancia

ppm	Absorbancia
0	-0,036886
10	0,0187406
30	0,129995

Tabla 5.4 Absorbancia 1

ppm	Absorbancia
0	-0,036886
10	0,0187406
12,7	0,034
15,7	0,051
16,05	0,053
17,1	0,059
30	0,129995

Para determinar la cantidad de Nitrógeno en 100 cm^3 de aforo se calcula así:

$$N \text{ en } 100\text{cm}^3 = \frac{\text{ppm} * 100}{1000000}$$

Con ello se obtiene que la cantidad de Nitrógeno en las muestras es:

Tabla 5.5 Cantidad de N en 100 cm^3

PPM	Absorbancia	N en 100cc
17,1	0,059	0,00171
16,05	0,053	0,001605
15,5	0,051	0,00155
12,5	0,034	0,00125

Para obtener el porcentaje de Nitrógeno de la muestra, se multiplica por 100 y se divide para la cantidad de muestra, así:

$$\% N = \frac{N * 100}{0,5g}$$

Y finalmente para obtener el porcentaje de proteína se multiplica este último valor por 6,25 que la relación de N a proteína en vegetales.

Tabla 5.6 Porcentaje de proteína

PPM	N en 100cc	% de N en muestra	% Proteína	
17,1	0,00171	0,342	2,1375	
16,05	0,001605	0,321	2,00625	
15,7	0,00157	0,314	1,9625	
12,7	0,00127	0,254	1,5875	
Promedio	15,3875	0,00153875	0,30775	1,9234375

La cantidad de proteína en 100 g de materia seca es de 1.923 g.

El porcentaje de proteína en el agua de coco, considerando la humedad de 95,29% es:

$$\frac{1,923 * 4,71}{100} = 0,09$$

$$100$$

(Carrión, 1968).

Lípidos

Método de Soxhlet

La determinación se realiza por diferencia de peso de la muestra, luego de extraer la grasa en un equipo Soxhlet. Para calcular la cantidad de grasa de la muestra de coco, se realizó lo siguiente:

Muestra

Peso de la muestra antes de la desecación: 5,0046 g.

Peso del balón de 250 ml sin grasa: 116,1856 g.

Peso del balón de 250 ml con grasa: 116,2452 g.

$$\{(116,24.52 \text{ g} - 116,1856 \text{ g}) / 5,0046 \text{ g}\} * 100 = \% \text{grasa extraíble}$$

$$\left[\frac{(0,0596)}{5,0046} \right] * 100 = 1,1909 \% \text{ grasa extraíble}$$

El porcentaje obtenido de grasa en la materia seca hay que relacionarle a 100 de agua de coco, considerando que esta tiene una humedad de 95.29 %:

$$\frac{1,1909 * 4,71}{100} = 0,056$$

Este último valor corresponde al porcentaje de grasa en el agua de coco.

En esta prueba se obtiene un resultado algo inferior a lo que da la literatura y es lo más cercano a los datos reales (Montes, 1969).

Hidratos de carbono**Método Fehling con hidrólisis ácida**

Calculo del factor de fehling:

$$\begin{array}{ll} 100 \text{ cm}^3 \text{ sol glucosa} & 0,5 \text{ g de glucosa} \\ 10 \text{ cm}^3 \text{ sol glucosa} & 0,05 \text{ g de glucosa} \end{array}$$

10 cm³ de solución de Fehling deberían ser reducidos por 0.05 g de glucosa contenidos en 10 cm³ de solución de glucosa; 8.6 ml de glucosa para reducir 10ml de reactivo de Fehling, por tanto:

$$\begin{array}{ll} 10 \text{ ml} & 0,05\text{ml} \\ 8,6 \text{ ml} & x = 0,043\text{g de glucosa} \end{array}$$

Cálculos de la muestra:

Peso de la muestra = 10 g (10 cm³).

Se aforaron a 100 ml con agua destilada.

Volumen de filtrado empleado (en precipitado rojizo) = 13,2 ml

$$\begin{array}{ll} 13,2 \text{ ml} & 0,043 \text{ g de glucosa} \\ 100 \text{ ml} & x = 0,3257 \text{ g de glucosa} \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} 10 \text{ ml de muestra} & 0,3257 \text{ g de glucosa} \\ 100 \text{ ml} & x = 3,257 \text{ g de glucosa} \end{array}$$

Factor de conversión de glucosa a almidón: 0,9

Hidratos de carbono expresados como almidón =

$$3,257 \text{ g} \times 0,9 = 2,93 \text{ \% (p/p)}$$

Los valores de azúcares totales son ligeramente menores de los teóricos debido al grado de madurez o al tipo de coco (Osborne y Voogt 1986).

Humedad

Para determinar la cantidad de materia seca se realizó lo siguiente:

Cálculos:

$$P0 = 534,5 \text{ ml.}$$

$$P 1 \text{ cápsula vacía} = 151,0947 \text{ g.}$$

$$P 2 \text{ cápsula + muestra desecada} = 176,2869 \text{ g.}$$

$$\text{Peso de materia seca: } 25,1922 \text{ g.}$$

$$\text{Peso de agua evaporada} = 509,31 \text{ g.}$$

$$P2 - P1 = 25,1922 \text{ g.}$$

$$P0 - \text{Peso de materia seca} = 509,31 \text{ g.}$$

$$\% \text{ humedad} = \frac{509,31 \text{ g}}{534,5 \text{ g}} * 100$$

$$\% \text{ humedad} = 95,29$$