

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS



“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA

MICROPROPAGACIÓN DE MONJA BLANCA

(Lycaste skinneri var. alba)

HENRY ESTUARDO GONZÁLEZ CUCUL

CARNET: 9240020

GUATEMALA, NOVIEMBRE DEL 2002.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE MONJA BLANCA
(Lycaste skinneri var. alba)

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

HENRY ESTUARDO GONZÁLEZ CUCUL

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRÓNOMO
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DEL 2002.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. M.V. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. EDGAR OSWALDO FRANCO RIVERA
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. WALTER ESTUARDO GARCIA TELLO
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. MANUEL DE JESÚS MARTINEZ OVALLE
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. ERBERTO RAUL ALFARO ORTIZ
VOCAL CUARTO	Br. WENER ARMANDO OCHOA OROZCO
VOCAL QUINTO	Br. AXEL AURELIANO HERRERA PEREZ
SECRETARIO	Ing. Agr. EDIL RENE RODRÍGUEZ QUEZADA

Guatemala, Noviembre del 2002

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señores representantes:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**"EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE
MONJA BLANCA (Lycaste skinneri var. alba)**

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo de ustedes.

Atentamente,

Henry Estuardo González Cucul
Carnet 9240020

ACTO QUE DEDICO**A:****DIOS:** Padre bondadoso, creador de la vida.**MI MADRE:** Martina Cucul
A la noble mujer que no solo me dio la vida,
sino que también me inculcó las primeras letras y el
amor a la naturaleza.**MI PADRE** Haroldo Enrique González Gómez
Con respeto.**MI HERMANA:** Martha Karola
Como un ejemplo de lucha y aspiración.**MIS AMIGOS:** Especialmente Patrick Fox. Recuerdo de las
experiencias compartidas y muestras de amistad.**MI FAMILIA:** Respetuosamente.

TESIS QUE DEDICO**A:**

GUATEMALA

Al hombre del campo que ha dedicado su vida para sostener a su familia en la que por ellos sufren y con ellos luchan, por el cual deben tener una oportunidad.

SAN PEDRO CARCHA, ALTA VERAPAZ, la tierra que me vio nacer.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

CENTRO UNIVERSITARIO DEL NORTE -CUNOR-

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS -ICTA-

INSTITUTO NORMAL MIXTO DEL NORTE "EMILIO ROSALES PONCE,
COBAN, ALTA VERAPAZ.

INSTITUTO NACIONAL EXPERIMENTAL DE EDUCACIÓN BÁSICA,
SAN PEDRO CARCHA, ALTA VERAPAZ.

TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON A MI FORMACIÓN

AGRADECIMIENTO**A:****MIS ASESORES**

Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera
Ing. Agr. Héctor Alfredo Sagastume Mena

Por su valioso aporte, en la orientación de la investigación y a su entrega para la realización del presente trabajo.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS -ICTA-

Por el apoyo y recurso invertido para la realización de la investigación.

A las personas que de una u otra manera colaboraron con la realización de la presente tesis.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS ix

3.1.5	Asepsia	30
3.2	Marco Referencial	31
3.2.1	Investigaciones en cultivo de tejidos vegetales en orquídeas	31
4.	OBJETIVOS	36
5.	HIPÓTESIS	37
6.	METODOLOGÍA	38
6.1	Localización del experimento	38
6.2	Manejo del experimento	38
6.2.1	Preparación del medio basal	38
6.2.2	pH	38
6.2.3	Preparación de medios de cultivo	38
6.2.4	Esterilización del utensilio, cristalería y medios de cultivo	39
6.2.5	Procedimiento para la siembra	39
6.2.5.1	Selección de material	40
6.2.5.2	Proceso de siembra de explantes	40
6.2.5.3	Condiciones de incubación	40
6.2.6	Medición de las variables de respuesta	40
6.2.6.1	Número de brotes	40
6.2.6.2	Tamaño de brotes	41
6.2.7	Diseño experimental	41
6.2.8	Factores y niveles	41
6.2.8.1	Medios de cultivo	41
6.2.8.2	Regulador del crecimiento	41
6.2.8.3	Niveles de cada regulador de crecimiento en cada medio	42
6.2.9	Aleatorización	42
6.2.10	Modelo estadístico.....	42
6.2.11	Unidad experimental	43
6.2.12	Tratamientos	43
6.3	Análisis de la información	45
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1	Número de brotes a los 20 días después de la siembra.. ..	46
7.1.1	Número de brotes según interacción medio de cultivo, por regulador del crecimiento, por nivel a los 20 días después de la siembra... ..	47
7.2	Número de brotes a los 35 días después de la siembra . ..	50
7.2.1	Número de brotes según interacción medio de cultivo, por regulador del crecimiento, por nivel a los 35 días después de la siembra	51
7.3	Número de brotes a los 50 días después de la siembra. ..	54
7.3.1	Número de brotes según interacción medio de cultivo, por regulador del crecimiento, por nivel a los 50 días después de la siembra	55
7.4	Número de brotes a los 65 días después de la siembra ..	58
7.4.1	Número de brotes según interacción medio de cultivo, por regulador del crecimiento, por nivel a los 65 días después de la siembra	59
7.5	Número de brotes a los 80 días después de la siembra ..	62
7.5.1	Número de brotes según interacción medio de	

	cultivo, por regulador del crecimiento, por nivel a los 80 días después de la siembra	63
7.6	Altura de brotes a los 80 días después de la siembra ..	66
7.6.1	Altura de brotes según interacción medio de cultivo, por regulador del crecimiento, por nivel a los 80 días después de la siembra	67
8.	CONCLUSIONES	73
9.	RECOMENDACIONES	74
10.	BIBLIOGRAFIA.....	75
11.	APÉNDICE	79

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1	Resultados obtenidos de la investigación realizada para la germinación y formación de protocormos después de sembradas las semillas de orquídeas	35
CUADRO 2	Tratamientos utilizados para el estudio de la respuesta a la micropropagación de Monja Blanca en el medio basal MS y Morel en combinación con tres diferentes reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones	44
CUADRO 3	Análisis de varianza de la variable número de brotes a Los 20 días	47
CUADRO 4	Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 20 días	48
CUADRO 5	Análisis de varianza de la variable número de brotes a Los 35 días	51
CUADRO 6	Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios	

de Número de brotes para cada tratamiento, a los 35 días	52
CUADRO 7 Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 50 días	55
CUADRO 8 Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 50 días	56
CUADRO 9 Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 65 días	59
CUADRO 10 Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 65 días	60
CUADRO 11 Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 80 días	62
CUADRO 12 Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 80 días	64
CUADRO 13 Resumen de promedios de las cinco lecturas sobre el número de brotes	66
CUADRO 14 Análisis de varianza de la variable altura de brotes a los 80 días	67
CUADRO 15 Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de altura de brotes para cada tratamiento, a los 80 días	68
CUADRO 16 Composición química del medio de cultivo Murashige y Skoog 1962) y el medio Morel (1965 ^a).	80
CUADRO 17 Datos de la primera lectura número de brotes a los 15 días después de la siembra	81
CUADRO 18 Datos de la segunda lectura número de brotes a los 35	

	12
días después de la siembra	82
CUADRO 19 Datos de la tercera lectura número de brotes a los 50	
días después de la siembra	83
CUADRO 20 Datos de la cuarta lectura número de brotes a los 65	
días después de la siembra	84
CUADRO 21 Datos de la segunda lectura número de brotes a los 80	
días después de la siembra	85
CUADRO 22 Datos de la segunda lectura altura de brotes a los 80	
días después de la siembra	86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Fases del desarrollo de plántulas de orquídeas mostrando dos géneros diferentes	9
FIGURA 2 Algunas modificaciones de raíces presentes en las orquídeas	11
FIGURA 3 Algunos tipos de pseudobulbos presentes en las orquídeas....	12

FIGURA 4	Algunos tipos de hojas comunes presentes en las orquídeas..	13
FIGURA 5	Simetría bilateral presente en casi todas las orquídeas ...	14
FIGURA 6	Frutos de algunas orquídeas	15
FIGURA 7	Diferentes tipos de semillas de orquídeas mostrando los componentes básicos: testa y embrión	15
FIGURA 8	Número de brotes obtenidos con el medio Morel, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 20 días después de la siembra	49
FIGURA 9	Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 20 días después de la siembra	50
FIGURA 10	Número de brotes obtenidos con el medio Morel, según Regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 35 días después de la siembra	53
FIGURA 11	Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 35 días después de la siembra	54
FIGURA 12	Número de brotes obtenidos con el medio Morel, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 50 días después de la siembra	57
FIGURA 13	Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 50 días después de la siembra	58
FIGURA 14	Número de brotes obtenidos con el medio Morel, según	

regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 65 días después de la siembra	61
FIGURA 15 Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 65 días después de la siembra	61
FIGURA 16 Número de brotes obtenidos con el medio Morel, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 80 días después de la siembra	65
FIGURA 17 Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 80 días después de la siembra	65
FIGURA 18 Altura de brotes obtenidos con el medio Morel, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 80 días después de la siembra	69
FIGURA 19 Altura de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 80 días después de la siembra	70
FIGURA 20 Altura de brotes según medio de cultivo	70
FIGURA 21 Altura de brotes según regulador del crecimiento	71
FIGURA 22 Altura de brotes aplicando regulador del crecimiento Kinetina y su respuesta en diferentes niveles (mg/l)	72

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE MONJA BLANCA
(*Lycaste skinneri* var. alba)

EVALUATION OF CULTIVATION MEANS
FOR THE MICROPROPAGATION
OF THE WHITE NUN
(*Lycaste skinneri* var. alba)

RESUMEN

La Monja Blanca (*Lycaste Skinneri* var. alba), es una orquídea que posee un valor hortícola por la vistosidad de sus flores, así mismo es una especie amenazada por la deforestación, la cual ha cambiado las

condiciones ecológicas donde normalmente se desarrolla, aunado a ello el avance de la frontera agrícola y la baja viabilidad de la semilla.

Debido a que se encuentra en vías de extinción, en Washington fue firmado en decreto en donde se aprueba el convenio sobre Comercio Internacional de especies amenazadas de fauna y flora y silvestre, suscrito en año 1,973 (1, 2, 32). Asimismo fue incluida en la lista de protección de flora en el acuerdo Gubernativo en el año de 1934 (9); en el año 1978, por ordenanza municipal, se incluyó, para su protección, en el acuerdo del Consejo Municipal de la ciudad de Guatemala (9). En el año 1979 el Congreso de la República emitió el decreto No. 63-79 en donde indica que esta especie forma parte de la Flora Nacional.

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). Para la misma el objetivo general fue: Encontrar un medio de cultivo adecuado para la micropropagación de Monja Blanca. Los objetivos específicos fueron: Determinar el medio basal que produce el mayor número de brotes y altura; determinar cual de los tres reguladores del crecimiento produce el mayor número de brotes y altura; determinar el nivel de cada regulador del crecimiento que produce el mayor número de brotes y altura; y determinar si existen interacciones entre medios de cultivo, reguladores del crecimiento y niveles de reguladores del crecimiento que influyan sobre el número de brotes y altura. Para lo cual se realizó un experimento utilizando el diseño de bloques completamente al azar, con cuarenta y cuatro tratamientos y diez repeticiones haciendo un total de 440 unidades experimentales. Las variables de respuesta fueron: número de brotes y altura de brotes.

Se evaluaron dos medios basales los cuales fueron Murashige y Skoog y el medio Morel (1965^a). Así mismo se evaluaron tres reguladores del crecimiento: kinetina, 2,4 D y bencilaminopurina (BAP), cada uno con siete niveles los cuales fueron: 0.01 mg/l, 0.1 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, 5

mg/l, 7 mg/l y 9 mg/l. Estos fueron combinados en cada medio de basal y a su vez cada medio tenía un testigo absoluto.

A partir de los 20 días después de la siembra se inició la primera lectura. A cada 15 días se tomaron lecturas de los tratamientos, los cuales fueron cinco lecturas en total.

Después de analizar los resultados se determinó que el medio basal MS, es el adecuado para la producción de brotes de Monja Blanca y el medio basal Morel presentó mejor respuesta de la estimulación de altura de brotes; asimismo se observó que el regulador del crecimiento kinetina es quien estimula a producir mayor número de brotes. El nivel de regulador del crecimiento kinetina que produjo el mayor número de brotes fue 0.1 mg/l (10.4 brotes promedio), y el nivel de regulador de kinetina que estimulo mayor respuesta a la variable respuesta altura fue de 1 mg/l (30.44 mm).

1. INTRODUCCIÓN

La propagación por medio de cultivo de tejidos es una alternativa adecuada, ampliamente utilizada para propagar plantas cuya propagación sexual o asexual es difícil por las características que presentan las especies. Esta técnica es una herramienta versátil para la micropropagación a gran escala de plantas con importancia económica o para obtener cultivos libres de patógenos, mejoramiento genético y conservación de germoplasma.

Las metodologías de cultivo *in vitro* para algunas especies ya están estandarizadas, sin embargo, es necesario seguir explorando, debido a que periódicamente aparecen nuevas especies o variedades que no responden de igual manera, esto debido a las particularidades del cultivo.

La Monja Blanca (*Lycaste skinneri* var. *alba*) es una planta ornamental, con una gran vistosidad, la cual se encuentra incluida en las leyes que protegen la vida silvestre. También está declarada en peligro de extinción según el Centro de Datos de la Conservación (CDC) (1, 2, 9). En su extinción influyen algunos factores como: destrucción de su hábitat natural, ampliación de la frontera agrícola y baja viabilidad de la semilla.

Para desarrollar una metodología que facilitara la propagación *in vitro* de Monja Blanca, se evaluaron medios de cultivo en combinación con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento, aportando de esta manera conocimientos que puedan servir como base para su multiplicación.

Para esta investigación se utilizaron como medio basal la composición de sales de Murashige y Skoog (1962, MS) y Morel (1965^a). En cada medio de cultivo se utilizaron siete concentraciones de reguladores del crecimiento, los cuales fueron kinetina (N6 furfurilaminopurina), 2,4-D (ácido 2,4 dicloro fenoxiacético) y BAP (N6-bencil aminopurina). Las concentraciones utilizadas fueron: 0.01, 0.1, 1, 3, 5, 7 y 9 mg/l y un testigo sin ningún regulador del crecimiento para cada medio.

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), en Bárcena, Villa Nueva. En la investigación se utilizó el diseño de bloques al azar con arreglo factorial de 44 tratamientos con 10 repeticiones cada uno y en cada tubo de cultivo se sembraron 3 explantes.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La Monja Blanca es una planta ornamental de la familia Orchidaceae, que tiene una gran vistosidad, forma parte de la flora nacional y es considerada como una especie en vías de extinción, según el decreto No. 63-79 emitida por el Congreso de la República de Guatemala (1, 2). Es una especie que fue incluida en la lista de protección de la flora en el año de 1934 según acuerdo gubernativo (9).

La especie presenta dificultades en su propagación en forma natural, registrándose porcentajes muy bajos de germinación y su propagación por medios sexuales no es tan satisfactorio.

No existe ninguna información sobre la respuesta de la Monja Blanca a la multiplicación, utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. Estas técnicas pueden ser de gran utilidad para completar programas de multiplicación y conservación de la especie en extinción, obteniendo ventajas tales como: 1) disminución de tiempo en su reproducción, 2) facilidad de manipulación y, 3) multiplicación masiva.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

Maldonado (20) describe que las orquídeas se pueden encontrar desde el nivel del mar hasta los 4,268 msnm. Son comunes de encontrar a altitudes de 457 a 2,134 msnm, habiendo variedades que crecen en la tierra, llamadas terrestres y otras que crecen en rocas y árboles llamadas epifitas o litóficas.

Las orquídeas se desarrollan en cualquier parte del mundo, desde regiones árticas hasta los trópicos, sin embargo en regiones cálidas y húmedas se desarrollan mejor, existiendo a su vez mayor variedad. Ninguna orquídea es parásita aunque algunas crecen asociadas con algunos hongos y dependen de ellos para su alimentación. Las orquídeas constituyen una importante familia de plantas monocotiledóneas que comprenden más de 800 géneros que a su vez cuentan con unas 35,000 especies, por lo cual son consideradas las más numerosas del reino vegetal.

En general son plantas herbáceas, perennes, que pueden ser terrestres, epifitas (que viven sobre otras plantas), a veces acuáticas y subterráneas, con rizomas o sin ellos o con tubérculos, los tallos pueden ser erguidos, trepadores o rastreros, pueden tener bulbos, tallos tuberosos, hojas de muy variada forma. La principal característica y el ornamento máspreciado de las orquídeas es la flor, que posee una estructura que es absolutamente peculiar (20).

3.1.1.1 LAS ORQUÍDEAS Y SU CONSERVACIÓN

La familia Orchidaceae es la familia de plantas productoras de flores más grande del Reino Vegetal y se estima que su número de miembros oscilan entre 17,000 y 35,000 especies agrupadas en 650-900 géneros, a esto se deben agregar más de 70,000 híbridos artificiales inscritos. Este grupo de plantas tiene amplia diversidad y especialización, lo que le ha permitido establecerse en todos los sitios aptos para el desarrollo de la vida en nuestro planeta, por lo tanto, sus miembros han estado expuestos al efecto de las actividades humanas en todos los continentes.

En los trópicos es donde se concentra el mayor número de ellas y es precisamente en estas regiones, donde se ha producido el mayor impacto ecológico provocado por el hombre en los últimos años (24).

3.1.1.2 DETERIORO DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE

El principal problema, directamente asociado con el deterioro de la familia Orchidaceae, es la deforestación acelerada de los bosques, esta actividad impacta negativamente la riqueza biológica de varias formas. Una forma mediante la cual se destruyen miles de orquídeas, es resultado directo de la caída de los árboles, pues las especies ancladas sobre él y la vegetación aplastada por el tronco y ramaje, se deterioran o caen, y las dejan expuestas a una muerte lenta y segura. También cuando un bosque se ralea o destruye, la fauna asociada a él también se altera, esto provoca el desplazamiento o la muerte de muchos polinizadores, reducen la producción de semillas, el número de plantas y originan el paulatino

decrecimiento de la población al restituirse las orquídeas que sucumben en forma natural o artificial (24).

Para las orquídeas estos desastres son particularmente nocivos, pues la mayoría de ellas, dependen directamente de la existencia de los bosques para sobrevivir. Los incendios no sólo destruyen el sustrato sobre el cual crecen, sino que también matan o ahuyentan los agentes polinizadores, alteran sensiblemente las condiciones ambientales y dejan las pocas epifitas sobrevivientes en un precario estado (24).

3.1.1.2.1 FACTORES QUE AMENAZAN LA EXTINCIÓN DE LA MONJA BLANCA

La destrucción inmoderada de los bosques, por ser utilizados como pastizales y zonas agrícolas causa indirectamente la destrucción del hábitat de la Monja Blanca, por deforestación, incendios forestales, trasiego ilegal de plantas, manejo inapropiado de especímenes, contaminación ambiental y erosión genética. Al cortar los árboles se producen cambios en la temperatura y la humedad, tan drásticos, algunas veces, que el ambiente alterado ya no es adecuado para la existencia de ésta (22, 24, 26).

Zepeda (32) describe que debido a la tala indiscriminada, la quema y la rosa, han provocado la pérdida de numerosas especies únicas en el mundo y la disminución poblacional de otras, hoy consideradas como endémicas y con peligro de extinción.

3.1.1.3 ECOLOGÍA DE LAS ORQUÍDEAS

A. DISTRIBUCIÓN

Las plantas pertenecientes a la familia Orchidaceae, han colonizado todos los continentes, excepto la Antártida y ciertas regiones desérticas muy áridas. Tienen una distribución tan extensa y amplia radiación adaptativa que le han permitido variar, en forma extraordinaria, para establecerse en múltiples nichos ubicados en regiones árticas, templadas y tropicales. De acuerdo con la latitud, las orquídeas, se distribuyen en forma creciente de norte a sur. En las regiones ubicadas dentro del

círculo Polar Ártico hay una cantidad ínfima, comparado con el tamaño total de la familia, pues llega únicamente a siete géneros. Hacia el sur del trópico de Capricornio, hasta desaparecer en el Polo Sur. Las especies árticas y la mayoría de las subtropicales son terrestres, con adaptaciones particulares, para resistir las condiciones ambientales extremas. Han evolucionado formando tubérculos, cormos, raíces carnosas y rizomas. Otro aspecto interesante de estas plantas es la distribución altitudinal. La literatura existente señala que pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta 3,600 msnm, pero se encuentran más en las regiones intermedias en montañas de regular altura, valles y mesetas (24).

B. SITIOS DONDE HABITAN

Las hay terrestres, litófitas, epífitas, semiacuáticas, y subterráneas. Las terrestres no difieren en mucho de otras plantas herbáceas perennes. Sus raíces se nutren del suelo o el humus. La mayoría de las especies tropicales son siempre verdes y no desfolian como sucede con las especies de climas fríos.

Las litófitas obtienen su nombre de dos raíces griegas litos= roca y phyton= planta, con lo cual se describe su hábito de crecer sobre las rocas en regiones volcánicas, suelos rocosos (litosoles) o muy erosionados donde se ha expuesto la roca madre.

Las epífitas constituyen el mayor grupo de orquídeas. Su nombre deriva del griego epi= sobre y phyton= planta. Utilizan los árboles sólo como un lugar para vivir y se nutren de la materia orgánica acumulada sobre sus raíces o arrastrada por la lluvia. Con ayuda de la luz solar, CO₂ y el agua sintetizan todos los componentes esenciales para vivir sin tomar nada del hospedero que les da soporte. Este grupo representa más del 50% del total de miembros de la familia.

Las semiacuáticas constituyen un grupo reducido dentro de la familia Orchidaceae, son habitantes de partes muy húmedas y pantanosas, como *Habenaria* y *Calopogon*. Estas plantas tienden a desarrollar sus raíces en

las capas superficiales del pantano, donde hay buena aireación y aprovechan el manto de humus.

Las orquídeas subterráneas están representadas por dos géneros australianos *Rhizanthella* y *Cryptanthemis*. Por su hábito las convierte en verdadera rarezas, pues su cuerpo vegetativo se desarrolla dentro del suelo y solamente exponen sobre la superficie sus flores, frutos y semillas, para facilitar la polinización y dispersión (24).

3.1.1.4 MORFOLOGÍA DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas están constituidas, al igual que otras plantas, por: raíz, tallo, hojas, flores y frutos, sin embargo, en cada una de esas partes hay modificaciones evolutivas en cuanto a forma y función. Esa riqueza de formas adaptativas es el reflejo de la diversidad de hábitat colonizados por estas plantas (24).

A. FASES DEL DESARROLLO DE UNA PLÁNTULA DE ORQUÍDEA

La semilla de orquídea es muy pequeña y contiene un embrión desnudo dentro de un pericarpio (Figura 1).

Al inicio de la germinación la semilla de una orquídea, el embrión se alarga y se hincha formando la estructura conocida como protocormo.

El protocormo se torna de un color verde y su crecimiento inicia absorbiendo hidratos de carbono en la cual cuando es en forma natural este es apoyado por un hongo que entra en simbiosis y un porcentaje es por medio de fotosíntesis. Cuando la germinación y el crecimiento de orquídeas se realiza en forma *in vitro* en donde los azúcares son proporcionados por medio de crecimiento del protocormo, el crecimiento puede tener en la oscuridad.

Una semilla da lugar a un sólo protocormo inicialmente, pero al cabo de cierto tiempo inicia un proceso de división del cual puede ser

promovido por tratamientos adecuados y esto puede inducir a la multiplicación de los protocormos.

Con tratamientos de auxina en concentraciones altas los protocormos son estimulados, en la cual se puede obtener su multiplicación.

En tratamientos altos de auxina, el protocormo también puede inducir la formación de callo del cual puede diferenciarse y crecer como una plántula. Estos pueden ser alternativas para la propagación vegetativa de orquídeas (14).

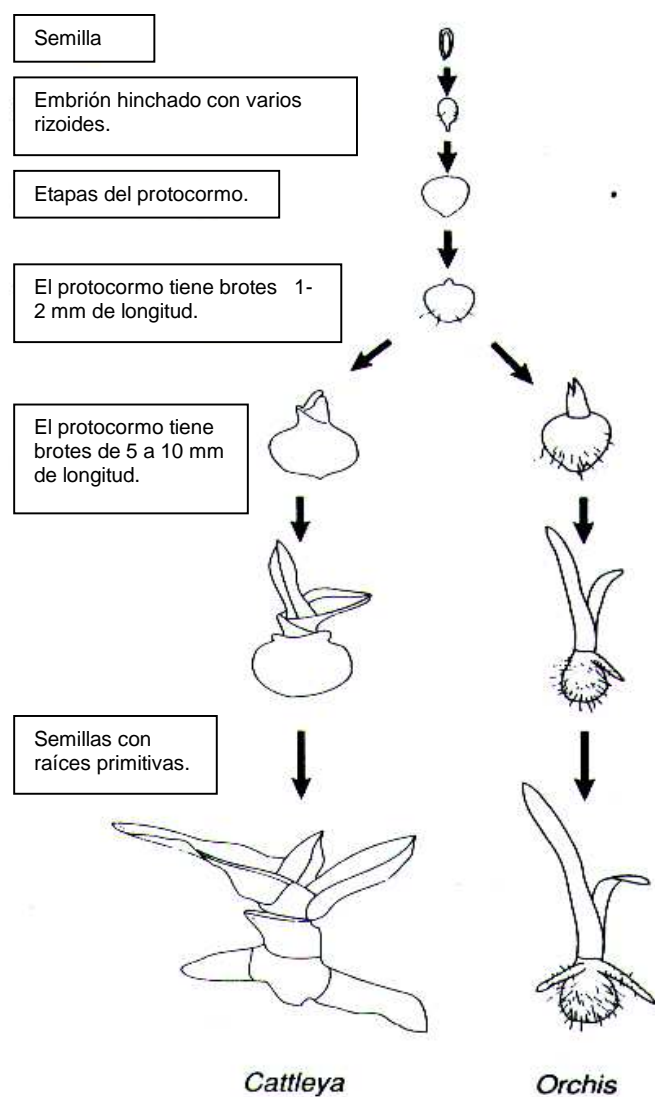


FIGURA 1. Fases del desarrollo de plántulas de orquídeas mostrando dos géneros diferentes (14).

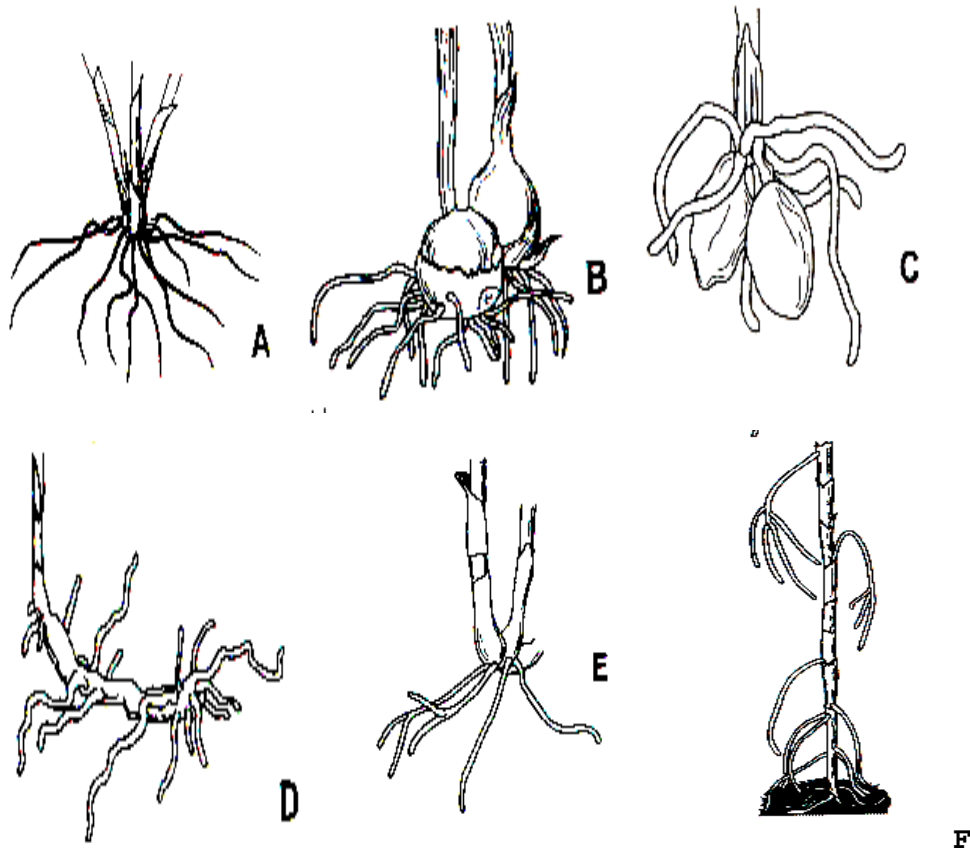
B. RAÍZ

La función típica de las raíces es absorber agua, sales minerales y dar anclaje a la planta. En las orquídeas terrestres esas funciones se cumplen a plenitud, pero a la vez, se complementan con otras necesarias para la sobrevivencia de especies adaptadas a vivir en sitios con condiciones inhóspitas. Por ejemplo en los países templados o regiones semidesérticas es frecuente encontrar orquídeas terrestres con tubérculos, cormos, rizomas y raíces carnosas, que almacenan energía y agua para resistir inviernos fríos y sequías prolongadas. En el trópico húmedo estas modificaciones son poco frecuentes, predominan especies con raíces fibrosas y numerosos pelos absorbentes semejantes a otras monocotiledóneas.

En las orquídeas epífitas aparte del anclaje y absorción, las raíces se adaptan para resistir las condiciones variables de humedad. Son gruesas y blancas, debido a su desarrollo se constituye en una capa esponjosa de células que recubren los tejidos vasculares. El velamen también protege las células internas de la raíz contra altas temperaturas y desecación durante el verano. Otra característica interesante de éstas raíces aéreas es su indiferencia al geotropismo, es decir muestran crecimiento en todas direcciones, lo que les permite abrazar las ramas de los árboles y anclarse fuertemente en ellas.

Cuando las raíces están en desarrollo, es frecuente observar los ápices con una coloración verde, dada por la presencia de cloroplastos. Conforme envejecen ese color desaparece y con él la capacidad temporal de fotosintetizar (24).

En términos generales las modificaciones morfológicas asociadas a la raíz se presentan en la figura 2, donde se ilustra la raíz fibrosa, tuberosa, aérea y el asocio de raíces con cormos y rizomas.



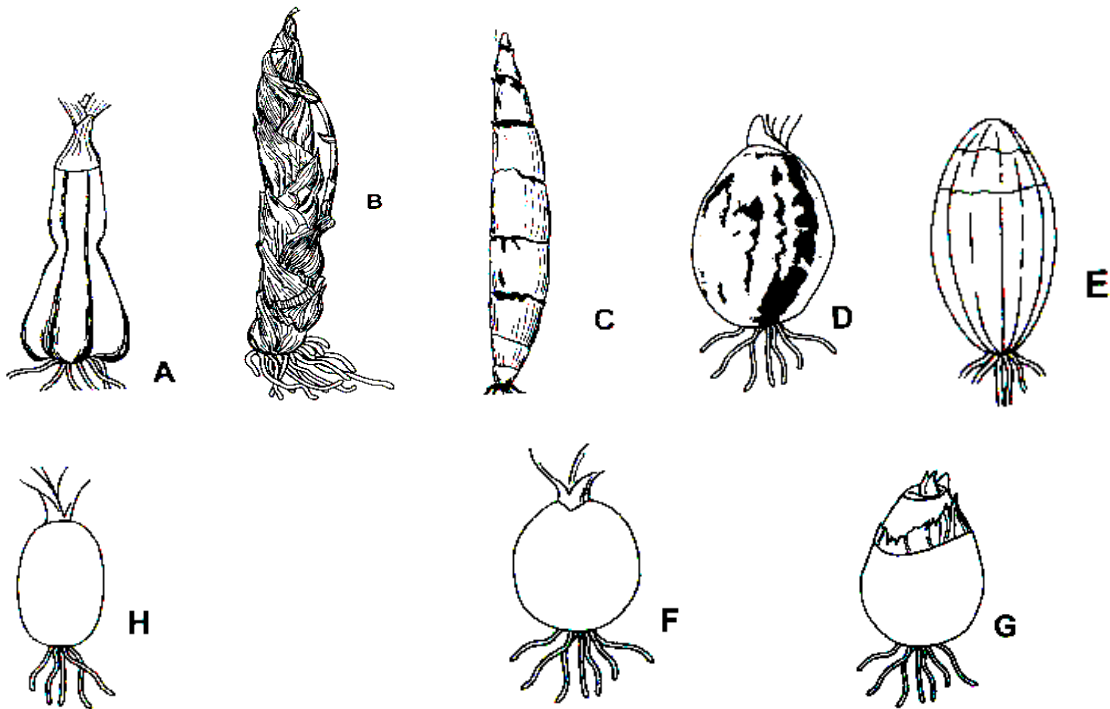
- A. Raíz fibrosa (*Pogonia sp.*) D. Rizoma con raíces carnosas (*Goodyera sp.*)
 B. Cormos (*Aplectrum sp.*) E. Raíces carnosas sin rizoma (*Dendrobium sp.*)
 C. Tubérculos (*Orphys sp.*) F. Raíces aéreas (*Renanthera sp.*)

FIGURA 2. Algunas modificaciones de raíces presentes en las orquídeas (24)

C. TALLO

Es la estructura básica por donde circulan los compuestos elaborados, hacia diferentes partes de la planta, además, brinda soporte a las hojas flores o frutos y en forma secundaria participa en la fotosíntesis. En las orquídeas no existen los tallos leñosos a pesar de la existencia de especies gigantescas como *Grammataphyllum speciosum* planta que puede alcanzar hasta 900 kg de peso y varios metros de alto.

Los tallos en las orquídeas pueden ser trepadores, rastreros o colgantes. Una modificación frecuente en los miembros de esta familia es la formación de rizomas (Figura 3), los cuales son tallos de crecimiento horizontal que se ramifican para originar los pseudobulbos los cuales pueden ser esféricos, globosos, aplanados, cónicos o alargados, con uno o varios entrenudos provistos de yemas vegetativas o florales (24).



A. *Calanthe* sp.

B. *Mormodes* sp.

C. *Catasetum* sp.

D. *Laelia* sp.

E. *Acineta* sp.

F. *Sophronitis* sp.

G. *Neomoorea* sp.

H. *Bulbophyllum* sp.

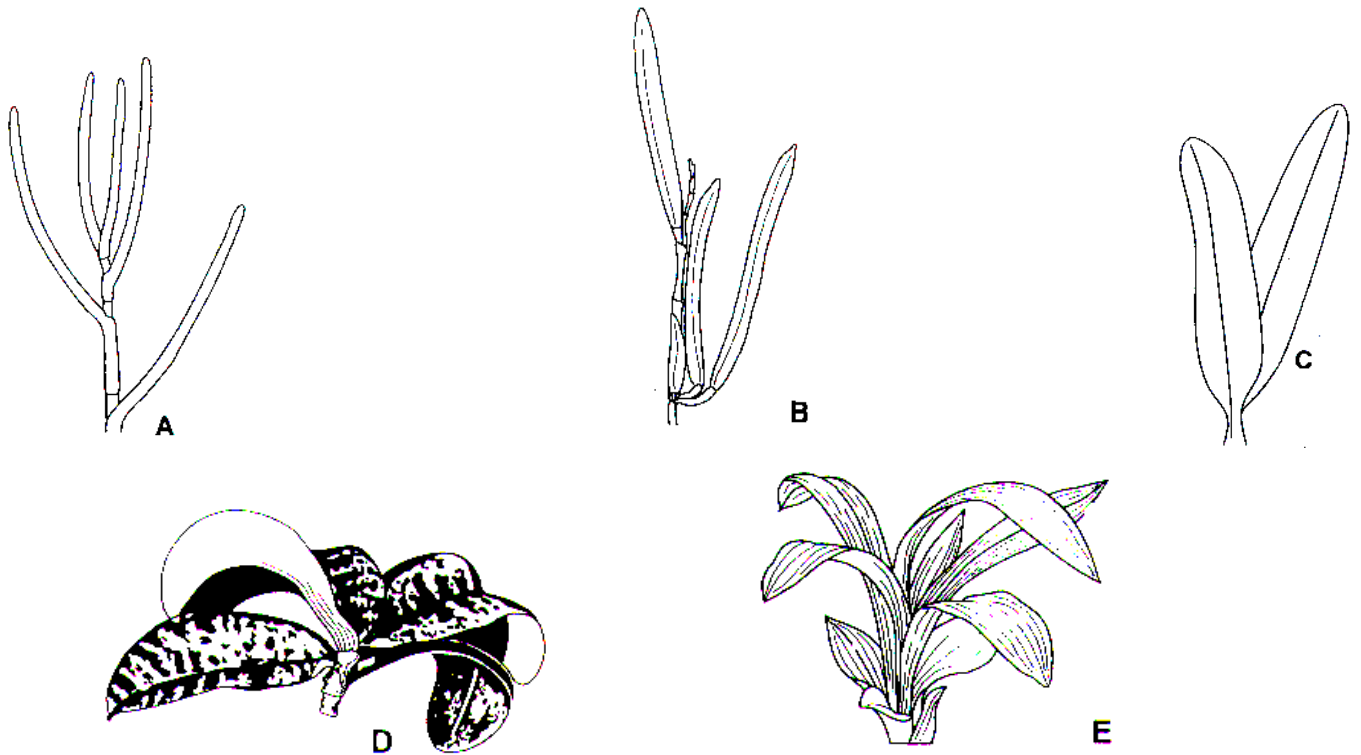
FIGURA 3. Algunos tipos de pseudobulbos presentes en las orquídeas (24).

D. HOJA

Son por excelencia las estructuras fotosintéticas de la planta. La mayoría de las epífitas producen hojas con epidermis gruesa para impedir la deshidratación excesiva en épocas cálidas.

Algunos mantienen los estomas cerrados durante el día para abrirlos al final de la tarde y reducir de ésta forma, la pérdida de agua.

La riqueza en cuanto a formas de la lámina foliar, es reducida en las orquídeas. Todas las especies tienen hojas simples, con bordes lisos libres de espinas o formas aserradas (Figura 4). En especies terrestres es frecuente encontrar hojas membranosas y delgadas mientras que en las epifitas es común la presencia de hojas carnosas (24).



- A y B. Hojas cilíndricas y carnosas de *Vanda tares* y *Brassavola*.
 C. Hojas carnosas de *Cattleya* sp.
 D. Hojas carnosas de *Phalaenopsis* sp.
 E. Hojas membranosas de *Orchis* sp.

FIGURA 4. Algunos tipos de hojas comunes presentes en las orquídeas (24).

E. FLOR

La flor de las orquídeas es la más interesante no sólo por su función reproductiva, sino por la exquisita diversidad de formas, colores y aromas que presentan. La morfología básica de la flor de una orquídea es la misma de cualquier planta: sépalos, pétalos, y verticilos sexuales

(Figura 5). Sin embargo, cada una de esas partes presenta rasgos distintivos, muy particulares, propios de esta familia.

Se dice que poseen simetría bilateral, esta es una característica predominante en la mayoría de las orquídeas, solamente escapan a esta generalización las más primitivas que tienen simetría radial (24).

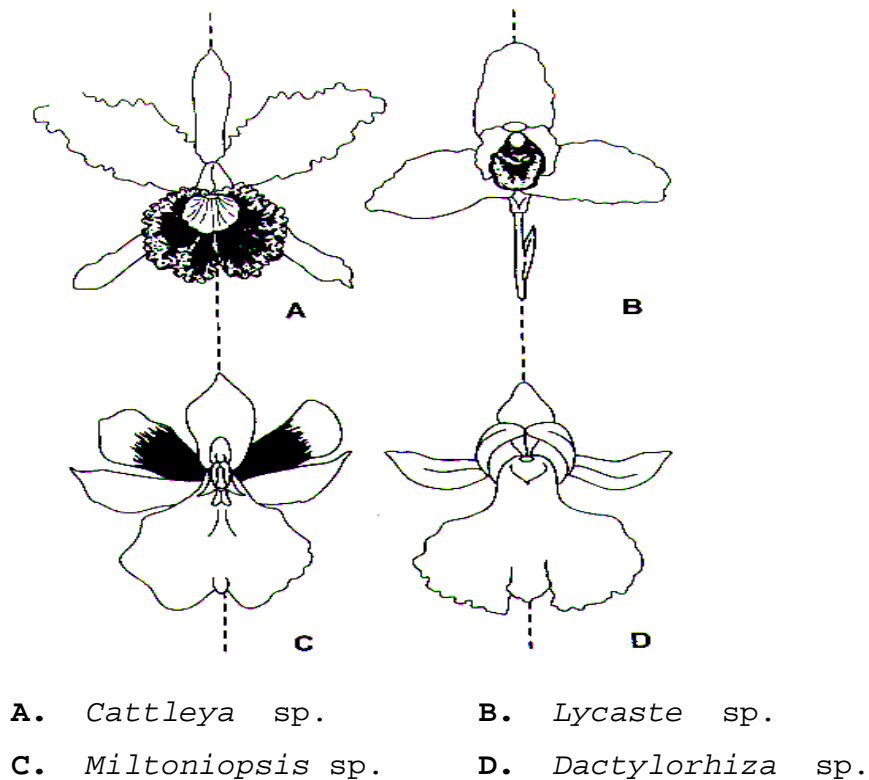


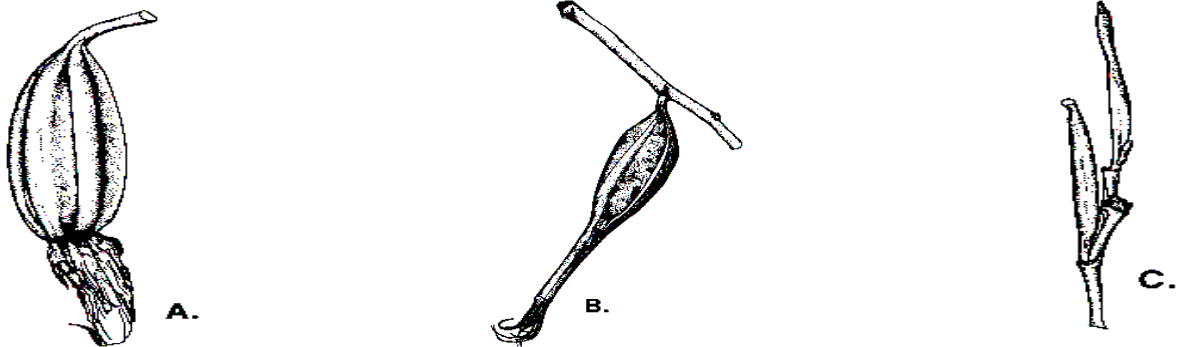
FIGURA 5. Simetría bilateral presente en casi todas las orquídeas (24).

En la parte interna de la flor se encuentra los tres pétalos, dos de ellos son idénticos entre sí y el tercero se ha modificado, a éste pétalo se le denomina labium o labelo. El labium presenta formas muy variadas y es el pétalo más llamativo de la flor, a su vez funciona básicamente como atrayentes para el polinizador, la cual facilita la fecundación y a su vez protege a sus órganos sexuales (24).

F. FRUTOS Y SEMILLAS

Una vez polinizada la flor, esta se marchita y el ovario empieza a hincharse hasta formar el fruto. Este es una cápsula con tres loculos internos y suturas longitudinales que se ensanchan y abren cuando la estructura alcanza la madurez (Figura 6). En el interior de la cápsula se forman cientos de miles a millones de minúsculas semillas, producto de la fecundación individual de cada óvulo. Estas semillas son las más pequeñas del reino vegetal, sus medidas oscilan entre 0.25 - 1.2 mm de largo por 0.09 - 0.27 mm de ancho.

Las semillas son estructuras que no tienen mayor nivel de complejidad, están constituidas por un embrión indiferenciado o una testa o envoltura muy delgada (Figura 7). No hay reservas de energía como el endospermo de otras monocotiledóneas y solamente en algunos géneros se ha observado la presencia de pequeñas cantidades de compuestos de alto contenido energético (aceite, almidones), por lo tanto para poder sobrevivir en forma natural requieren de la formación de micorrizas (24).



A. *Phaius* sp.

B. *Encyclia* sp.

C. *Phragmipedium* sp.

FIGURA 6. Frutos de algunas orquídeas (24).

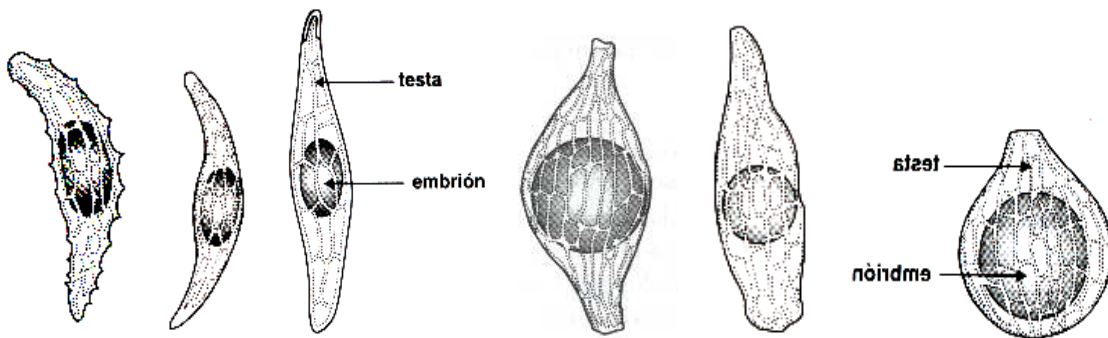


FIGURA 7. Diferentes tipos de semillas de orquídeas, mostrando los componentes básicos: testa y embrión. (24)

3.1.1.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas, además de su belleza incomparable, en donde es posible encontrar los más extraños mimetismos, tienen un determinado valor comercial, especialmente en otras latitudes del mundo, por lo cual es necesario la creación de centros de micropropagación, en donde se reproduzcan las especies, con lo cual se asegure su supervivencia, impidiendo la depredación de los hábitat naturales (20).

Las orquídeas son comercializadas como flores de corte. En los últimos años se ha incrementado su demanda y su valor. En Singapur el valor de la exportación anual en el año de 1975 fue de US\$ 3.5 millones, incrementándose este valor en 1980 a US\$ 7.8 millones, luego sufre un pequeño declive en el año de 1983 de US\$ 6.1 millones, incrementándose nuevamente en el siguiente año a US\$ 6.7 millones. En Tailandia es considerada como uno de los principales cultivos de exportación. Las orquídeas tienen un valor de exportación en países como Alemania, Suecia, Suiza, Italia, Francia, Bélgica y Japón. Actualmente han iniciado su cultivo países en vías de desarrollo como Malasia, Filipinas, Sri Lanka e Indonesia. Las orquídeas en los Estados Unidos tienen demanda, las mismas son adquiridas en los invernaderos. Sagawua, 1988, estima que en 1987, en Estados Unidos se dio una venta de US\$ 28 millones (4).

Los géneros de mayor importancia comercial son *Cattleya* y *Cymbidium*, los cuales crecen principalmente en áreas de Europa y América. Existen

otros géneros que también tienen importancia comercial las cuales incluyen: *Ascocentrum*, *Renanthera*, *Vanda*, *Aerides*, *Doritis*, *Phalaenopsis* y *Thynchostylis*. También existen híbridos creados artificialmente que han adquirido importancia económica tales como: *Aranda* (*Arachnis* x *Vanda*), *Aranthera* (*Arachnis* x *Renanthera*), *Aeridachnis* (*Arachnis* x *Aerides*), *Ascocenda* (*Ascocentrum* x *Vanda*), *Holttumara* (*Arachnis*, x *Vanda* x *Renanthera*), *Kagawara* (*Ascocentrum* x *Vanda* x *Vanda* x *Renanthera*) y *Mokara* (*Arachnis* x *Ascocentrum* x *Vanda*) (4).

Las orquídeas para corte, a diferencia de numerosas plantas productoras de flores, han probado su cualidad de no pasar de moda. En otras especies es frecuente observar cambios en la preferencia de los mercados, posiblemente por el menor margen de diversidad que poseen y por la poca plasticidad genética presente en esas familias. A lo relativo a la flor en planta, también las orquídeas mantienen una posición del tiempo, pues estas no se desechan después de cierto tiempo, se convierten por lo general en una mascota (24).

3.1.1.6 PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

El cultivo de las orquídeas se ha realizado por milenios en culturas de todos los continentes, manteniendo su popularidad hasta el presente. Además, conforme se han desarrollado técnicas nuevas aplicables a esta actividad, se ha dado un proceso de adopción rápido, abriendo cada vez más y mejores opciones para el cultivo exitoso de ésta planta en todos los países del mundo. Considerando el estado actual de la Orquideología (como ciencia consolidada), la incorporación de las orquídeas en la actividad económica y recreativa del hombre, es posible delinear algunos campos donde es muy probable que hayan aportes futuros. Entre estas se pueden citar: obtención de plantas mejoradas (mejoramiento genético) ya sea por técnicas tradicionales de cruzamiento y selección, entre variedades, especies o géneros así como mediante el empleo de ingeniería genética, promete interesantes resultados (24).

La técnica de cultivo de tejidos se ha aplicado por varios años en la germinación y propagación de varios géneros de orquídeas de

importancia económica. Es un procedimiento eficaz para la propagación de semillas *in vitro*. Se pueden obtener avances a través de la investigación para que se definan las bases y requisitos para obtener mejores respuestas de germinación de semillas y multiplicación de orquídeas. Por la destrucción rápida de hábitat naturales de especies de orquídeas, así como su alto costo de mantenimiento, se hace necesario desarrollar métodos viables que permitan almacenar germoplasma, que sean simples y que requieran un mínimo equipo (4).

3.1.1.7 ASPECTOS HISTÓRICOS SOBRE LA MONJA BLANCA

Se estima que las orquídeas aparecieron sobre la faz de la Tierra hace unos 100 ó 200 millones de años en el Archipiélago de Borneo y desde ahí se extendieron a todos los continentes. Las primeras evidencias documentales del interés humano por las orquídeas aparece en la China, aproximadamente 3,000 años atrás, reflejadas en objetos de arte, como pinturas y bordados. El primer libro publicado sobre estas plantas se hizo también en China, durante el año 1,233 de nuestra era y se llamó Chin-Chang Lan-Pu (24).

El nombre de orquídea, viene del griego Orchis que significa testículo, descrito por Teoflasto: (374 - 287 a. C.) "Planta particular, en la base donde nacen las hojas se encuentran dos pequeñas pelotas arrugadas semejantes a los testículos de los perros" (20, 24, 28).

Las orquídeas son las plantas más evolucionadas del reino vegetal y para poder sobrevivir en los distintos ambientes en que se encuentran diseminadas, tuvieron que adaptar su forma vegetativa a las circunstancias y presentan por lo consiguiente las formas más diversas (3, 20).

El nombre específico de la Monja Blanca se debe al eminente orquideólogo inglés George Ure Skinner (28).

En 1843 se le dio el nombre de *Lycaste*, simbolizando en su original belleza lo mitológico de la bellísima hija de Priamo, famoso rey de Troya, loado por Homero y por Virgilio. Luce también la Monja Blanca el

nombre del botánico M. Jonh Lindley (padre de la orquideología), el que le agregó después la palabra Alba que significa pureza. Los q'eqchies del área de Alta Verapaz la llaman en su lengua simbólicamente "Sak Ijish". Otros pueblos que también conservan preciosas leyendas de su original encanto, la consideran como la más alta representación de una princesa india quien por su rara belleza fue convertida en flor (20, 24).

Su nombre científico anteriormente era *Maxilaria virginalis*. La Monja Blanca (*L. skinneri* var. alba) se vio florecer en Inglaterra, Bélgica, Bruselas en el año 1814, países que han extendido su cultivo obteniendo los más bellos y maravillosos cruces, que han hecho llamar la atención de otros pueblos dedicados al cultivo de las orquídeas, logrando establecer relaciones comerciales con los mejores jardines europeos (10, 20).

A. TAXONOMÍA

Superreino	Eucarionta
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Sub Clase	Liliidae
Orden	Orchidales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Ochidoideae
Genero	Lycaste
Especie	skinneri
Variedad	alba (7)

Nombres comunes: Monja blanca, Espíritu Santo y los nombres vernáculos: Sak ijish (Blanca orquídea en Q'eqchí), Saknite (Blanca Flor en Maya Itza) y Sak Sochitl Tziquinaja (Blanca Flor pájaro en Cakchiquel y Náhuatl) (23).

B. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es una planta que alcanza hasta un metro o más de altura. Los pseudobulbos son largos, ovalados y algo comprimidos. Las hojas son simples paralelinervadas, séciles, alargadas y numerosas extendiéndose desde el ápice al pseudobulbo, llegando a alcanzar 75 cm de largo. La flor es el ornamento máspreciado, la cual posee una estructura muy peculiar que la distinguen de las demás plantas. Posee pétalos rojos a violeta y blanco. El labelo está unido al pie de la columna, presentando a veces un color sólido en la cara inferior o manchado, el disco es grueso y algo piloso (con pelos), con una callosidad en forma de lengua que se proyecta entre los lóbulos laterales. El fruto es una cápsula que tiene numerosas semillas, que al llegar a la madurez se abre y se esparcen por la acción del viento. Las semillas viven en simbiosis con hongos micorrízicos que le proporcionan el alimento necesario. Las raíces son órganos importantes que tienen la función de fijar a las plantas y obtener los elementos nutricionales (23, 28, 31).

3.1.1.8 GENERALIDADES DEL GÉNERO *LYCASTE*

Debido a que el género *Lycaste* tiene una amplia distribución en el continente, estas orquídeas cuentan con un ambiente natural de climas y condiciones muy diferentes, se les encuentra en las costas con temperaturas tropicales y en climas fríos en regiones montañosas.

Las especies del género *Lycaste* tienen un sistema de raíces que nos indica que están más adaptadas a un ambiente semiterrestre debido a que se encuentran en árboles donde se acumulan hojas y otros materiales, asimismo se les encuentra en las cavidades de las rocas (23).

Existen dos grupos de especies del género *Lycaste*, unas que botan sus hojas, es decir, son dehiscentes y las que no lo hacen. En el primer grupo se encuentran las especies que tienen espinas en los pseudobulbos en la parte donde han estado las hojas y son en su mayoría de color amarillo; *Lycaste aromática* y *Lycaste cruenca*. En el segundo grupo están: *Lycaste virginales* (actualmente *Lycaste skinneri*) y *Lycaste lasioglossa* (23).

A. LYCASTE Y GÉNEROS ALIADOS

En el género *Lycaste* se hace una clasificación por su afinidad taxonómica. Según Maldonado (20), incluye: *Lycaste*, *Maxillaria*, *Gongora*, *Trigonidium*, *Mormodes*, *Chondrorhyncha*, *Mormolyca*.

El género *Lycaste* incluye la reina de las orquídeas guatemaltecas, la flor nacional de Guatemala la Monja Blanca (*Lycaste skinneri* var. *alba*). Dentro de la especie *L. skinneri* var. *alba*, la forma blanca se encuentra muy raramente (aproximadamente una entre 2,000 plantas). La especie presenta una gran variación en las combinaciones de colores rosados y morados de sus sépalos y pétalos. Se encuentran principalmente en bosques lluviosos de las montañas de las Verapaces, y son utilizados para la hibridación.

En Guatemala hay otras especies de *Lycaste*, entre ellas las amarillas como *L. cruenta* y *L. cochleata*; una especie café, *L. lasioglossa* y *L. deppei* de color blanco con amarillo y café. *L. lucianni* es un híbrido entre *L. skinneri* y *L. lasioglossa*. *L. imschootiana* es un híbrido entre *L. virginialis* y *L. cruenta*. *Maxillaria* es un género con flores muy parecidas a *Lycaste* pero se distinguen muy fácilmente por la textura de sus hojas. Se llama así por la variabilidad en los colores de sus flores, desde casi negro hasta crema; *Maxillaria tenuifolia* es una especie que presenta olor a coco, y *Maxillaria elarior* con flores grandes y carnosas (20).

B. HÁBITAT DE LYCASTE

La Monja Blanca, se encuentra en los bosques húmedos a 1800 msnm, es epífita, crece sobre la materia orgánica depositada en los árboles; esto no significa que sea parásita, ya que sus raíces crecen únicamente sobre la superficie del árbol sin utilizar los elementos nutritivos de éste (23).

Se encuentra en los bosques húmedos de México, Guatemala y Honduras. En Guatemala se le encuentra en los departamentos de Alta Verapaz y Quiché (23, 28).

3.1.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

3.1.2.1 DEFINICIÓN

Consiste en cultivar un fragmento de tejido o inóculo (célula, tejidos y órganos), el cual, bajo un conjunto de técnicas aplicadas en condiciones asépticas y físicas controladas y en presencia de un adecuado balance de nutrientes y hormonas, puede expresar su potencial de diferenciación (8, 15).

La técnica de cultivo de tejidos vegetales también la definen otros autores como: el cultivo de células, tejidos y/u órganos extraídos de plantas, que se mantiene bajo condiciones artificiales y permite reproducir plantas que poseen todas las características de las plantas madre, o sea que esta es una técnica de propagación vegetativa en condiciones artificiales (27).

3.1.2.2 FINES DEL CULTIVO DE TEJIDOS

Los principales fines del cultivo de tejidos vegetales son tres: el primero es la micropropagación masiva, el segundo es el mejoramiento genético y el tercero es la producción de metabolitos secundarios (27).

3.1.2.3 CULTIVO *IN VITRO* DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas constituyen el primer grupo de especies vegetales de interés económico en las que se aplicó técnicas de cultivo *in vitro*. En ellas se usan varias modalidades de cultivo como: cultivo de semillas, meristemos y protoplastos (24).

3.1.2.4 CULTIVO DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS

Las semillas de las orquídeas son extremadamente pequeñas y están constituidas básicamente por un embrión indiferenciado y esférico rodeado por un grupo de células (isodiamétricas y escasamente diferenciadas) cubiertas por una testa que las protege.

Debido a las características presentes en la familia Orchidaceae, las semillas constituyen un explante ideal, pues carecen de endosperma, por lo cual el cultivo de semillas de orquídeas debe considerarse como un cultivo de embriones.

En condiciones naturales para germinar y crecer éstas semillas necesitan de la presencia de micorrizas no obstante con los métodos modernos de germinación *in vitro* se reemplaza la acción de éstas a través de las sales minerales, azúcares y vitaminas que la semilla puede absorber directamente lo que les permite desarrollarse.

El cultivo *in vitro* de semillas se emplea universalmente para la propagación masiva de orquídeas, obtenidas a partir de cápsulas producidas por medio de polinización natural o artificial. Con éste procedimiento se persigue obtener plantas a partir de semillas; por lo tanto no se obtienen clones, sino poblaciones de plantas hermanas entre sí, con una gran cantidad de genes en común.

La obtención de plantas por medio de semillas, se inicia con la selección de la cápsula o fruto que proveerá las semillas. Esta debe encontrarse en un estado óptimo de madurez, para asegurarse que los embriones estén bien desarrollados. El período de maduración de la cápsula varía desde unas semanas hasta un año, dependiendo del género y la especie (24).

3.1.2.5 MICROPROPAGACIÓN

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos a la regeneración y propagación de plantas enteras es un desarrollo más reciente que se ha convertido en una alternativa importante ante los métodos convencionales de propagación (15).

Básicamente todas las células vegetales poseen la característica de la totipotencia, es decir, la capacidad de desarrollar una planta completa mediante el proceso de regeneración. Existen técnicas convencionales de propagación que utilizan esta característica particular de las plantas, tal como la injertación con todas sus variantes. Así también la técnica de cultivo de tejidos vegetales utiliza esta característica, aunque más eficientemente que las técnicas tradicionales, debido a que proporciona un ambiente artificial favorable para el desarrollo de las plantas (27).

El objetivo de la micropropagación es obtener un gran número de plantas en un período corto de tiempo (18).

A. VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Las ventajas de la micropropagación masiva son:

- a. Una alta tasa de propagación en un período breve y la conservación de germoplasma bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra.
- b. Normalmente se eliminan diversas enfermedades en el proceso. Por consiguiente, facilita la producción y la calidad de las plantas.
- c. Se puede propagar en cualquier época del año y/o ambiente.
- d. Permite planificar la producción de acuerdo con la demanda.
- e. En poco espacio, se puede conservar mayor número de especies vegetales (18, 27).

B. DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La práctica de la micropropagación presenta algunos problemas, de los cuales se pueden considerar: las instalaciones necesarias son costosas y en muchas especies de plantas las consideraciones económicas es posible que no justifiquen su empleo. Para efectuar las operaciones se necesita de adiestramiento específico. Los errores en identidad, introducción de organismos patógenos desconocidos o la aparición de un

mutante desapercibido pueden multiplicarse a una escala considerable en un tiempo muy corto. Por ello es necesario programar y tener conocimiento de estos problemas potenciales y efectuar una evaluación de sus efectos en la producción de ciertos cultivares (15).

3.1.3 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo han jugado un papel clave para la propagación masiva, el mejoramiento de plantas así como también le sirve de sostén y le proporciona los elementos para el desarrollo de las plantas. Estos contienen sustancias orgánicas que regulan el crecimiento, desarrollo y diferenciación del explante. Los ingredientes del medio de cultivo varían según el tipo de planta y de la etapa de propagación (6, 15).

Es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, el cual debe poseer los componentes nutritivos básicos y su soporte, que incluyen, generalmente, nutrimentos minerales, vitaminas, carbono, agentes gelificantes y reguladores del crecimiento (5).

3.1.3.1 COMPONENTES DE UN MEDIO DE CULTIVO

A. SALES INORGÁNICAS

Las sales inorgánicas proporcionan los macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) y microelementos (boro, cobalto, cobre, manganeso, yodo, hierro y zinc). De estas sales se preparan soluciones concentradas (15).

B. COMPUESTOS ORGÁNICOS

a. CARBOHIDRATOS

Las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis. Sin embargo, las plantas cultivadas *in vitro* casi no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad en lo que se desarrollan y aunque lo hagan producen muy poco azúcar, por ello es necesario adicionar cierta cantidad de azúcar como fuente de energía (5).

En la mayoría de los cultivos se emplea sacarosa del 2 al 4% pero en algunos casos se pueden usar concentraciones tan elevadas como el 12% (15, 5).

b. VITAMINAS

La tiamina (de 0.1 a 0.5 mg/l), el ácido nicotínico (0.5 mg/l) y la piridoxina (0.5 mg/l), son requeridos para los tejidos vegetales, para un mejor desarrollo. En muchos cultivos resulta beneficioso el uso de inositol, a razón de 100 mg/l. En otros casos se puede también aplicar ácido pantoténico (0.1 mg/l) y biotina (0.1 mg/l). Estos son guardados en soluciones concentradas cien veces (15).

c. REGULADORES DEL CRECIMIENTO

El crecimiento de las plantas está controlado por procesos fisiológicos y compuestos orgánicos conocidos como sustancias del crecimiento, reguladores del crecimiento o como hormonas de la planta que se producen en el interior del vegetal en bajas concentraciones.

En las últimas décadas, se han preparado compuestos orgánicos sintéticos con efectos reguladores en los distintos procesos fisiológicos. A estos compuestos se les ha llamado "Reguladores del Crecimiento", que han sido utilizados en propagación de plantas así como en medios de cultivo de tejidos (17, 13).

Algunos reguladores del crecimiento reconocidos son: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico.

Las auxinas y citoquininas son las más importantes como reguladores del crecimiento y el estímulo de la formación de morfogénesis en tejido

de cultivos. Se han descubierto algunos reguladores sintéticos con una actividad biológica que se iguala a las sustancias naturales.

Los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de sus embriones, concentraciones altas de auxinas, siendo las más utilizadas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) o bien AIA (ácido indolacético) (17, 13).

La función biológica de las auxinas se orienta a la expansión de las células de tallo y coleóptilos, también cumplen funciones de división celular y fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden posteriormente crecimientos radicales. También se ha utilizado para la iniciación de raíces de varias especies vegetales. Una de las teorías de la acción de las auxinas indica que éstas aumentan la plasticidad de las paredes celulares, al aumentar la flexibilidad de las paredes, disminuye la presión de ésta alrededor de la célula, y la presión de turgencia causada por las fuerzas osmóticas en la savia vacuolar, hace que el agua entre a las células, provocando su expansión (30).

Las funciones fundamentales de las citocininas son: provocar la división celular y la regulación de la diferenciación de los cultivos. Estas dos hormonas interactúan y dan como resultado expresiones diferentes de crecimiento (30).

En propagación *in vitro*, se utilizan ampliamente los reguladores de crecimiento. Las auxinas son utilizadas para provocar agrandamiento y alargamiento celular y para promover la división celular. Los compuestos más utilizados son: 2, 4-D (ácido 2,4 dicloro fenoxiacético), ana (ácido naftalenacético) y el AIB (ácido indolbutírico). En general el AIB se utiliza en concentraciones que varían entre 0.001 y 10 mg/l, con un punto óptimo entre 0.1 y 10 mg/l; 2,4-D, por su parte, se utiliza en concentraciones que oscilan entre 0.1 y 10 mg/l, siendo su punto óptimo entre 1 y 5 mg/l; ana generalmente se ha utilizado en concentraciones que varían entre 1 y 10 mg/l (27).

En relación a las citocininas, la más utilizada es la kinetina ó cinetina (N6-furfuril-aminopurina), pero se ha demostrado que existen otras sustancias sintéticas que cumplen la misma actividad biológica como lo son: zeatina [(N6(4-hidroxi-3-metil butenil)] y BAP ó BA (N6-bencil

aminopurina), las cuales se consideran más potentes que la primera. BAP es la más utilizada por su disposición en el mercado y por su bajo costo. Zeatina se considera 10 veces más potente que kinetina pero es difícil su obtención en el mercado. BAP tiene su punto óptimo, en cuanto a la concentración más utilizada, de 0.1 a 2 mg/l (27).

i. AUXINAS

Las auxinas desempeñan una función importante en la expansión de las células de tallo y coleóptilos. El descubrimiento de las auxinas derivó del estudio de las curvaturas tropísticas de coleóptilos, y en el primer bioanálisis de la auxina, la prueba de curvatura de la avena, se utilizaron coleóptilos decapitados de avena (30).

Son ampliamente usados en micropropagación la cual debe incorporarse en los nutrientes para promover el crecimiento de callo, de células y órganos vegetales; los requerimientos de las concentraciones dependerán de: el tipo de crecimiento o desarrollo que se requiere, los niveles naturales de auxinas dentro del explante cuando se corte (13).

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos es posible por la acción de las auxinas sobre la división celular. Estas participan en forma directa en el crecimiento celular (6).

Las auxinas estimulan también la división celular; por ejemplo, frecuentemente fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden crecimientos similares a raíces. Las auxinas son muy efectivas en iniciar la formación de raíces de varias especies vegetales. Esta respuesta fue base de la primera aplicación práctica en agricultura de sustancias del crecimiento (30).

Las auxinas pueden iniciar la floración (por ejemplo en la piña) e inducir el amarre de frutos y su desarrollo en algunas especies. Las auxinas hacen aumentar con frecuencia el amarre de frutos sobre todo en especies con frutos de muchas semillas, como son los pimientos y las cucurbitáceas. La aplicación de auxinas a frutos jóvenes y en desarrollo, desarrolla su tamaño. Se adelanta también la maduración de algunos frutos, como los higos (30).

i.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS AUXINAS

En el transcurso de los años se han elaborado numerosas teorías a fin de explicar los mecanismos primarios de acción de las auxinas. Una de las primeras teorías fue la de que la auxina incrementa la plasticidad de las paredes celulares (Heyn, 1931) (30).

La plasticidad es una deformación irreversible de las paredes provocadas probablemente por la ruptura de enlaces cruzados entre las microfibrillas de celulosa de las paredes celulares. El aumento del tamaño de las células se produce en dos tamaños; primeramente ocurre un aflojamiento de las paredes celulares (proceso que requiere de auxina y oxígeno), seguido de una absorción de agua y una expansión de las paredes (30, 13).

Una segunda teoría, explica que las auxinas fomentan la síntesis proteínica que es producida en las células. Según esta teoría las auxinas activan a un tipo mensajero de ARN, que provoca la síntesis de enzimas específicas. Dichas enzimas generan la inserción de nuevos materiales en las paredes celulares, lo cual da por resultado su expansión (6, 30, 13).

ii. GIBERELINAS

Se considera que el efecto más sorprendente por parte de las giberelinas es la estimulación del crecimiento. Las giberelinas también estimulan la floración en muchas especies; al ser aplicado en los tallos producen un incremento pronunciado de la división celular. Se dice que también pueden terminar con el reposo de las semillas. Las giberelinas provocan la expansión celular mediante la inducción de enzimas que debilitan las paredes celulares. Otro mecanismo que las auxinas provocan es que estimulan la expansión celular mediante la hidrólisis del almidón. Como resultado de ello se produce dentro de la célula alfa-amilasa en la cual se incrementa la concentración de azúcares, elevando así la presión osmótica en la savia celular. También se cree que provocan cambios a nivel genético, estimulando la síntesis enzimática en las células (6).

iii. CITOCININAS

Las citocininas fueron descubiertas en la década de 1950 por Skoog. Son sustancias que interfieren en los procesos de división celular y el retardo de la senescencia en las partes maduras de la planta. Se considera que estimulan el alargamiento celular. Además de fomentar la división celular, las citocininas influyen en la diferenciación de los cultivos (6, 30).

Se dice que existen sustancias naturales con actividad similar a las citocininas, tal es el caso de la leche de coco, éstos son equivalentes para mantener el crecimiento de muchos cultivos de tejidos. También se han encontrado actividad citocinina en jugos de tomate, extracto de flores, en raíces, tubérculos y nódulos radiculares. Una buena fuente de citocininas la constituyen los frutos y las semillas inmaduras, observándose un aumento durante la germinación (6).

3.1.4 EXPLANTE

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta (29).

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. En este caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes (21, 29).

3.1.5 ASEPSIA

La asociación explante medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en la incubación y manipulación. Por ello para establecer cultivos asépticos es necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos y d) realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia (21).

3.2. MARCO REFERENCIAL

3.2.1. INVESTIGACIÓN EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN ORQUÍDEAS

Bernard, en 1,909, realizó exitosos trabajos en cultivo *in vitro*, aislando hongos que benefician en la raíz-hongo para la germinación de semillas de orquídeas. Demostró que cuando se cultivan semillas esterilizadas e inoculadas con hongos el porcentaje de germinación se incrementaba considerablemente (19).

Knudson (1922, 1924, 1925) realizó investigaciones importantes relacionados con la germinación de las semillas y la organogénesis. Demostró que los hongos eran los responsables del rompimiento del almidón en azúcares simples, los cuales favorecían la germinación de las semillas de orquídeas. El trabajo de Knudson demostró por primera vez, que la germinación de semillas de orquídeas era posible *in vitro*, sin la necesidad de la asociación con hongos (19).

Burgeff (1936) obtuvo considerables datos relacionados con la germinación de semillas de 25 géneros de orquídeas y con otras especies híbridas.

En 1949, Vacin y Went desarrollaron un medio ampliamente usado para la germinación de semillas de híbridos, incluso el jardín botánico de Singapur en las últimas cuatro décadas solamente ha utilizado el medio de Vacin y Went en su programa de hibridación de orquídeas (19).

Garita y González (11) exponen que para el caso específico de las semillas de orquídeas el medio de mayor aplicación es el de Knudson C (1946). También establecen que la adición de suplementos (vitaminas y aminoácidos), aun cuando no son imprescindibles, resultan beneficiosos para estimular el crecimiento de las plántulas.

En 1951, Knudson, sugirió un medio de cultivo que provee un balance nutricional orgánico e inorgánico para el desarrollo de semillas *in vitro*, el cual es ampliamente utilizado para la germinación de diferentes géneros, especies e híbridos. A la fecha existen por lo menos 25 medios de cultivo para la germinación de semillas de orquídeas, incluyendo el de Murashige y Skoog (19).

El cultivo de meristemos *in vitro* fue iniciado por el Dr. G. Morel en 1960, en INRA, Versailles, Francia. Además de la ventaja que ofreció el cultivo de meristemas para la obtención de clones libres de virus, ésta técnica abrió las puertas a otra importante forma de multiplicación de plantas y la obtención de un considerable número de semillas de alto valor comercial en un tiempo relativamente corto (18).

En Israel, en 1963, se realizaron algunos ensayos de cultivo *in vitro* de flores de orquídeas, en un tiempo de una a seis semanas después de la incubación con diferentes concentraciones de ANA, se obtuvieron resultados. Se han utilizado semillas de frutos inmaduros, en varios subcultivos, como resultado se ha obtenido una amplia proliferación de brotes (4).

En 1965 Morel envió un protocolo a la sociedad de *Cymbidium* donde se describen con detalles varios aspectos sobre la propagación meristemática *in vitro* del género *Cymbidium* sp. (18).

Murashige, en 1974 (4) enumeró 22 géneros de orquídeas y Arditti, en 1979, listó 35, incluso unos híbridos. Pensaron que sería difícil propagar las orquídeas en cultivo de tejidos por las exigencias en los nutrientes que requiere, sin embargo, experimentos realizados mas tarde mostraron que las orquídeas se pueden cultivar en medios de cultivo más simples. Para dicho estudio, se evaluaron orquídeas del género *Cattleya*.

Kim y Kako, en 1984 (4) realizaron investigaciones en orquídeas, utilizaron partes florales en los cultivos de *Cymbidium saranani*, en el medio basal de Murashige y Skoog, complementado con ANA y BA. En esta investigación se utilizaron como explantes ovarios y tallos de la flor, las cuales respondieron mejor que utilizando sépalos y pétalos. También se inocularon explantes de orquídeas del género *Spathoglottis* en cultivo *in vitro* adicionándole kinetina y AIA.

Torres y Mogollón (25) realizaron un estudio con *Cattleya lueddemanniana*, orquídea endémica de Venezuela, con el propósito de desarrollar un protocolo para la micropropagación masiva a través de organogénesis directa. Se utilizaron ápices procedentes de yemas en reposo y brotes de activo crecimiento, colocados sobre el medio de crecimiento líquido de Murashige y Skoog (1962), modificado por Huang (1984). La multiplicación de los brotes se maximizó agregándole 3.0 mg/l de benciladenina y 13.2 uM/l de tidiazurón, pero sin endospermo de coco y colocados en bolsas de membrana de polipropileno, a 2800 lux. Además, la formación de brotes micropropagados se obtuvo usando la mitad de las sales del medio de Murashige y Skoog y en ausencia de benciladenina. El medio fue semisolidificado con 0.7% de agar y el mejor enraizamiento se produjo a 4900 lux.

Kim (4), también ha cultivado con buen éxito explantes de raíz (5-10 mm), utilizando como medio de cultivo el de Vacin modificado, complementando con varias concentraciones de 2,4 -D. Después de siete semanas se produjo la presencia de raíces.

Los medios de cultivo más usados en la propagación de orquídeas son Vacin y Knudson C. Otros laboratorios no los usan por su simplicidad o tradición (4).

En los laboratorios de Hawai y Singapur, frecuentemente los medios más usados para la propagación son los de Vacin, aunque en los países europeos y en el continente americano es más frecuente el uso del medio de cultivo de Knudson C. Sin embargo, en 1978, se realizaron estudios con diferentes medios de cultivos los cuales fueron a) White (WH), b) Hildebrandt, Riker, y Duggar (HRD), c) Vacin y Went (VW), d) Murashige y Skoog (MS), y e) Knudson C (KC). Se compararon el crecimiento y desarrollo de los cultivos después de 50 días. Los resultados fueron que los tejidos inoculados en MS dieron como resultado masas de callo amarillento teniendo una medida de 1.5 cm en diámetro siendo muy pobre en la presencia de protocormos y pobre en la formación de plántulas. El medio de cultivo de White presentó mejores resultados en la proliferación de plántulas, pero el peso era menor. El medio de cultivo HRD promovió la proliferación de protocormos pero en una mínima cantidad y además su desarrollo era muy lento. Los medios VW y KC exhibieron un buen crecimiento global pero el último medio tubo un estímulo mayor sobre la proliferación de protocormos, dando como resultado un gran crecimiento en fresco (4).

Gordillo, en 1990 (11), citado por Garita y González, determinó que las semillas de *Lycaste skinneri*, manifiestan un crecimiento óptimo sembradas en medio de cultivo Knudson C, modificado utilizando una concentración de sacarosa de 40 g/l y agua de coco en concentraciones de 200 a 250 ml/l. Con 0 g/l de sacarosa el crecimiento fue inhibido.

Arditti (11) menciona que una modificación a la fórmula de Knudson C, es la adición de extracto de banano, lo cual aumenta la tasa de crecimiento de las plántulas. Se aplican 150 g de fruta, se licua por un minuto en medio litro de agua destilada y se deja decantar durante 5 minutos, después de lo cual se repite la operación. Se pasa luego por un colador al cual se le pone una hoja de papel filtro o cuatro capas de tela fina. Se recoge un tercio del líquido filtrado, se agrega a medio litro del medio Knudson C y se lleva hasta el volumen de un litro. Se puede congelar hasta que llegue el momento de usarlas (10).

Para el cultivo de embriones de orquídeas híbridas, Kerbau y Handro usaron el medio básico de Knudson C modificado por la adición de 24.5

mg/l de $\text{FeSO}_4\text{-Na}_2\text{EDTA}$ en lugar de $\text{FeSO}_4\text{-7H}_2\text{O}$ y adición de tiamina (0.5 mg/l) o agua de coco (15% v/v) a un pH 5.5; parte del medio fue gelificado con agar (0.6%). En el medio donde se adicionó agua de coco la proliferación de protocormos fue mayor y más verde. Luego se pasaron al medio básico de Knudson adicionando pulpa de banano (11).

Garita y González (11), según los estudios hechos, concluyen y recomiendan el uso de los medios de Knudson C (1964) y Murashige y Skoog (1962), como base para la elaboración de medios de cultivo en la siembra de orquídeas.

En otro estudio realizado, se colectaron frutos de siete especies de orquídeas en la cual se extrajo la semilla y sembraron en frascos con 20 ml de medio Knudson "C" modificado; las semillas se sembraron a 22 °C con iluminación de 2000 lux de intensidad durante 16 horas por día. Al notarse la formación de plántulas de tres especies se transfirieron a medio de enraizamiento bajo condiciones de invernadero, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro uno.

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la investigación realizada para la germinación y formación de protocormos después de sembradas las semillas de orquídeas.

No.	ESPECIE	DIAS A GERMINACION	DIAS A LA FORMACIÓN DE PROTOCORMOS
1	<i>Cattleya skinneri</i>	40	50
2	<i>Cattleya aurantiaca</i>	45	70
3	<i>Oncidium bicallosum</i>	50	70
4	<i>Dresderela archilae</i>	30 - 40	92
5	<i>Chisis sp.</i>	50	70
6	<i>Lycaste lassioglosa</i>	50	80
7	<i>Lycaste cochleata</i>	60	84
Promedio		61.62	74.5

Fuente: ARCHILA E; Fajardo, E. 1996. Simposio nacional sobre cultivo de tejidos vegetales ICTA. Guatemala (5).

De este estudio concluyen que únicamente algunas semillas de *Lycaste lassioglosa* y *Dresderela archilae* presentaron problemas para germinar y adquirieron una coloración marrón. Por lo que recomendaron el uso de otros medios de cultivo para la germinación de semilla de orquídea (5).

Arditti (11) comenta que el uso de jugo de tomate como medio para la germinación de semillas de orquídeas fue sugerido por primera vez en 1944 por Meyer. Sin embargo, este medio no es el más adecuado para la germinación de semillas de orquídeas, ya que existen otros medios que dan mejores resultados.

En el laboratorio del Instituto Nacional de Aprendizaje, propagan orquídeas en forma masiva por semillas e investigan metodologías probables para la producción clonal en los géneros de *Dendrobium* y *Phalaenopsis*. Para el género *Dendrobium* es usado el medio basal de Vacin y Went (1949), el cual es usado para producir brotes vegetativos, adicionándole al medio 150 mg/l de agua de coco, manteniéndolo con una agitación constante de 120-160 revoluciones por minuto y realizando el cambio de medio cada tres semanas. Para el género *Dendrobium* se utilizan como explantes tallos florales y jóvenes y como medio basal MS al 50% adicionando hormonas tales como 2,4-D (0.5 mg/l), BAP (3 mg/l), kinetina (2 mg/l), adenina (5 mg/l) y agua de coco (200 mg/l) (23).

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Encontrar un medio de cultivo adecuado para la micropropagación de Monja Blanca.

4.2 ESPECIFICO

4.2.1. Determinar el medio basal que produce el mayor número de brotes y altura.

- 4.2.2. Determinar cual de los tres reguladores del crecimiento produce el mayor número de brotes y altura.
- 4.2.3. Determinar el nivel de cada regulador del crecimiento que produce el mayor número de brotes y altura.
- 4.2.4. Determinar si existen interacciones entre medios de cultivo, reguladores del crecimiento y niveles de reguladores del crecimiento que influyan sobre el número de brotes y altura.

5. HIPÓTESIS

- 5.1. Existe un medio basal con un nivel de regulador del crecimiento (auxina-citocinina), en donde se obtiene una tasa alta de multiplicación *In Vitro* de protocormos de Monja Blanca.

- 5.2. Existe un regulador del crecimiento que produce el mayor número de brotes y altura.
- 5.3. Existe un nivel de regulador del crecimiento que produce el mayor número de brotes y altura.
- 5.4. Existe una interacción entre medio de cultivo, el regulador del crecimiento y el nivel del regulador del crecimiento que influye sobre el número de brotes y altura.

6. METODOLOGÍA

6.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), ubicado en el kilómetro 21.5 carretera al Pacífico, Bárcena, Villa Nueva, Guatemala.

6.2 MANEJO DEL EXPERIMENTO

6.2.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO BASAL

La preparación del medio basal se realizó de acuerdo al consumo y las facilidades disponibles en el laboratorio (ver apéndice No. 1). En la investigación se requirió de 2.2 litros de medio MS y 2.2 litros de medio Morel 1965a.

Estos medios de cultivo fueron los usados por ser los mas apropiados y que, además, son medios que han sido utilizados en la propagación *in vitro* del género *Lycaste*. Así mismo se prepararon también soluciones concentradas de reguladores del crecimiento.

6.2.2 pH

El pH de los medios de cultivo, osciló entre 5.2 y 5.7 para que no tuvieran efecto negativo de sales que permanecen solubles y para que hubiera una mejor asimilación de los nutrientes por los explantes de Monja Blanca.

6.2.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Una vez elaborado el medio basal se prepararon los medios de cultivo combinándolos con un nivel de regulador del crecimiento y luego fueron distribuirlos a los tubos de cultivo. En cada tubo de cultivo se colocó 10 ml de medio de cultivo.

Las soluciones concentradas de los medios de sales minerales fueron elaboradas con base en las concentraciones descritas tanto para medios MS como Morel 1965a (Cuadro 16), al igual que los reguladores del crecimiento (Cuadro 2). De las soluciones concentradas se extrajo los volúmenes deseados para la elaboración de las mezclas, agregándole las dosis de regulador de crecimiento a evaluar para los distintos tratamientos contemplados. Los reguladores del crecimiento evaluados fueron: 2,4-D, kinetina y BAP, los cuales fueron distribuidos en cada medio siendo estas las concentraciones: 0.01, 0.1, 1, 3, 5, 7 y 9 mg/l.

Posteriormente se agregó la sacarosa en las concentraciones descritas y se reguló el pH según el medio basal del que se trató (Cuadro 16), seguidamente se le adicionó Phytigel como solidificante y luego se realizó la transferencia a los tubos de cultivo con la cantidad descrita en la unidad experimental.

6.2.4 ESTERILIZACIÓN DEL UTENSILIO, CRISTALERIA Y MEDIOS DE CULTIVO

La esterilización de utensilios, cristalería y medios de cultivo utilizada se realizó con una autoclave, a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada y a una temperatura de 121 °C, por un tiempo promedio de 20 minutos.

6.2.5 PROCEDIMIENTO PARA LA SIEMBRA

La siembra se realizó en la cámara de flujo laminar, la cual fue desinfectada con alcohol etílico al 70%, media hora antes de cada sesión de trabajo. La superficie de los recipientes que contenían las plantitas se desinfectó, rociándoles etanol al 70% antes de introducirlos a la cámara. Los instrumentos de disección y las cajas petri fueron previamente autoclaveadas. Las pinzas fueron flameadas en el mechero cada vez que se trasladó el explante del medio de germinación a los tubos de cultivo. También se flamearon la boca de cada tubo de cultivo, antes de hacer la siembra. Se flameó también la tapa y luego se cubrió el recipiente.

6.2.5.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL

Los explantes de Monja Blanca utilizados fueron semillas o embriones germinados *in vitro*, las cuales se conservan en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). Estos fueron germinados en medio basal MS y en el momento de la siembra llevaban 35 días de haber iniciado sus germinación. El medio basal MS fue utilizado para la germinación debido a que presenta buenos resultados para cualquier especie, además, es recomendable para optimizar la germinación (19).

6.2.5.2 PROCESO DE SIEMBRA DE EXPLANTES

Este procedimiento estuvo restringido a la cámara de flujo laminar. Fue allí donde se sembraron los explantes de embriones germinados, para lograr su multiplicación.

6.2.5.3 CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Las condiciones de incubación después de la siembra se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas

de oscuridad. La fuente de luz fueron de lámparas fluorescentes de luz blanca con 1000 lux de intensidad lumínica, con una temperatura media de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Todos los tratamientos y sus repeticiones se trasladaron a un cuarto de crecimiento del laboratorio durante 90 días hasta que se estabilizó la presencia de brotes.

6.2.6 MEDICIÓN DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA

6.2.6.1 NUMERO DE BROTES

Para la toma de datos de esta variable se procedió de la siguiente manera: a los 20 días después de la siembra, se realizó un conteo de número de brotes por unidad experimental. Luego se tomaron cuatro lecturas más después de la primera, cada 15 días. Esta variable se determinó estando la planta dentro del tubo de cultivo y en completa asepsia dentro de la campana de flujo laminar.

6.2.6.2 TAMAÑO DE BROTES

Para la toma de datos de esta variable se procedió de la siguiente manera: a los 90 días después de la siembra, se realizó una medición de la distancia que hay de la base del brote hacia la parte más alta del explante, en milímetros.

6.2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

La investigación se realizó bajo condiciones homogéneas de humedad, temperatura y luz dadas por el cuarto de crecimiento del laboratorio, razón por la cual se utilizó el diseño estadístico completamente al azar más un testigo en cada medio de cultivo (cuadro 2), haciendo un total de

44 tratamientos, con 10 repeticiones cada tratamiento y tres explantes en cada unidad experimental.

6.2.8 FACTORES Y NIVELES

6.2.8.1 MEDIOS DE CULTIVO

- a. MS = Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).
- b. Mr = Medio de cultivo Morel (1965^a).

6.2.8.2 REGULADORES DEL CRECIMIENTO

- a. BAP (6-bencil aminopurina).
- b. 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético).
- c. Kinetina.

6.2.8.3 NIVELES DE CADA REGULADOR DEL CRECIMIENTO EN CADA MEDIO

- a. 0.0 mg/l
- b. 0.01 mg/l
- c. 0.1 mg/l
- d. 1 mg/l
- e. 3 mg/l
- f. 5 mg/l
- g. 7 mg/l
- h. 9 mg/l

6.2.9 ALEATORIZACIÓN

Los tratamientos se aleatorizaron, de la manera siguiente: se sorteó el orden de cada medio de cultivo y cada nivel de regulador del crecimiento.

6.2.10 MODELO ESTADÍSTICO

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + C_k + AC_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} = Variable respuesta.
 U = Efecto de la media general.
 A_i = Efecto del i -ésimo medio de cultivo.
 B_j = Efecto del j -ésimo regulador del crecimiento.
 C_k = Efecto de la k -ésima concentración de regulador del crecimiento.
 AB_{ij} = Efecto de la interacción del i -ésimo valor de medio de cultivo y el j -ésimo regulador del crecimiento.
 AC_{ik} = Efecto de la interacción del i -ésimo valor del medio de cultivo y el k -ésimo valor de concentración de regulador del crecimiento.
 BC_{jk} = Efecto de la interacción del j -ésimo regulador del crecimiento y el k -ésimo valor de concentración de regulador del crecimiento.
 ABC_{ijk} = Efecto de la interacción del ijk -ésimo valor del medio de cultivo, regulador del crecimiento y el valor de concentración de regulador del crecimiento.
 E_{ijk} = Error experimental asociado a la ijk -ésima unidad experimental.

6.2.11 UNIDAD EXPERIMENTAL

Como unidad experimental se utilizó un tubo de cultivo de 25 x 150 mm, el cual contenía 3 semillas germinadas.

6.2.12 TRATAMIENTOS

Los tratamientos evaluados fueron 44 y se hicieron 10 repeticiones por tratamiento, los cuales suman 440 unidades experimentales. Los tratamientos evaluados en el ensayo fueron el resultado del arreglo de 3 factores, que son: 2 medios basales (MS y Morel); 3 reguladores del crecimiento (Kinetina, 2,4-D y BAP), cada uno con 7 niveles más un testigo para cada medio de cultivo. En cada unidad experimental (tubo de cultivo), se sembraron 3 explantes (Cuadro 2).

CUADRO 2. Tratamientos utilizados para el estudio de la respuesta a la micropropagación de Monja Blanca el medio basal MS y Morel en combinación con tres diferentes reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones.

Tratamiento	MEDIO	REGULADOR DEL CRECIMIENTO	NIVEL (mg/l)
1	MS	KINETINA	0.01
2	MS	KINETINA	0.1
3	MS	KINETINA	1.0
4	MS	KINETINA	3.0
5	MS	KINETINA	5.0
6	MS	KINETINA	7.0
7	MS	KINETINA	9.0
8	MS	2,4-D	0.01
9	MS	2,4-D	0.1
10	MS	2,4-D	1.0
11	MS	2,4-D	3.0
12	MS	2,4-D	5.0
13	MS	2,4-D	7.0
14	MS	2,4-D	9.0
15	MS	BAP	0.01
16	MS	BAP	0.1
17	MS	BAP	1.0
18	MS	BAP	3.0
19	MS	BAP	5.0
20	MS	BAP	7.0
21	MS	BAP	9.0
22 (TESTIGO)	MS	-----	-----
23	Morel 1965 ^a	KINETINA	0.01
24	Morel 1965 ^a	KINETINA	0.1
25	Morel 1965 ^a	KINETINA	1.0
26	Morel 1965 ^a	KINETINA	3.0
27	Morel 1965 ^a	KINETINA	5.0
28	Morel 1965 ^a	KINETINA	7.0
29	Morel 1965 ^a	KINETINA	9.0
30	Morel 1965 ^a	2,4-D	0.01
31	Morel 1965 ^a	2,4-D	0.1
32	Morel 1965 ^a	2,4-D	1.0

33	Morel 1965 ^a	2,4-D	3.0
34	Morel 1965 ^a	2,4-D	5.0
35	Morel 1965 ^a	2,4-D	7.0
36	Morel 1965 ^a	2,4-D	9.0
37	Morel 1965 ^a	BAP	0.01
38	Morel 1965 ^a	BAP	0.1
39	Morel 1965 ^a	BAP	1.0
40	Morel 1965 ^a	BAP	3.0
41	Morel 1965 ^a	BAP	5.0
42	Morel 1965 ^a	BAP	7.0
43	Morel 1965 ^a	BAP	9.0
44 (TESTIGO)	Morel 1965 ^a	-----	-----

6.3 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para facilitar la interpretación de la variables del experimento y procesar los resultados, se utilizó la distribución completamente al azar, en la cual en el momento que se debía hacer las lecturas de los tratamientos éstas se realizaron en un día. En los casos en que se obtuvo diferencias significativas entre tratamientos o factores por variable de respuesta, se efectuó un análisis utilizando la prueba de medias de Duncan al 5%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 NUMERO DE BROTES A LOS 20 DIAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

A los 20 días después de haber sido sembrado los explantes de semillas, se observó la inducción de brotes alrededor de las mismas. No todos los tratamientos generaron brotes.

Se observó que los tratamientos que tuvieran como medio basal MS, mostraron mayor número de brotes, mientras que los que tuvieron como medio basal Morel presentaron menor número de brotes.

Los tratamientos que se evaluaron con el regulador del crecimiento kinetina, mostraron un mayor número de brotes, los tratados con BAP le siguieron en número por ultimo los tratados con 2,4-D.

Estos resultados al someterlos a un análisis de varianza a los 20 días se determinó que para la variable de respuesta número de brotes (cuadro 3) mostró diferencias altamente significativas (1%) para los factores: medio de cultivo, regulador del crecimiento, la interacción medio de cultivo por regulador del crecimiento y regulador del crecimiento por nivel y significativa para medio de cultivo por nivel y medio de cultivo por regulador del crecimiento y nivel. En el cuadro tres se muestra el análisis para la variable número de brotes a los 20 días después de la siembra.

CUADRO 3. Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 20 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor de F	Pr > F
Bloques	9	45.89935129	1.66	0.0976 NS
Medio de cultivo	1	152.60740139	49.65	0.0001 **
Regulador del crecimiento	2	145.64767178	23.69	0.0001 **
Nivel	6	34.19301415	1.85	0.0880 NS
M * R	2	66.38914319	10.80	0.0001 **
M * N	6	39.95068210	2.17	0.0458 *
R * N	12	99.28855542	2.69	0.0018 **
M * R * N	12	80.48102827	2.18	0.0122 *
Error	341			

C.V. = 97.97959

** = Diferencias altamente significativas (1%)

* = Diferencias significativas (5%)

NS = No significativo (5%)

M = Medio de cultivo

R = Regulador del Crecimiento N

Nivel

7.1.1 NUMERO DE BROTES SEGÚN INTERACCIÓN MEDIO DE CULTIVO POR REGULADOR DEL CRECIMIENTO POR NIVEL, 20 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

Se determinó que el mayor número de brotes según prueba de Duncan, se obtuvo con el tratamiento medio de cultivo MS en combinación con el regulador del crecimiento kinetina con un nivel de 7 mg/l, dando como resultado un número promedio de brotes de 6.4, en orden descendente le

sigue un tratamiento estadísticamente igual, con la diferencia de que el regulador del crecimiento utilizado es el BAP con 9 mg/l y un promedio de brotes de 5.2. En el cuadro cuatro se muestra la prueba de Duncan para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento a los 20 días.

CUADRO 4. Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 20 días.

Tratamientos				Número de brotes	Prueba de Duncan al 5 %											
No.	Medio de cultivo	Regulador del crecimient	Nivel (mg/l)		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
6	MS	KIN	7	6.4	A											
21	MS	BAP	9	5.2	A	B										
3	MS	KIN	1	4.1		B	C									
17	MS	BAP	1	3.8		B	C	D								
7	MS	KIN	9	3.8		B	C	D	E							
4	MS	KIN	3	3.8		B	C	D	E							
2	MS	KIN	0.1	3.3			C	D	E	F						
19	MS	BAP	5	3.2			C	D	E	F	G					
18	MS	BAP	3	3.1			C	D	E	F	G					
16	MS	BAP	0.1	2.9			C	D	E	F	G					
10	MS	2,4D	1	2.5			C	D	E	F	G	H				
5	MS	KIN	5	2.4				D	E	F	G	H	I			
8	MS	2,4D	0.01	2.3				D	E	F	G	H	I			
24	Morel	KIN	0.1	2.3				D	E	F	G	H	I			
20	MS	BAP	7	2.2				D	E	F	G	H	I	J		
23	Morel	KIN	0.01	2.2				D	E	F	G	H	I	J		
15	MS	BAP	0.01	2.1					E	F	G	H	I	J	K	
31	Morel	2,4D	0.1	1.8					E	F	G	H	I	J	K	
9	MS	2,4D	0.1	1.7						F	G	H	I	J	K	L
1	MS	KIN	0.01	1.7						F	G	H	I	J	K	L
29	Morel	KIN	9	1.7						F	G	H	I	J	K	L
38	Morel	BAP	0.1	1.6							G	H	I	J	K	L
28	Morel	KIN	7	1.6							G	H	I	J	K	L
26	Morel	KIN	3	1.5							G	H	I	J	K	L
30	Morel	2,4D	0.01	1.1								H	I	J	K	L
11	MS	2,4D	3	1								H	I	J	K	L
36	Morel	2,4D	9	1								H	I	J	K	L
14	MS	2,4D	9	1								H	I	J	K	L
22	MS	TES	0	1								H	I	J	K	L
32	Morel	2,4D	1	0.9								H	I	J	K	L
44	Morel	TES	0	0.9								H	I	J	K	L
43	Morel	BAP	9	0.9								H	I	J	K	L
25	Morel	KIN	1	0.8								H	I	J	K	L
27	Morel	KIN	5	0.8								H	I	J	K	L
39	Morel	BAP	1	0.8								H	I	J	K	L
37	Morel	BAP	0.01	0.8								H	I	J	K	L
42	Morel	BAP	7	0.8								H	I	J	K	L
12	MS	2,4D	5	0.7								H	I	J	K	L

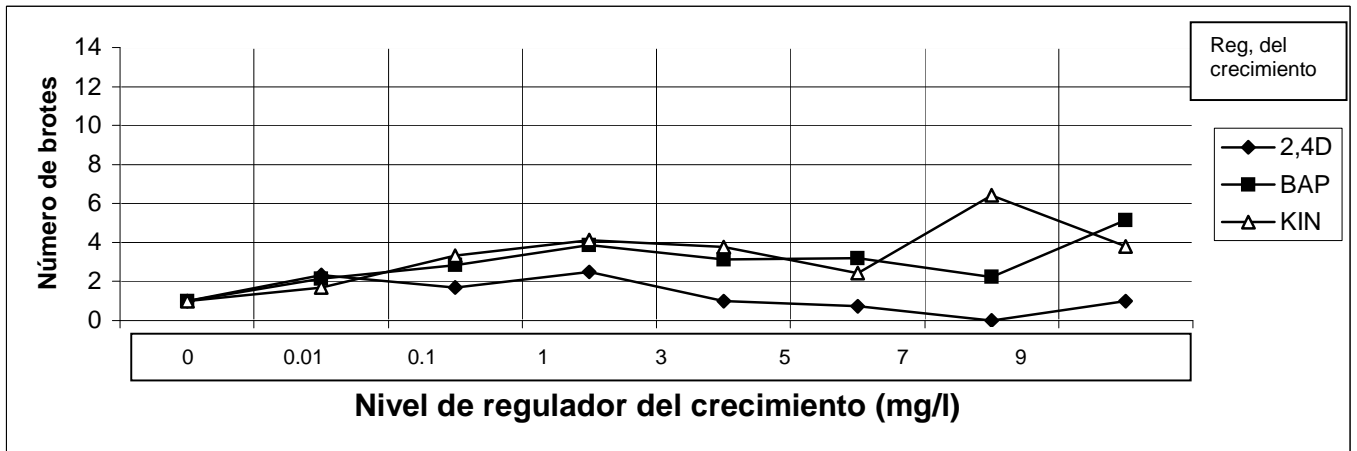


Figura 9. Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 20 días después de la siembra.

7.2 NÚMERO DE BROTES A LOS 35 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

En la segunda lectura se volvieron a evaluar los 44 tratamientos, en la cual la presencia de brotes fue mayor. En esta lectura nuevamente no todos los tratamientos generaron brotes. Asimismo en los tratamientos, el medio de cultivo MS predominó con relación a la respuesta de número de brotes y nuevamente los tratamientos con el medio basal Morel presentaron los valores menores a nivel general.

En esta segunda lectura el regulador del crecimiento kinetina, mostró un mayor número de brotes seguido por BAP y por el 2,4-D. Nuevamente se comparó el testigo absoluto con los tratamientos de ambos medios de cultivo (MS y Morel), observándose mayor número de brotes en los tratamientos que contenían reguladores del crecimiento.

Al someter al análisis de varianza para la variable de respuesta número de brotes 35 días después de la siembra de los explantes, mostraron diferencias altamente significativas (1%) para los factores: repetición, medio de cultivo, regulador del crecimiento, nivel, medio de cultivo por regulador del crecimiento, regulador del crecimiento por nivel y medio de cultivo por regulador del crecimiento por nivel. En el cuadro 5 se muestra el análisis de varianza para la variable número de brotes a los 35 días después de la siembra.

CUADRO 5. Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 35 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor de F	Pr > F
Bloques	9	107.75594716	2.87	0.0028 **
Medio de cultivo	1	610.04960036	146.17	0.0001 **
Regulador del crecimiento	2	438.45789414	52.53	0.0001 **
Nivel	6	94.07978134	3.76	0.0012 **
M * R	2	146.96822758	17.61	0.0001 **
M * N	6	15.67892356	0.63	0.7094 NS
R * N	12	243.45671780	4.86	0.0001 **
M * R * N	12	117.19789639	2.34	0.0068 **
Error	338			

C.V. = 94.52953

** = Diferencias altamente significativas (1%)

* = Diferencias significativas (5%)

NS = No significativo (5%)

M = Medio de cultivo R = regulador del crecimiento N = Nivel

7.2.1 NÚMERO DE BROTES SEGÚN INTERACCIÓN MEDIO DE CULTIVO POR REGULADOR DEL CRECIMIENTO POR NIVEL A LOS 35 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA.

El mayor número de brotes se obtuvo con el tratamiento medio de cultivo MS en combinación con el regulador del crecimiento kinetina con un nivel de 0.1 mg/l dando como resultado un promedio de 10.4 brotes. Se puede notar que transcurrido mayor tiempo con el mismo medio de cultivo y con menor concentración de regulador del crecimiento, se puede obtener mayor número de brotes como se muestra en el cuadro 6. Al respecto Hurtado y Merino (16), refieren que la actividad fisiológica de las plantas esta mediada por los reguladores del crecimiento.

CUADRO 6. Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 35 días.

No.	Tratamientos			Número de brotes	Prueba de Duncan al 5 %													
	Medio de cultivo	Regulador del crecimiento	Nivel (mg/l)		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
2	MS	KIN	0.1	10.4	A													
6	MS	KIN	7	8.0		B												
7	MS	KIN	9	6.1			C											
3	MS	KIN	1	5.1			C	D										
15	MS	BAP	0.01	5.0			C	D										
4	MS	KIN	3	4.8			C	D	E									
21	MS	BAP	9	4.5			C	D	E	F								
18	MS	BAP	3	4.4			C	D	E	F	G							
1	MS	KIN	0.01	4.1				D	E	F	G							
5	MS	KIN	5	4.0				D	E	F	G							
17	MS	BAP	1	3.8				D	E	F	G	H						
20	MS	BAP	7	3.5				D	E	F	G	H	I					
24	Morel	KIN	0.1	3.4				D	E	F	G	H	I	J				
8	MS	2,4D	0.01	3.2				D	E	F	G	H	I	J				
10	MS	2,4D	1	3.0					E	F	G	H	I	J				
19	MS	BAP	5	2.6						F	G	H	I	J	K			
9	MS	2,4D	0.1	2.3							G	H	I	J	K	L		
16	MS	BAP	0.1	2.1							G	H	I	J	K	L	M	
11	MS	2,4D	3	2.0								H	I	J	K	L	M	
23	Morel	KIN	0.01	1.9									H	I	J	K	L	
29	Morel	KIN	9	1.7										I	J	K	L	
12	MS	2,4D	5	1.6										I	J	K	L	
37	Morel	BAP	0.01	1.6										I	J	K	L	
14	MS	2,4D	9	1.6										I	J	K	L	
22	MS	TES	0	1.4											J	K	L	
28	Morel	KIN	7	0.9												K	L	
38	Morel	BAP	0.1	0.9												K	L	
25	Morel	KIN	1	0.8												K	L	
30	Morel	2,4D	0.01	0.7												K	L	
26	Morel	KIN	3	0.7												K	L	
39	Morel	BAP	1	0.6												K	L	
27	Morel	KIN	5	0.5													L	
31	Morel	2,4D	0.1	0.5													L	
44	Morel	TES	0	0.5													L	
43	Morel	BAP	9	0.4													L	
32	Morel	2,4D	1	0.4													L	
13	MS	2,4D	7	0.3													L	
34	Morel	2,4D	5	0.3													L	
41	Morel	BAP	5	0.2													L	
36	Morel	2,4D	9	0.2													M	
33	Morel	2,4D	3	0.2													M	
35	Morel	2,4D	7	0.1													M	
42	Morel	BAP	7	0.1													M	
40	Morel	BAP	3	0.0													N	

El comportamiento de los valores medios del número de brotes lo observamos en las figuras 10 y 11. Se puede apreciar en la figura 10 que

el mayor resultado de brotes en el medio Morel se obtuvo con el regulador del crecimiento kinetina dando como resultado 3.4 brotes con el nivel 0.1 mg/l. Al igual que en la figura 11 en la cual se presentan los resultados gráficamente del comportamiento del medio de cultivo MS, en donde el mejor resultado se obtuvo en combinación con el regulador del crecimiento kinetina en el nivel 0.1 mg/l dando como resultado 10.4 brotes en promedio. Se puede notar que en ambos medios de cultivo fue funcional el regulador del crecimiento kinetina en 0.1 mg/l. En esta segunda lectura el número de brotes va incrementando en comparación con la primera lectura en la cual se tuvieron 6.4 brotes, predominando el mismo medio de cultivo y el mismo regulador del crecimiento con la diferencia que esta tuvo efecto en menor concentración (MS y Kinetina).

Los resultados de los reguladores del crecimiento 2,4-D y BAP están por debajo de los resultados obtenidos cuando se utilizó el regulador del crecimiento kinetina, en ambos medios de cultivo.

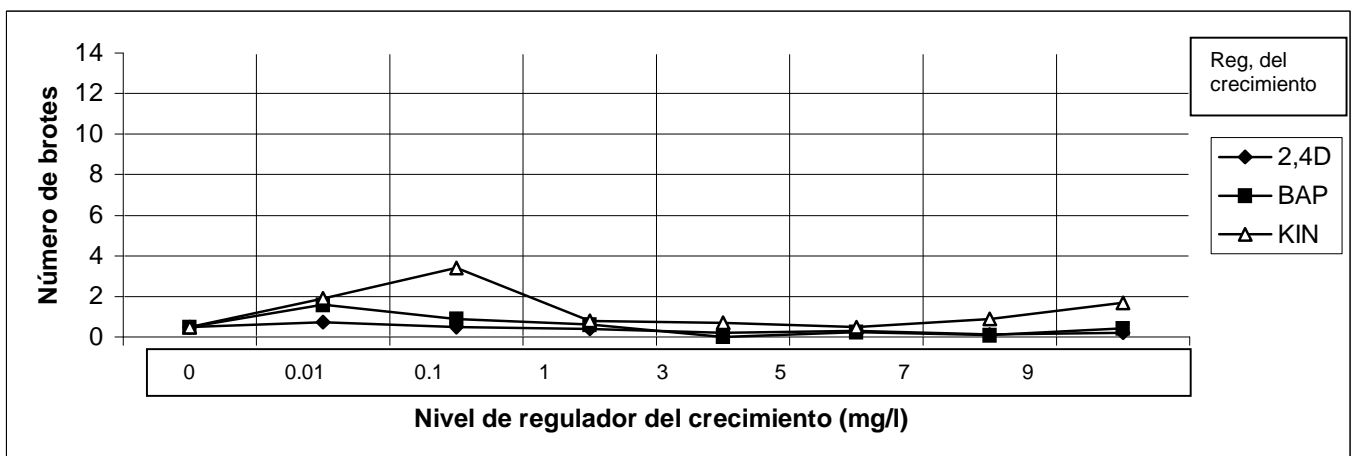


Figura 10. Número de brotes obtenidos con el medio Morel, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 35 días después de la siembra.

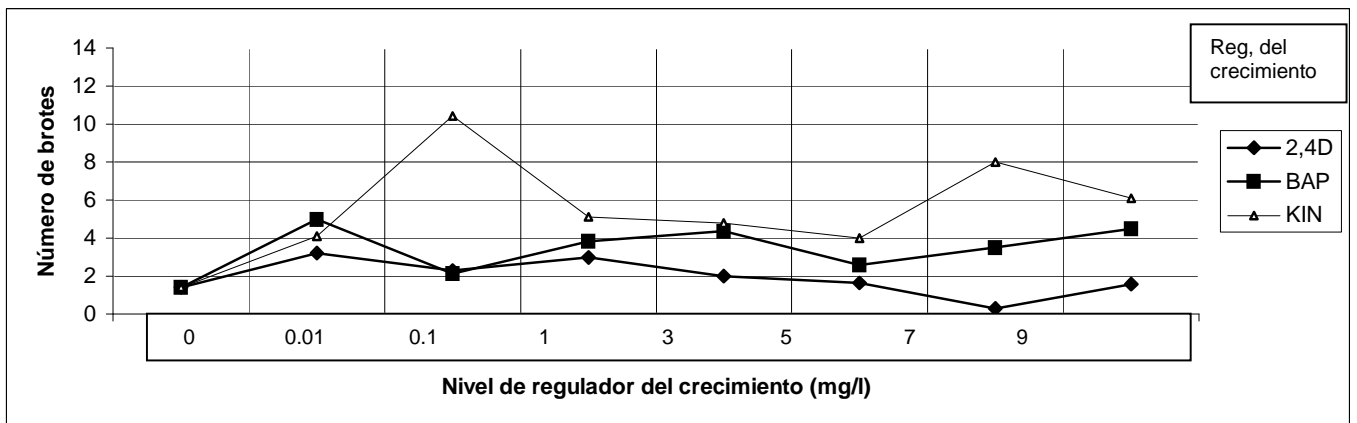


Figura 11. Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 35 días después de la siembra.

7.3 NUMERO DE BROTES A LOS 50 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

En la respuesta de los tratamientos para la inducción de brotes a los 50 días después de sembrados, nuevamente se observa la predominancia en la inducción de brotes por parte del medio de cultivo MS y a su vez por parte del regulador del crecimiento kinetina. A nivel general se inicia un proceso de degradación, la cual es notoria en el medio de cultivo Morel con la hormona 2,4-D. Esto puede ocurrir es debido a que el medio de cultivo Morel contiene pocas sales minerales y además el regulador del crecimiento 2,4-D en altas concentraciones funciona como un herbicida.

Al observar el comportamiento de los brotes a partir de la primera lectura (20 días después de la siembra), hasta los 50 días, se muestra un incremento rápido en número en la emisión de brotes.

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de brotes mostró diferencias altamente significativas (1%), para los factores: medio de cultivo, regulador del crecimiento, la interacción medio de cultivo por regulador del crecimiento, regulador del crecimiento por nivel y medio de cultivo por regulador del crecimiento por nivel y significativa para nivel de regulador del crecimiento. En el cuadro 7 se muestra el análisis de varianza para la variable número de brotes a los 50 días después de la siembra.

CUADRO 7. Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 50 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor de F	Pr > F
Bloques	9	36.23374942	0.41	0.9298 NS
Medio de cultivo	1	642.97873782	65.42	0.0001 **
Regulador del Crecimiento	2	1123.00334550	57.13	0.0001 **
Nivel	6	133.11568580	2.26	0.0377 *
M * R	2	623.94932009	31.74	0.0001 **
M * N	6	85.09255262	1.44	0.1975 NS
R * N	12	332.27301881	2.82	0.0011 **
M * R * N	12	313.44886708	2.66	0.0020 **
Error	332			

C.V. = 132.9308

** = Diferencias altamente significativas (1 %)

* = Diferencias significativas (5 %)

NS = No significativo (5%)

M = Medio de cultivo R = regulador del crecimiento N = Nivel

7.3.1 NÚMERO DE BROTES SEGÚN INTERACCIÓN MEDIO DE CULTIVO POR REGULADOR DEL CRECIMIENTO POR NIVEL, 50 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA.

Se determinó que el mayor número de brotes se obtuvo con el tratamiento medio de cultivo MS en combinación con el regulador del crecimiento kinetina con nivel de 0.1 mg/l. Dando como resultado un número promedio de brotes de 12.4. Para estos resultados, el medio basal que mostró el mayor número de brotes a los 50 días después de la siembra es el MS, el regulador del crecimiento kinetina y los niveles para este regulador fueron 0.1, 9 y 7 mg/l, los cuales presentaron un promedio de 12.4, 12.4 y 10.2 brotes. Se puede observar que el medio basal MS en combinación con el regulador del crecimiento kinetina sigue siendo efectiva para la estimulación en la emisión de brotes. En el cuadro 8 se muestra el comportamiento de los tratamientos.

CUADRO 8. Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 50 días.

No.	Tratamientos			Número de brotes	Prueba de Duncan al 5 %								
	Medio de cultivo	Regulador del crecimiento	Nivel (mg/l)										
2	MS	KIN	0.1	12.4	A								
7	MS	KIN	9	12.4	A								
6	MS	KIN	7	10.2	A								
3	MS	KIN	1	6.75		B							
18	MS	BAP	3	6.4		B							
1	MS	KIN	0.01	5.0		B	C						
21	MS	BAP	9	4.8		B	C	D					
4	MS	KIN	3	4.3		B	C	D	E				
5	MS	KIN	5	4.3		B	C	D	E				
15	MS	BAP	0.01	4.0		B	C	D	E	F			
20	MS	BAP	7	3.2			C	D	E	F	G		
19	MS	BAP	5	3.2			C	D	E	F	G	H	
17	MS	BAP	1	3.2			C	D	E	F	G	H	
16	MS	BAP	0.1	2.6			C	D	E	F	G	H	
37	Morel	BAP	0.01	2.1			C	D	E	F	G	H	
24	Morel	KIN	0.1	2.0			C	D	E	F	G	H	
23	Morel	KIN	0.01	2.0			C	D	E	F	G	H	
38	Morel	BAP	0.1	1.8				D	E	F	G	H	
29	Morel	KIN	9	1.6					E	F	G	H	
10	MS	2,4D	1	1.5					E	F	G	H	
28	Morel	KIN	7	1.2						F	G	H	
22	MS	TES	0	1.1						F	G	H	
9	MS	2,4D	0.1	1.1						F	G	H	
26	Morel	KIN	3	1.1						F	G	H	
43	Morel	BAP	9	1.0						F	G	H	
8	MS	2,4D	0.01	1.0						F	G	H	
27	Morel	KIN	5	0.9						F	G	H	
30	Morel	2,4D	0.01	0.9						F	G	H	
25	Morel	KIN	1	0.8							G	H	
39	Morel	BAP	1	0.7							G	H	
44	Morel	TES	0	0.6							G	H	
42	Morel	BAP	7	0.6							G	H	
11	MS	2,4D	3	0.5							G	H	
31	Morel	2,4D	0.1	0.5							G	H	
12	MS	2,4D	5	0.4							G	H	
41	Morel	BAP	5	0.4							G	H	
40	Morel	BAP	3	0.3							G	H	
35	Morel	2,4D	7	0.2							G	H	
14	MS	2,4D	9	0.1							G	H	
32	Morel	2,4D	1	0.1							G	H	
34	Morel	2,4D	5	0.1							G	H	
13	MS	2,4D	7	0.0								H	
33	Morel	2,4D	3	0.0									H
36	Morel	2,4D	9	0.0									H

Después de 50 días colocados en el medio de cultivo, cuando se utilizó el medio basal Morel el mayor resultado en promedio de número de brotes se obtuvo con el regulador del crecimiento BAP en el nivel 0.01

mg/l (2.1 brotes), KIN en el nivel 0.1 mg/l (2 brotes) y KIN el nivel 0.01 mg/l (2 brotes), resultado que según prueba de Duncan estadísticamente son valores iguales.

En el medio basal MS, el mejor resultado, en promedio de número de brotes, se da con la combinación del medio MS con el regulador del crecimiento kinetina, en el nivel 0.1 mg/l dando un promedio de 12.4 brotes, le sigue el tratamiento MS combinado con el regulador del crecimiento KIN en el nivel 9 mg/l (12.4 brotes), y MS con KIN en el nivel 7 mg/l (10.2 brotes), en la que estadísticamente fueron resultados estadísticamente iguales según Prueba de Duncan. En la figura 12 se muestra el número de brotes con el medio Morel según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 50 días después de la siembra.

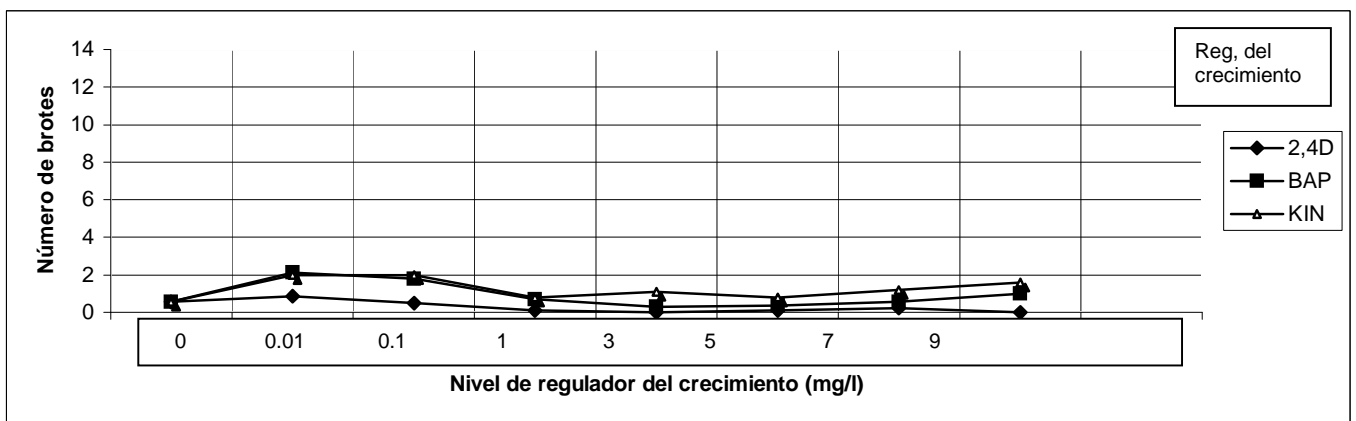


Figura 12. Número de brotes obtenidos con el medio MOREL, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 50 días después de la siembra.

En la figura 13 se muestra el número de brotes con el medio MS según regulador del crecimiento y niveles aplicados a los 50 días después de la siembra.

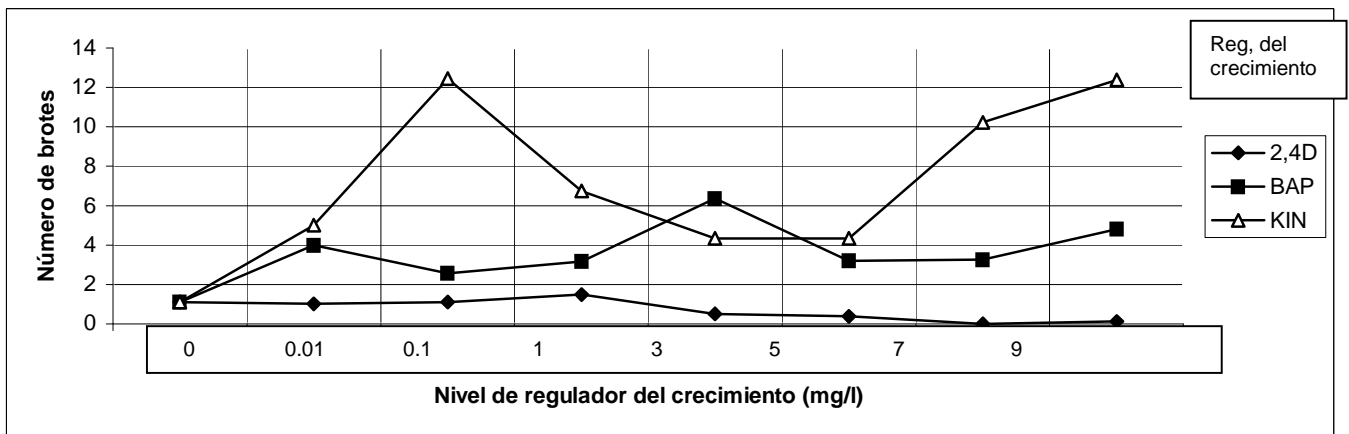


Figura 13. Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 50 días después de la siembra.

7.4 NÚMERO DE BROTES A LOS 65 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

Como resultado de los 44 tratamientos evaluados en la cuarta lectura, realizada 65 días después de la siembra nuevamente el medio de cultivo MS presenta el mayor número de brotes en comparación al medio de cultivo Morel. Así mismo sobresale nuevamente el regulador kinetina con la diferencia que en esta lectura predominan los niveles altos. En esta lectura se estabiliza la multiplicación de brotes por lo que se puede decir que en esta fase entran en una fase estacionaria, producida por el agotamiento de algún nutriente el medio de cultivo o la acumulación de un desecho celular que en cantidades altas se vuelve tóxica o la ocurrencia de las dos causas.

En esta lectura al ser sometidos a un análisis de varianza para esta variable de respuesta, se muestran diferencias altamente significativas (1%), para los factores: medio de cultivo, regulador del crecimiento, la interacción medio de cultivo por regulador del crecimiento, regulador del crecimiento por nivel y significativa para el medio de cultivo por regulador del crecimiento por nivel. En el cuadro 9 se muestra el análisis de varianza de la variable número de brotes a los 65 días.

CUADRO 9. Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 65 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor de F	Pr > F
Bloques	9	93.41526321	0.94	0.4931 NS
Medio de cultivo	1	897.30494111	80.98	0.0001 **
Regulador del crecimiento	2	1143.35604236	51.60	0.0001 **
Nivel	6	106.15536672	1.60	0.1473 NS
M * R	2	501.99550900	22.65	0.0001 **
M * N	6	35.18163110	0.53	0.7860 NS
R * N	12	412.50613825	3.10	0.0003 **
M * R * N	12	280.07394168	2.11	0.0162 *
Error	328			

C.V. = 132.9372

** = Diferencias altamente significativas (1 %)

* = Diferencias significativas (5 %)

NS = No significativo (> 5%)

M = Medio de cultivo R = Regulador del crecimiento N = Nivel

7.4.1 NÚMERO DE BROTES SEGÚN INTERACCIÓN MEDIO DE CULTIVO POR REGULADOR DEL CRECIMIENTO POR NIVEL A LOS 65 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA.

El mayor número de brotes se obtuvo con el tratamiento medio de cultivo MS en combinación con el regulador del crecimiento kinetina en el nivel 9 mg/l, dando como resultado un promedio de 12.9 brotes, Le sigue en forma ascendente el tratamiento MS, combinado con el regulador del crecimiento kinetina en el nivel 7 mg/l presentando un promedio de 10.1 brotes. En el cuadro 10 se muestra la prueba de Duncan para la comparación de promedios de número de brotes a los 65 días después de la siembra.

CUADRO 10. Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 65 días.

No.	Tratamientos			Número de brotes	Prueba de Duncan al 5 %															
	Medio de cultivo	Regulador del crecimiento	Nivel (mg/l)		A	B	C	D	E	F	G	H	I							
7	MS	KIN	9	12.9	A															
6	MS	KIN	7	10.1		B														
2	MS	KIN	0.1	10.0		B														
1	MS	KIN	0.01	9.9		B														
18	MS	BAP	3	7.0			C													
15	MS	BAP	0.01	6.0			C	D												
17	MS	BAP	1	5.8			C	D												
3	MS	KIN	1	5.8			C	D												
5	MS	KIN	5	4.7			C	D	E											
21	MS	BAP	9	4.3			C	D	E	F										
4	MS	KIN	3	4.0			C	D	E	F	G									
19	MS	BAP	5	3.6				D	E	F	G	H								
10	MS	2,4D	1	3.4				D	E	F	G	H	I							
16	MS	BAP	0.1	3.0				D	E	F	G	H	I							
20	MS	BAP	7	2.9				D	E	F	G	H	I							
24	Morel	KIN	0.1	2.5					E	F	G	H	I							
29	Morel	KIN	9	2.5					E	F	G	H	I							
8	MS	2,4D	0.01	1.9					E	F	G	H	I							
23	Morel	KIN	0.01	1.8					E	F	G	H	I							
12	MS	2,4D	5	1.3						F	G	H	I							
37	Morel	BAP	0.01	1.2						F	G	H	I							
28	Morel	KIN	7	1.2						F	G	H	I							
27	Morel	KIN	5	1.1						F	G	H	I							
22	MS	TES	0	1.0						F	G	H	I							
43	Morel	BAP	9	1.0						F	G	H	I							
38	Morel	BAP	0.1	0.9							G	H	I							
25	Morel	KIN	1	0.9							G	H	I							
9	MS	2,4D	0.1	0.8							G	H	I							
26	Morel	KIN	3	0.8							G	H	I							
39	Morel	BAP	1	0.8							G	H	I							
42	Morel	BAP	7	0.7							G	H	I							
11	MS	2,4D	3	0.6								H	I							
30	Morel	2,4D	0.01	0.6								H	I							
41	Morel	BAP	5	0.4								H	I							
40	Morel	BAP	3	0.3								H	I							
31	Morel	2,4D	0.1	0.2								H	I							
44	Morel	TES	0	0.1									I							
14	MS	2,4D	9	0.0									I							
13	MS	2,4D	7	0.0									I							
32	Morel	2,4D	1	0.0									I							
33	Morel	2,4D	3	0.0									I							
34	Morel	2,4D	5	0.0									I							
35	Morel	2,4D	7	0.0									I							
36	Morel	2,4D	9	0.0									I							

Al utilizar como medio basal Morel, el mejor resultado en cuanto al número de brotes, se obtuvo con la combinación del regulador del

crecimiento KIN en el nivel 0.1 mg/l, con 2.5 brotes al igual que kinetina en el nivel 9 mg/l con igual número de brotes (2.5). El mejor resultado cuando se utilizó el medio basal MS se obtuvo con el regulador del crecimiento KIN en el nivel 9 mg/l con un promedio de 12.9 brotes. En esta lectura se puede notar que mientras mayor es el tiempo los requerimientos de los reguladores del crecimiento también son mayores, con relación a los niveles.

En las figuras 14 y 15 se puede observar el comportamiento de los valores medios de los números de brotes de los tratamientos a los 65 días después de la siembra de los explantes en los medios basales.

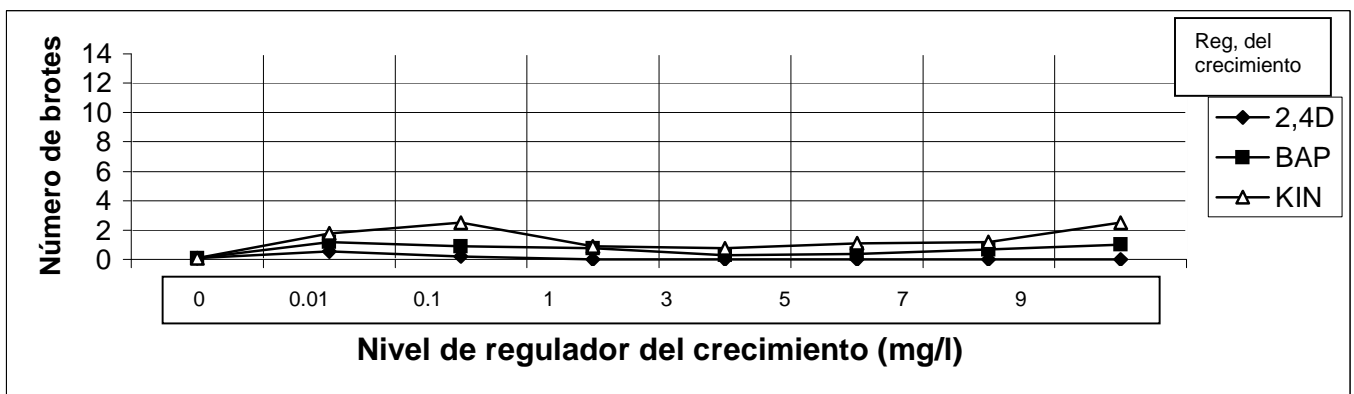


Figura 14. Número de brotes obtenidos con el medio MOREL, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 65 días después de la siembra.

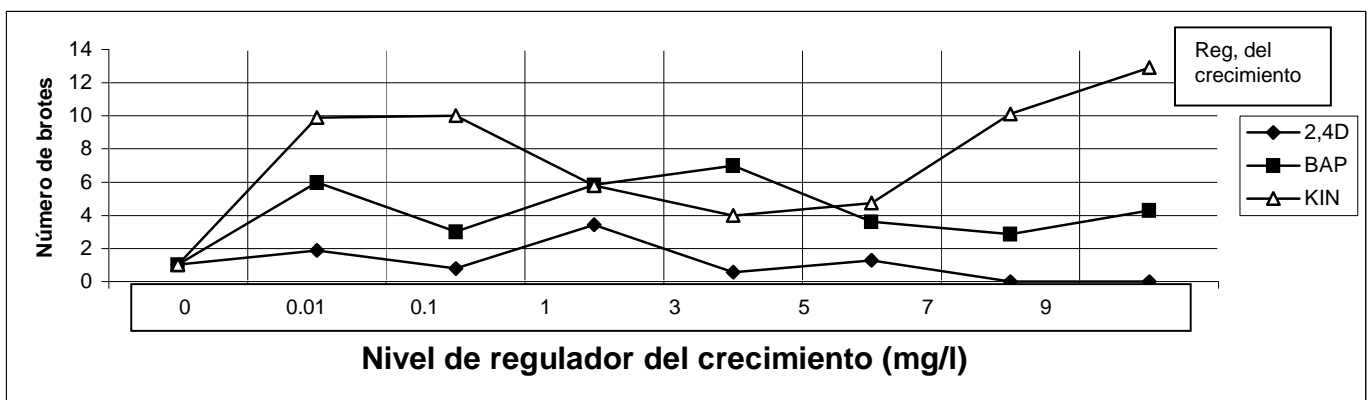


Figura 15. Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 65 días después de la siembra.

7.5 NÚMERO DE BROTES A LOS 80 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

En la quinta lectura realizada a los 80 días después de la siembra el medio basal MS en combinación con kinetina mostró el mayor número de brotes. El medio basal MS combinado con kinetina en el nivel 9 mg/l fue el que mejor resultado mostró.

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de brotes mostró diferencias altamente significativas (1%), para los factores: medio de cultivo, regulador del crecimiento, la interacción medio de cultivo por regulador del crecimiento, regulador del crecimiento por nivel y significativa para el medio de cultivo por regulador del crecimiento por nivel. En cuadro 11 se muestra el análisis de varianza para la variable número de brotes a los 80 días, después de la siembra.

CUADRO 11. Análisis de varianza de la variable número de brotes a los 80 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor de F	Pr > F
Bloques	9	68.59080259	0.70	0.7107 NS
Medio de cultivo	1	895.41049389	82.00	0.0001 **
Regulador del crecimiento	2	1096.15519469	59.19	0.0001 **
Nivel	6	125.91387392	1.92	0.0769 NS
M * R	2	562.53727772	25.76	0.0001 **
M * N	6	40.52035038	0.62	0.7155 NS
R * N	12	362.05327478	2.76	0.0014 **
M * R * N	12	241.34541209	1.84	0.0411 *
Error	312			

C.V. = 131.9617

** = Diferencias altamente significativas (1 %)

* = Diferencias significativas (5 %)

NS = No significativo (> 5%)

M = Medio de cultivo R = Regulador del crecimiento N = Nivel

7.5.1 NÚMERO DE BROTES SEGÚN INTERACCIÓN MEDIO DE CULTIVO POR REGULADOR DEL CRECIMIENTO POR NIVEL, 80 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA.

Al analizar el ensayo a los 80 días después de la siembra en la quinta lectura se determinó que los mejores resultados según prueba de Duncan, fueron los tratamientos medio de cultivo MS por el regulador del crecimiento KIN en el nivel 9 mg/l (12.1 brotes), MS por el regulador del crecimiento KIN en el nivel 0.1 mg/l (10.3 brotes), MS por el regulador del crecimiento KIN en el nivel 7 mg/l (10.1 brotes) y MS por el regulador del crecimiento KIN en el nivel 0.01 mg/l (9.9 brotes), los cuales estadísticamente fueron iguales.

En esta quinta lectura, es evidente que los protocormos exigen que la concentración de regulador del crecimiento, en este caso kinetina, sea más alta, quizás por el número de brotes presentes. Así mismo se nota que en esta quinta lectura el número de brotes declina, pues al comparar estos resultados con la cuarta lectura estos son similares. En el cuadro 12 se muestra los resultados de la prueba de Duncan para la comparación de medios de número de brotes para cada tratamiento a los 80 días después de la siembra.

CUADRO 12. Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de número de brotes para cada tratamiento, a los 80 días.

Tratamientos	Número	Prueba de Duncan al 5 %
--------------	--------	-------------------------

No.	Medio de cultivo	Regulador del crecimiento	Nivel (mg/l)	de brotes														
7	MS	KIN	9	12.1	A													
2	MS	KIN	0.1	10.3	A													
6	MS	KIN	7	10.1	A	B												
1	MS	KIN	0.01	9.9	A	B												
18	MS	BAP	3	7.2		B	C											
17	MS	BAP	1	6.7			C	C										
3	MS	KIN	1	6.5			C	C	E									
15	MS	BAP	0.01	5.3			C	C	E	F								
21	MS	BAP	9	5.0			C	C	E	F	G							
5	MS	KIN	5	4.7			C	C	E	F	G	H						
4	MS	KIN	3	4.0				C	E	F	G	H	I					
19	MS	BAP	5	3.8				C	E	F	G	H	I	J				
16	MS	BAP	0.1	3.3					E	F	G	H	I	J	K			
20	MS	BAP	7	2.9						F	G	H	I	J	K			
10	MS	2,4D	1	2.7						F	G	H	I	J	K			
24	Morel	KIN	0.1	2.4						F	G	H	I	J	K			
9	MS	2,4D	0.1	2.2						F	G	H	I	J	K			
29	Morel	KIN	9	2.1						F	G	H	I	J	K			
23	Morel	KIN	0.01	1.8							G	H	I	J	K			
8	MS	2,4D	5	1.4							G	H	I	J	K			
38	Morel	BAP	0.1	1.2										I	J	K		
28	Morel	KIN	7	1.1										I	J	K		
37	Morel	BAP	0.01	1.0										I	J	K		
27	Morel	KIN	5	0.9										I	J	K		
25	Morel	KIN	1	0.8										I	J	K		
39	Morel	BAP	1	0.8										I	J	K		
43	Morel	BAP	9	0.7										I	J	K		
22	MS	TES	0	0.7										I	J	K		
26	Morel	KIN	3	0.4											J	K		
30	Morel	2,4D	0.01	0.4											J	K		
41	Morel	BAP	5	0.4											J	K		
42	Morel	BAP	7	0.3											J	K		
40	Morel	BAP	3	0.3												K		
11	MS	2,4D	3	0.2												K		
12	MS	2,4D	5	0.1												K		
44	Morel	TES	0	0.1												K		
31	Morel	2,4D	0.1	0.1												K		
14	MS	2,4D	9	0.0												K		
13	MS	2,4D	7	0.0												K		
32	Morel	2,4D	1	0.0												K		
33	Morel	2,4D	3	0.0												K		
34	Morel	2,4D	5	0.0												K		
35	Morel	2,4D	7	0.0												K		
36	Morel	2,4D	9	0.0												K		

Cuando se utilizó el medio Morel, el mejor resultado se obtuvo con la combinación del regulador del crecimiento KIN en el nivel 0.1 mg/l, dando un resultado de 2.4 brotes. Cuando se utilizó como medio basal MS,

el mayor número de brotes se obtuvo combinado con el regulador del crecimiento KIN en el nivel 9 mg/l con un promedio de 12.1 brotes.

En las figuras 16 y 17 se puede observar el comportamiento de los valores medios de los números de brotes de los tratamientos a los 80 días después de la siembra de los explantes en los medios.

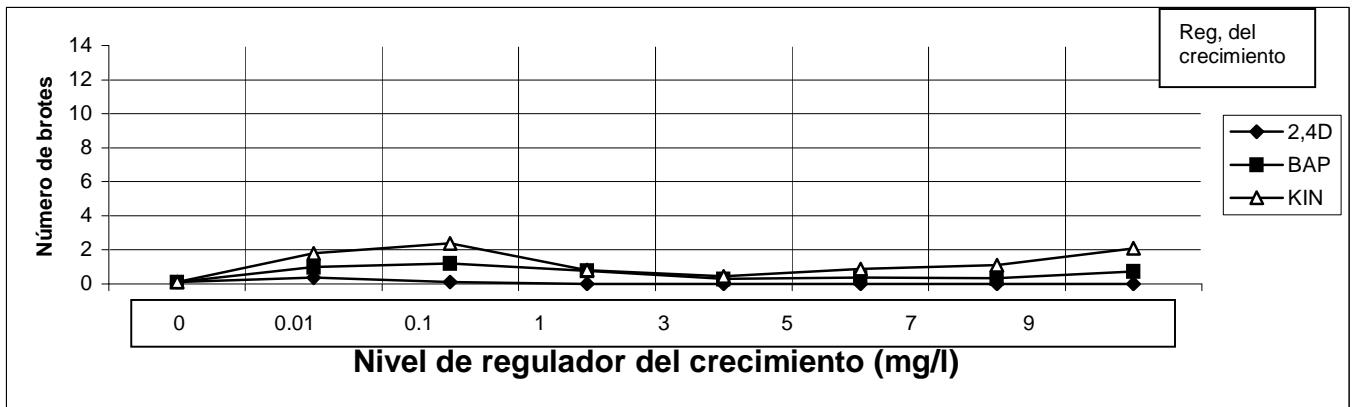


Figura 16. Número de brotes obtenidos con el medio MOREL, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 80 días después de la siembra.

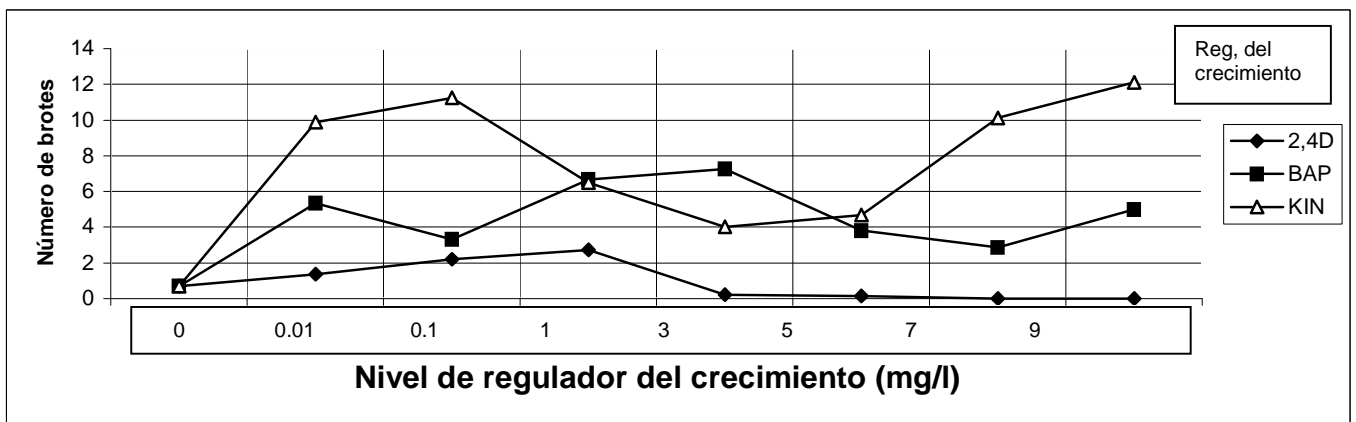


Figura 17. Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 80 días después de la siembra.

En el cuadro 13 se muestra el resumen de los promedios sobresalientes de las cinco lecturas realizadas para determinar el número de brotes.

CUADRO 13. Resumen de los promedios de las cinco lecturas sobre el número de brotes.

LECTURA	No. De días después de la siembra	Medio de cultivo	Regulador del crecimiento	nivel	Número de brotes Por tratamiento
1	20	MS	kinetina	7 mg/l	6.4
2	35	MS	kinetina	0.1 mg/l	10.4
3	50	MS	kinetina	0.1 mg/l	12.4
4	65	MS	kinetina	9 mg/l	12.9
5	80	MS	kinetina	9 mg/l	12.1

Al analizar el promedio del número de brotes de las cinco lecturas determinadas en diferentes tiempos y en diferentes niveles del regulador del crecimiento, y con los medios basales evaluados, se considera que, en general, el mejor tratamiento fue el medio MS con 0.1 mg/l de kinetina.

Con el medio basal MS y 0.1 mg/l de kinetina se puede producir en 35 días 10 brotes, lo cual supera la producción de brotes en función del tiempo y supera ampliamente los tratamientos con 0.1 y 9 mg/l, a los 50, 65 y 80 días con el mismo regulador del crecimiento y el mismo medio basal. Además existe la tendencia de que a mayor concentración de los reguladores de crecimiento existe una mayor probabilidad de causar variaciones somaclonales y finalmente, el costo de utilizar a 9 mg/l de kinetina es aproximadamente 90 veces más caro que utilizar 0.1 mg/l lo cual lógicamente, incrementarían los costos de producción.

7.6 ALTURA DE BROTES A LOS 80 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

A los 80 días después de haber sido sembrada las semillas en los medios basales inició el crecimiento de los brotes. El medio basal que mejor indujo a la altura de los brotes fue Morel en combinación con kinetina a una concentración de 1 mg/l dando como resultado de 30 mm, siguiéndole en resultado el medio MS en combinación con kinetina en el nivel 1 mg/l dando como resultado de 27 mm,

Los tratamientos que se trataron con el regulador del crecimiento kinetina mostraron mayor altura en ambos medios basales seguido por BAP y por último 2, 4-D.

Estos resultados al someterlos a un análisis de varianza se determinó que para la variable de respuesta número de brotes, mostró diferencias altamente significativas (1%) para el factor regulador del crecimiento, y significativa para medio de cultivo y nivel. En el cuadro

14 se muestra el análisis para la variable altura de brotes a los 80 días después de la siembra.

CUADRO 14. Análisis de varianza de la variable altura de brotes a los 80 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor de F	Pr > F
Bloques	9	2465.620222	2.41	0.0140 NS
Medio de cultivo	1	580.484640	5.11	0.0253 *
Regulador del crecimiento	2	1770.743571	7.80	0.0006 **
Nivel	6	1692.951319	2.48	0.0257 *
M * R	2	505.027911	2.22	0.1119 NS
M * N	6	325.624208	0.48	0.8240 NS
R * N	11	1770.376404	1.42	0.1711 NS
M * R * N	6	351.572284	0.52	0.7955 NS
Error	144			

C.V. = 67.42607

** = Diferencias altamente significativas (1 %)

* = Diferencias significativas (5 %)

NS = No significativo (> 5%)

M = Medio de cultivo R = Regulador del crecimiento N = Nivel

7.6.1 ALTURA DE BROTES SEGÚN INTERACCIÓN MEDIO DE CULTIVO POR REGULADOR DEL CRECIMIENTO POR NIVEL, 80 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

De acuerdo a los resultados de la variable altura de brotes se establece que la que presentó el mejor resultado se obtiene con el medio de cultivo Morel en combinación con el regulador del crecimiento kinetina en el nivel 1 mg/l a los 80 días después de la siembra, le sigue en orden descendente el medio basal MS y kinetina en el nivel de 1 mg/l y el medio basal Morel con kinetina en el nivel de 1 mg/l. En el cuadro 15 se muestran los resultados del crecimiento en altura de los brotes a los 80 días después de la siembra.

CUADRO 15. Prueba de Duncan al 5% para la comparación de promedios de altura de brotes para cada tratamiento, a los 80 días.

Tratamientos	Altura	Prueba de Duncan
--------------	--------	------------------

No.	Medio de cultivo	Regulador del crecimiento	Nivel (mg/l)	de brotes (mm)	al 5 %			
25	Morel	KIN	1	30	A			
3	MS	KIN	1	27	A	B		
23	Morel	KIN	0.01	27	A	B		
1	MS	KIN	0.01	24	A	B	C	
6	MS	KIN	7	21	A	B	C	D
17	MS	BAP	1	21	A	B	C	D
24	Morel	KIN	0.1	21	A	B	C	D
21	MS	BAP	9	20	A	B	C	D
2	MS	KIN	0.1	20	A	B	C	D
15	MS	BAP	0.01	19	A	B	C	D
19	MS	BAP	5	17	A	B	C	D
8	MS	2,4D	0.01	16	A	B	C	D
26	Morel	KIN	3	16	A	B	C	D
38	Morel	BAP	0.1	16	A	B	C	D
41	Morel	BAP	5	15	A	B	C	D
16	MS	BAP	0.1	15	A	B	C	D
9	MS	2,4D	0.1	14	A	B	C	D
22	MS	TES	0	13	A	B	C	D
7	MS	KIN	9	12	A	B	C	D
4	MS	KIN	3	12	A	B	C	D
5	MS	KIN	5	12	A	B	C	D
39	Morel	BAP	1	11		B	C	D
27	Morel	KIN	5	10		B	C	D
20	MS	BAP	7	10		B	C	D
43	Morel	BAP	9	10		B	C	D
44	Morel	TES	0	10		B	C	D
32	Morel	2,4D	1	9		B	C	D
30	Morel	2,4D	0.01	7			C	D
11	MS	2,4D	3	7			C	D
12	MS	2,4D	5	7			C	D
28	Morel	KIN	7	7			C	D
29	Morel	KIN	9	6			C	D
14	MS	2,4D	9	5				D
37	Morel	BAP	0.01	4				D
34	Morel	2,4D	5	3				D
40	Morel	BAP	3	3				D
31	Morel	2,4D	0.1	3				D
13	MS	2,4D	7	0				D
18	MS	BAP	3	0				D
10	MS	2,4D	1	0				D
42	Morel	BAP	7	0				D
36	Morel	2,4D	9	0				D
35	Morel	2,4D	7	0				D
33	Morel	2,4D	3	0				D

El comportamiento de los brotes en relación a la altura, fue mejor en el medio basal Morel, el que presentó mejores resultados fue el tratamiento con kinetina en el nivel de 1 mg/l presentando un resultado promedio de 30 mm de altura, superando éste al resto de los tratamientos.

En el medio basal MS, el mejor resultado se obtuvo con la combinación del regulador del crecimiento kinetina en el nivel 1 mg/l dando como resultado 27 mm de altura. El 2,4-D es un regulador del crecimiento que tiene tendencia a tener una menor respuesta esto puede deberse a su efecto inhibitor, principalmente en altas concentraciones. En las figuras 18 y 19 puede apreciarse el comportamiento de los valores medios de la variable altura de brotes notándose en ella las distintas interacciones entre los niveles de regulador del crecimiento para los medios de cultivo Morel y MS.

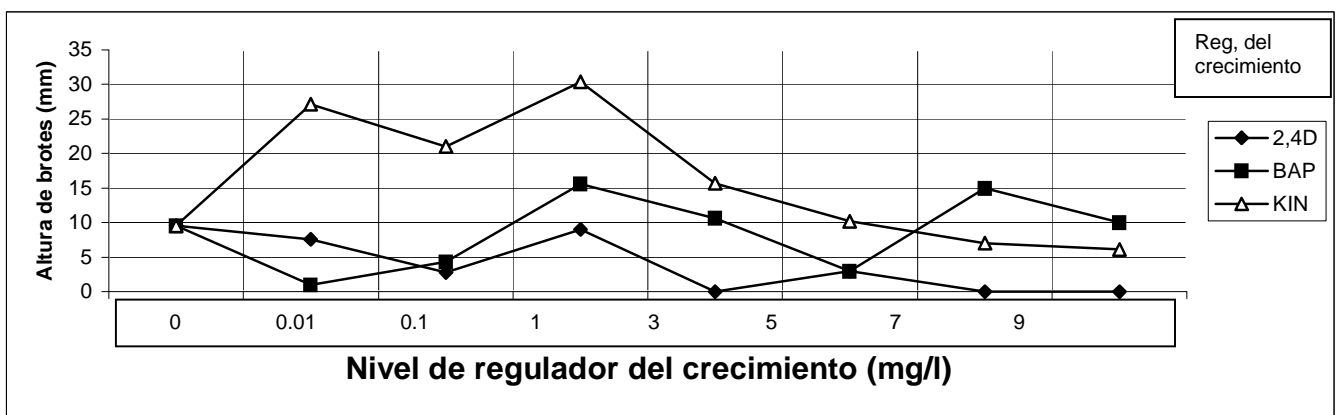


Figura 18. Altura de brotes obtenidos con el medio MOREL, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 80 días después de la siembra.

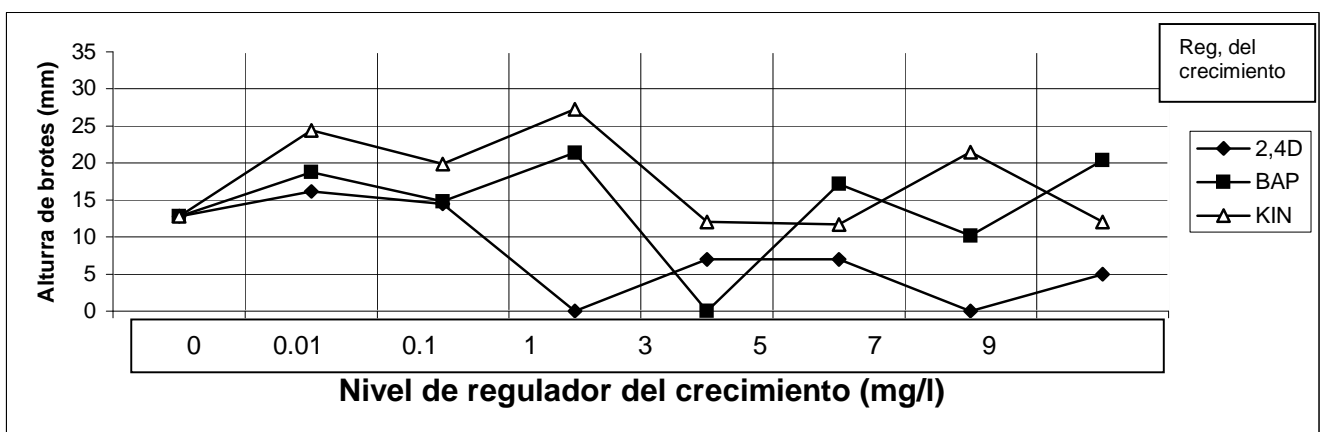


Figura 19. Número de brotes obtenidos con el medio MS, según regulador de crecimiento y niveles aplicados, a los 80 días después de la siembra.

De los dos medios basales evaluados, MS y Morel, con relación a la respuesta de todos los tratamientos a la altura de brotes, se observa que existe una diferencia siendo en este caso más efectiva la respuesta del

medio MS debido a que a nivel general presentó un promedio de 13.3 mm de altura en comparación con el medio Morel que tubo una respuesta de 9.5 mm de altura. Esta diferencia quizás se deba a que el medio MS posee una mayor cantidad de nutrientes en su composición como medio, en comparación con el medio de Morel. En la figura 20 se muestra la altura de brotes según el medio de cultivo.

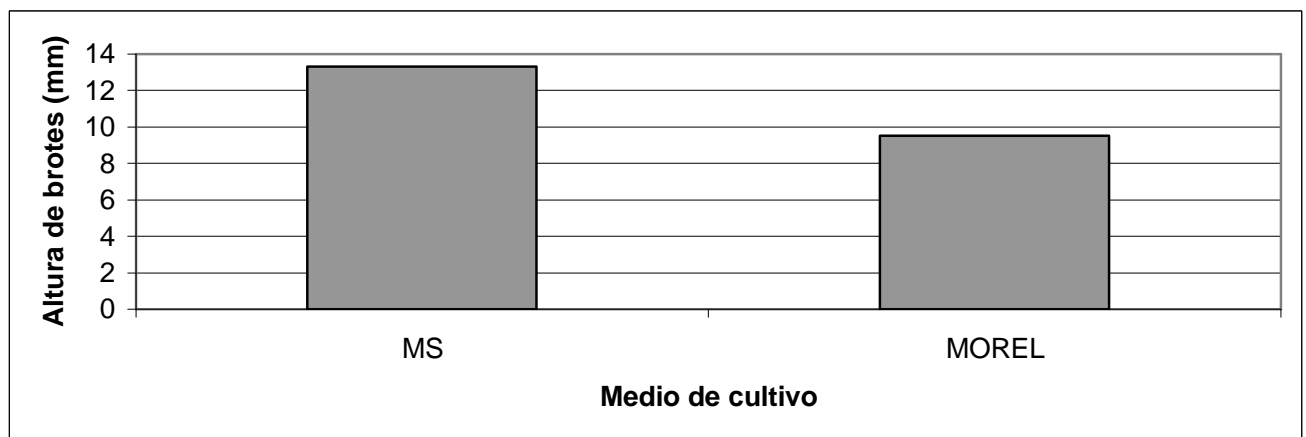


Figura 20. Altura de brotes según medio de cultivo.

El regulador del crecimiento que mejor respuesta presentó a nivel global es kinetina con un promedio de altura 18 mm le siguen en orden descendente BAP con 12 mm, el testigo con 12 mm en altura en altura y 2,4D con 5 mm en altura. Con estos resultados se determina que fue más efectivo el regulador del crecimiento kinetina. BAP superó el resultado de 2,4D y presentó similar resultado que el testigo. En la figura 21 se muestra gráficamente la altura de brotes según el regulador del crecimiento.

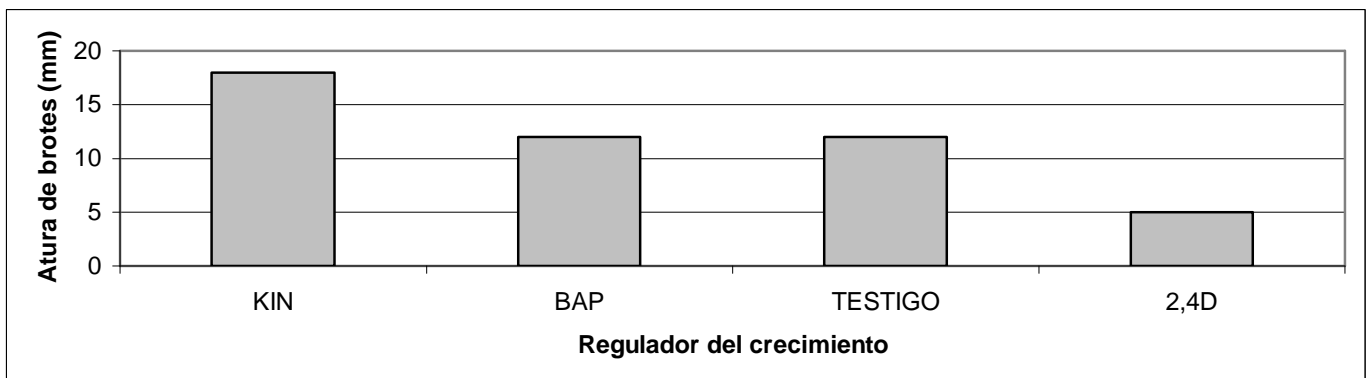


Figura 21. Altura de brotes según regulador del crecimiento.

Al analizar los resultados sobre la altura promedio de brotes a nivel global según el nivel de regulador del crecimiento aplicado, se observa que fue efectivo el nivel 1 mg/l, el cual presentó un promedio de 29 mm de altura en ambos medios de cultivo, siguiendo el nivel de 0.01 mg/l con 26 mm de altura, el nivel 0.1 mg/l con 21 mm de altura, el nivel 7 y 3 mg/l con 14 mm de altura, nivel 5 mg/l de altura, 11 mm de altura y nivel 9 mg/l, con 9 mm de altura y el testigo no presentó crecimiento en los brotes.

Con estos resultados se visualiza que el nivel con mayor efectividad para la estimulación a la altura de brotes es 1 mg/l. En la figura 22 se muestra el comportamiento de la altura de brotes según el regulador del crecimiento de kinetina.

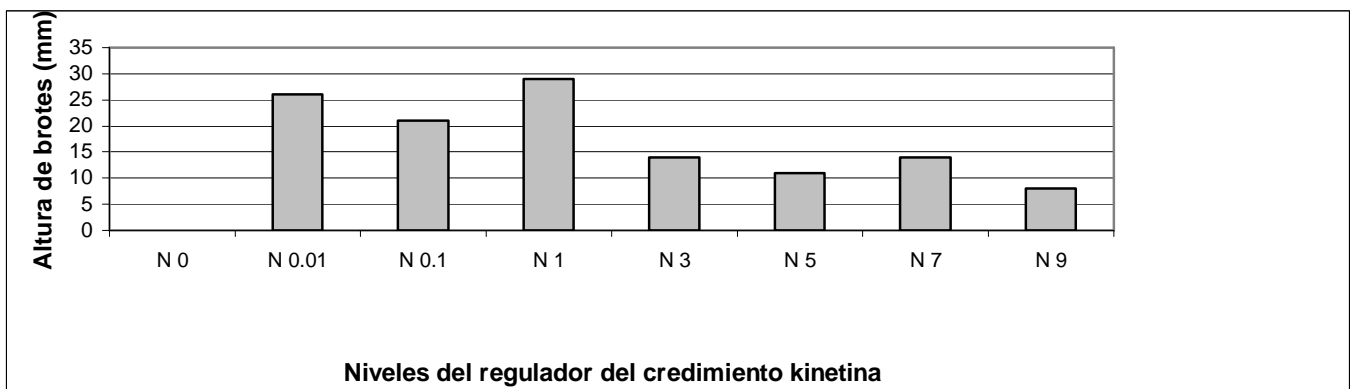


Figura 22. Altura de brotes aplicando regulador del crecimiento kinetina y su respuesta en diferentes niveles

8. CONCLUSIONES

1. De los medios basales evaluados, el que presentó el mayor número de brotes fue el de Murashige y Skoog (MS).
2. De los reguladores del crecimiento que se evaluaron, el que mayor número de brotes indujo fue kinetina.

3. De los niveles de regulador evaluados el que mejor resultado presento en cuanto al número de brotes fue con la concentración de 0.1 mg/l de kinetina.
4. El medio basal MS en combinación con el regulador del crecimiento kinetina en el nivel 0.1 mg/l, es un medio adecuado para la micropropagación de Monja Blanca.
5. A partir de los 80 días después de sembrado los protocormos, en el medio de cultivo Morel en combinación con el regulador del crecimiento kinetina en el nivel 1 mg/l, se obtiene una mejor altura en los brotes (30 mm), sin embargo considerando todos los tratamientos, en el medio basal MS se obtiene mayor altura, en promedio.

9. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que a partir de los 35 días después de la siembra de los protocormos iniciar los subcultivos en el medio MS utilizando 0.1 mg/l del regulador del crecimiento kinetina.
2. Se sugiere realizar investigaciones para inducir el enraizamiento de los brotes, utilizando AIB, ANA y AIA, en diferentes concentraciones.

3. Se sugiere realizar investigaciones con otros medios de cultivo así como otros reguladores del crecimiento en otros niveles para inducir el rápido crecimiento de los brotes.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUILAR, M.A. 1,982. Especies animales y vegetales en vías de extinción. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamento de Ecología y Ciencia Ambiental. 50 p.
2. _____; VASQUEZ, J. 1,983. Trabajo sobre los recursos naturales renovables elaborado por Dirya e Inafor. En: Congreso Nacional de Agronomía Sobre Recursos Naturales Renovables de Guatemala, Suelo, Agua, Flora, Fauna y Bosque (3., 1982, Antigua Guatemala). Guatemala, Dirección General de Servicios Agrícolas. p. 43-89.

3. AMES, O.; CORLEE, D.S. 1,953. Orchids of Guatemala. Chicago, USA, Natural History Museum. Fieldiana: Botany. 395 p.
4. AMMIRATO, P.; EVANS, D.; SHARP, W. 1,990. Hand book of plant cell culture ornamental species. New York, McGraw Hill. v. 5, 833 p.
5. ARCHILA, E.; FAJARDO, E.; DURAN, J. 1996 Rescate de orquídeas en peligro de extinción a partir de cultivo de tejidos. Simposio Nacional Sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (1., 1,996, Guatemala). Ed. por E. Archiva, E. Fajardo y J. Duran. Guatemala, s.e. 129 p.
6. BARCELO, J.; NICOLAS, G.; SABATER, B.; SÁNCHEZ, R. 1,980. Fisiología vegetal. Madrid, España, Pirámide. 750 p.
7. CRONQUIST, A. 1,977. Introducción a la botánica. Trad. Antonio Marino Ambrosio. México, CECSA. 848 p.
8. ESCALANT, J.V. 1,996. El cultivo de tejidos. (<http://wwwedu-micro-usaal.es/mg296/tema06.html>).
9. ESCOBAR, E.R. 1,985. Situación actual de la vida silvestre en Guatemala. En: Congreso de Biología (1., 1,984, Guatemala). Memorias. Editado por J.C. Godoy. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. p. 121-129.
10. GALVEZ, M.A. 1,981. Emblemas nacionales. Guatemala, Editorial del Ejército. 213 p.
11. GARITA, R.; GONZÁLEZ L. 1,993. Medios de cultivo de tipo casero. San José, Costa Rica, Instituto Nacional de Aprendizaje. s.p.
12. GEORGE, E.F. 1,987. Fórmulas y usos, medios de cultivo de tejidos. Inglaterra, Exegetics. v. 1, 632 p.
13. _____. 1,993. Plant propagation by tissue culture; part 1: the technology. 2 ed. Inglaterra, Exegetics. v. 1, 574 p.

14. _____. 1,993. Plant propagation by tissue culture; part 2: in practice. 2 ed. Inglaterra, Exegetics. v. 2, 1,361 p.
15. HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. 1,987. Propagación de plantas. Trad. por Antonio Mariano Ambrosio. 4 ed. México, Prentice-Hall. 760 p.
16. HURTADO, S.M.; MERINO, M.E. 1,987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 227 p.
17. LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1,991. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos; embriogenesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. Willian Roca; Luis A. Mroginski, Colombia, CIAT. p. 143-172.
18. LIZARRAGA, R.; PANTA, A.; ESPINOZA, N.; DODS, J. H. 1,990. Cultivo de tejidos de Ipomoea batatas micropropagación y conservación. Lima, Perú, CIP, Departamento de Ciencia de la Información. p. 3-17.
19. MACZ MACARIO, O.E. 1,995. Manual para la propagación de orquídeas in vitro. Guatemala, Universidad Rafael Landivar. 59 p.
20. MALDONADO, M.R. 1,984. El cultivo y propagación de las orquídeas en Guatemala; cuidados culturales. Tesis Fit. Guatemala, Universidad Rafael Landivar, Instituto de Ciencia Ambiental y Tecnología Agrícolas. 176 p.
21. MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1,991. Establecimiento de cultivos de cultivos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 19-40.
22. OSPINA, Y.C. 1,983. Biotecnología vegetal aplicada a la propagación masiva de orquídeas. Costa Rica, Instituto Nacional de Aprendizaje. 6 p.

23. PRADO, L.; CAZALI, G. 1,982. Monja blanca; flor nacional (Lycaste skinneri var. alba). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 5 p. (Serie conozcamos nuestra flora).
24. RIVERA COTO, G. 1,998. Orquídeas: generalidades y cultivo. Heredia, Costa Rica, Fundación UNA. 266 p.
25. TORRES, J.; MOGOLLON, N. 1,986. Micropropagación clonal masiva de Cattleya leuddemani-riana Rchb. F. Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". p. 118.
26. TSEN FONG, E. 1,993. La monja blanca, una especie que se extingue. Critica (Gua.) no. 63:s.p.
27. USUI, K.; OKABE, K.; PERNILLO, R; RAMÍREZ, A. 1,990. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. 166 p.
28. VAIDES, C.A. 1,986. Algunos aspectos sobre las orquídeas. Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Unidad de Comunicación Social. 20 p.
29. VILLALOBOS A., V.M.; TORPE, T.A. 1,991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mrogniski. Colombia, CIAT. p. 127-141.
30. WEAVER, R.J. 1,987. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. por Agustín Contín. México, Trillas. 622 p.
31. WITHNER, C.L. 1,959. The orchids. Edited by Carl L. Withner. New York, United States of America, The Ronad Press. 648 p.

32. ZEPEDA L., G. 1,984. La convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre. En: Congreso Nacional de Biología (1., 1,984, Guatemala). Memorias. Ed. por J. C. Godoy. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. p. 130-132.

Vo.Bo. Rolando Aragón Barrios

11. APÉNDICE

CUADRO 16. Composición química del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y el medio Morel (1965a)

No.	COMPOSICIÓN QUIMICA	MEDIOS DE CULTIVO	
		Murashige y Skoog 1962 (MS) (mg/l)	Morel 1965a. (mg/l)
1.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	***	1000
2.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	125
3.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	***
4.	KNO_3	1900	125
5.	KCl	***	500
6.	NH_4NO_3	1650	***
7.	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	***	500

8.	KH_2PO_4	170	125
9.	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	***
10.	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	***
11.	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	0.1
12.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	1
13.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.03
14.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	***
15.	KI	0.83	0.01
16.	H_3BO_3	6.2	1
17.	AlCl_3	***	0.03
18.	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	***	0.03
19.	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	***	1
20.	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	***
21.	$\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$	***	***
22.	$\text{Fe}(\text{CaH}_4\text{O}_6)_3 - 2\text{H}_2\text{O}$	***	***
23.	myo-inositol	100	***
24.	Acido Nicotínico	0.5	***
25.	Pyridoxina.HCl	0.5	***
26.	Thiamina.HCl	0.1	***
27.	pH	5.7	5.2
28.	Sacarosa	30000	20000
29.	Phytigel	3500	3500

Cuadro 17. Datos de la primera lectura, número de brotes a los 20 días después de la siembra.

Fuente: Datos de laboratorio

X: Representa los tubos de cultivo contaminados por hongos y bacterias.

Medio de Cultivo MS												Medio de Cultivo Morel 1965a											
Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	Repeticiones										Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	Repeticiones									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
KIN	0.1	1	9	1	1	4	4	4	4	4	2	KIN	0.1	1	1	3	4	3	3	1	3	4	0
KIN	1	x	x	2	3	4	4	3	6	7	4	KIN	1	0	0	5	0	1	1	0	0	1	0
KIN	3	x	0	2	2	3	9	2	7	2	7	KIN	3	1	1	1	1	3	3	1	3	0	1
KIN	5	x	0	2	1	1	3	2	5	3	5	KIN	5	0	0	1	0	2	2	1	1	0	1
KIN	7	x	2	1	13	17	0	6	4	2	13	KIN	7	1	2	3	2	2	3	0	1	1	1
KIN	9	3	3	1	5	4	0	3	3	11	5	KIN	9	4	1	1	0	2	2	2	3	2	0
2,4D	0.01	1	2	5	1	0	2	5	4	1	x	2,4D	0.01	x	2	1	x	2	0	2	0	1	1
2,4D	0.1	2	1	1	2	4	0	3	1	0	3	2,4D	0.1	4	3	1	3	2	1	1	1	2	0
2,4D	1	4	0	3	2	4	4	x	x	0	3	2,4D	1	1	2	0	0	3	0	0	1	1	1
2,4D	3	0	x	x	0	1	4	0	2	0	1	2,4D	3	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
2,4D	5	x	x	0	1	0	0	0	0	2	3	2,4D	5	1	1	0	1	1	0	1	2	0	0
2,4D	7	0	0	0	0	0	0	0	0	x	0	2,4D	7	x	0	0	0	0	0	1	2	0	1
2,4D	9	0	1	1	2	0	1	0	0	2	3	2,4D	9	1	1	1	0	0	2	1	2	0	2
BAP	0.01	x	0	1	x	x	1	2	4	3	4	BAP	0.01	0	1	2	3	0	1	0	0	0	x
BAP	0.1	0	x	2	2	x	4	3	3	6	x	BAP	0.1	0	0	0	4	1	5	0	2	1	3
BAP	1	x	1	3	2	3	x	7	x	2	9	BAP	1	0	2	1	0	1	1	1	0	2	0
BAP	3	x	1	x	x	5	4	4	3	3	2	BAP	3	0	0	0	0	2	1	0	0	1	0
BAP	5	x	1	x	x	x	x	6	4	3	2	BAP	5	0	0	x	x	0	1	0	2	1	0
BAP	7	x	1	x	1	3	0	6	3	3	1	BAP	7	0	2	0	1	0	1	0	x	3	0
BAP	9	x	x	x	5	x	6	5	1	8	6	BAP	9	1	0	1	0	0	x	3	0	2	x
Testigo		2	0	0	4	1	0	1	2	0	0	Testigo		0	1	2	1	0	1	1	1	0	2

Cuadro 18. Datos de la segunda lectura, número de brotes a los 35 días después de la siembra.

Medio de Cultivo MS		Repeticiones										Medio de Cultivo Morel 1965a		Repeticiones									
Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
KIN	0.01	6	7	5	2	3	4	5	1	3	5	KIN	0.01	1	3	1	5	1	0	0	4	2	2
KIN	0.1	x	6	25	7	4	5	5	12	16	4	KIN	0.1	1	1	5	5	4	2	0	2	5	9
KIN	1	x	x	5	6	6	7	3	5	6	3	KIN	1	0	1	4	0	1	0	0	0	1	1
KIN	3	x	3	5	5	3	2	2	10	7	6	KIN	3	1	1	0	0	2	1	0	2	0	0
KIN	5	x	3	8	3	2	3	3	3	5	6	KIN	5	0	0	2	0	2	0	0	1	0	0
KIN	7	x	7	3	15	8	3	3	8	2	3	KIN	7	1	1	3	0	1	0	0	1	1	1
KIN	9	6	6	6	5	6	4	7	3	13	5	KIN	9	3	1	2	0	3	1	0	3	2	2
2,4D	0.01	x	2	4	5	5	0	2	2	4	5	2,4D	0.01	x	6	0	x	0	0	0	0	0	0
2,4D	0.1	3	2	3	3	4	0	1	2	0	5	2,4D	0.1	2	1	0	0	0	1	0	0	1	0
2,4D	1	3	1	5	3	3	2	x	x	2	5	2,4D	1	1	0	0	0	0	1	0	2	0	0
2,4D	3	0	x	x	2	8	0	0	5	0	1	2,4D	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
2,4D	5	x	x	2	1	0	1	1	2	3	3	2,4D	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	7	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	2,4D	7	x	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	9	0	2	3	0	0	4	2	0	3	x	2,4D	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
BAP	0.01	x	x	x	x	x	x	x	6	5	4	BAP	0.01	2	1	2	2	0	0	0	0	0	9
BAP	0.1	0	1	2	3	0	4	1	x	6	x	BAP	0.1	1	1	0	2	0	2	0	0	2	x
BAP	1	x	x	4	3	3	x	1	x	2	0	BAP	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	3
BAP	3	x	3	6	x	8	5	1	4	4	4	BAP	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	5	x	3	x	x	x	x	1	4	3	2	BAP	5	0	0	x	x	0	0	0	0	2	0
BAP	7	x	4	x	2	4	3	5	6	3	1	BAP	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	9	x	x	x	3	x	6	3	1	9	5	BAP	9	0	2	0	1	0	0	0	x	x	x
Testigo		2	0	0	5	1	3	1	2	0	0	Testigo		0	0	1	3	0	0	0	0	0	0

Fuente: Datos de laboratorio

X: Representa los tubos de cultivo contaminados por hongos y bacterias.

Cuadro 19. Datos de la tercera lectura, número de brotes a los 50 días después de la siembra.

Medio de Cultivo MS												Medio de Cultivo Morel 1965a											
Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	Repeticiones										Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	Repeticiones									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
KIN	0.01	11	6	7	x	3	4	3	2	4	5	KIN	0.01	1	4	1	5	1	1	1	4	1	1
KIN	0.1	x	6	31	3	4	4	6	21	13	24	KIN	0.1	1	0	1	3	4	3	0	3	5	0
KIN	1	x	x	4	6	8	12	5	9	7	3	KIN	1	1	0	4	0	1	1	0	0	1	0
KIN	3	x	3	5	5	3	2	2	9	4	6	KIN	3	2	1	0	0	2	2	1	2	0	1
KIN	5	x	3	7	2	2	3	8	2	6	6	KIN	5	0	0	2	0	2	2	1	1	0	x
KIN	7	x	8	3	6	32	15	3	6	2	17	KIN	7	1	1	3	2	1	2	0	1	0	1
KIN	9	30	6	5	30	3	7	15	3	18	7	KIN	9	2	1	1	0	3	2	2	3	2	0
2,4D	0.01	x	2	2	x	1	0	1	0	0	2	2,4D	0.01	x	4	0	x	1	0	1	0	0	1
2,4D	0.1	2	2	0	0	0	0	2	1	1	3	2,4D	0.1	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0
2,4D	1	4	0	3	0	1	3	0	0	0	4	2,4D	1	x	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2,4D	3	0	x	x	0	0	0	0	0	0	4	2,4D	3	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	5	x	x	0	0	0	0	1	0	0	2	2,4D	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2,4D	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4D	7	x	1	0	0	0	0	0	0	0	1
2,4D	9	x	0	1	0	0	0	0	0	0	x	2,4D	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	0.01	x	x	x	x	x	x	x	5	3	4	BAP	0.01	2	0	2	4	1	2	0	8	0	x
BAP	0.1	1	1	3	2	x	4	2	x	5	x	BAP	0.1	1	0	0	2	2	7	0	2	1	3
BAP	1	x	x	4	1	2	x	3	x	2	7	BAP	1	0	2	1	0	1	1	0	0	2	0
BAP	3	x	11	6	x	8	4	8	8	2	4	BAP	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
BAP	5	x	4	x	x	x	x	6	4	3	2	BAP	5	0	0	x	x	0	1	0	2	0	0
BAP	7	x	5	x	1	3	2	6	5	3	1	BAP	7	0	1	0	1	0	1	0	x	2	0
BAP	9	x	x	x	3	x	6	6	1	9	4	BAP	9	1	0	1	0	2	x	3	0	1	x
Testigo		1	0	0	2	1	3	1	2	1	0	Testigo		x	0	1	2	1	0	0	0	0	1

Fuente: Datos de laboratorio

X: Representa los tubos de cultivo contaminados por hongos y bacterias.

Cuadro 20. Datos de la cuarta lectura número de brotes a los 65 días después de la siembra.

Fuente: Datos de laboratorio

Medio de Cultivo MS												Medio de Cultivo Morel 1965 ^a											
		Repeticiones												Repeticiones									
Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
KIN	0.01	11	7	10	33	3	5	8	x	5	7	KIN	0.01	1	0	1	6	1	1	1	5	1	1
KIN	0.1	0	7	x	10	3	3	5	21	17	24	KIN	0.1	1	0	3	5	5	3	0	4	4	0
KIN	1	x	0	4	13	8	12	2	5	6	2	KIN	1	1	0	4	1	1	1	0	0	4	0
KIN	3	x	3	5	3	2	2	2	10	3	6	KIN	3	0	1	0	1	1	1	1	2	0	x
KIN	5	x	3	7	3	2	3	8	x	6	6	KIN	5	0	0	2	2	1	2	1	1	x	1
KIN	7	x	8	3	5	32	15	3	6	2	17	KIN	7	1	1	2	1	2	2	1	1	0	1
KIN	9	30	8	8	30	4	6	15	3	18	7	KIN	9	4	1	0	2	2	3	2	3	3	5
2,4D	0.01	x	x	2	1	4	0	5	0	3	0	2,4D	0.01	x	2	0	1	1	0	1	0	0	0
2,4D	0.1	0	0	0	1	0	0	4	1	0	2	2,4D	0.1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
2,4D	1	4	1	3	7	4	4	x	x	x	1	2,4D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	3	0	x	x	0	3	0	0	x	0	1	2,4D	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	5	x	x	2	x	0	0	0	2	4	1	2,4D	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	7	0	0	0	0	0	0	0	x	0	0	2,4D	7	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	9	x	0	0	0	0	0	0	0	0	x	2,4D	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	0.01	x	x	x	x	x	x	x	6	7	5	BAP	0.01	2	0	1	3	1	1	0	0	x	3
BAP	0.1	2	1	3	2	x	4	x	x	6	x	BAP	0.1	0	0	0	2	1	3	0	2	1	0
BAP	1	x	x	8	4	4	x	3	x	3	13	BAP	1	0	2	1	0	1	1	x	0	2	0
BAP	3	x	13	6	x	10	4	8	8	2	5	BAP	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
BAP	5	x	4	x	x	x	x	4	5	3	2	BAP	5	0	0	x	x	0	1	0	2	0	0
BAP	7	x	4	x	1	3	2	5	4	3	1	BAP	7	0	2	0	1	0	1	0	x	2	0
BAP	9	x	0	x	4	x	6	6	1	9	4	BAP	9	1	0	1	0	2	x	3	0	1	x
Testigo		1	0	0	2	1	4	0	2	0	0	Testigo		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

X: Representa los tubos de cultivo contaminados por hongos y bacterias.

Cuadro 21. Datos de la quinta lectura número de brotes a los 80 días después de la siembra.

Medio de Cultivo MS

Medio de Cultivo Morel 1965a

		Repeticiones												Repeticiones									
Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
KIN	0.01	11	7	10	33	3	5	8	x	5	7	KIN	0.01	1	0	1	6	1	1	1	5	1	1
KIN	0.1	x	7	x	10	3	3	5	21	17	24	KIN	0.1	1	0	3	4	5	3	0	4	4	0
KIN	1	x	x	4	13	8	12	2	5	6	2	KIN	1	1	0	4	0	1	1	0	0	1	0
KIN	3	x	3	5	3	2	2	2	10	3	6	KIN	3	0	1	0	0	1	1	1	0	0	x
KIN	5	x	x	x	3	2	3	8	x	6	6	KIN	5	0	0	2	0	2	2	1	0	x	x
KIN	7	x	8	3	5	32	15	3	6	2	17	KIN	7	1	1	2	2	1	2	1	0	0	1
KIN	9	30	8	8	30	4	6	15	3	10	7	KIN	9	4	1	1	0	2	3	2	0	3	5
2,4D	0.01	x	x	2	1	1	0	3	0	4	0	2,4D	0.01	x	1	0	x	1	0	1	0	0	0
2,4D	0.1	2	3	1	2	5	0	4	2	0	3	2,4D	0.1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2,4D	1	0	3	4	3	4	4	x	x	x	1	2,4D	1	x	0	0	x	0	0	0	0	0	0
2,4D	3	0	x	x	0	x	x	0	x	0	1	2,4D	3	0	0	0	x	0	0	0	x	0	0
2,4D	5	x	x	0	x	0	0	0	0	0	1	2,4D	5	x	0	0	0	0	0	x	0	0	0
2,4D	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4D	7	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	9	x	0	0	0	0	0	0	0	0	x	2,4D	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	0.01	x	x	x	x	x	x	x	6	4	6	BAP	0.01	2	0	1	3	1	1	0	0	x	x
BAP	0.1	2	1	3	4	x	4	x	x	6	x	BAP	0.1	0	0	0	2	1	3	0	2	1	3
BAP	1	x	x	8	4	9	x	3	x	3	13	BAP	1	0	2	1	0	1	1	x	0	2	0
BAP	3	x	13	6	x	10	4	8	8	4	5	BAP	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
BAP	5	x	5	x	x	x	x	4	5	3	2	BAP	5	0	0	x	x	0	1	0	2	0	0
BAP	7	x	4	x	1	3	2	5	4	3	1	BAP	7	0	0	0	1	0	0	0	x	2	0
BAP	9	x	x	x	4	x	6	6	1	9	4	BAP	9	1	0	1	0	0	x	3	0	1	x
Testigo		1	0	0	0	1	4	0	1	0	0	Testigo		x	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Datos de laboratorio

X: Representa los tubos de cultivo contaminados por hongos y bacterias.

Cuadro 22. Datos de la lectura altura de brotes a los 80 días después de la siembra.

Medio de Cultivo MS

Medio de Cultivo Morel 1965a

Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	Repeticiones										Regulador del crecimiento	Nivel de regulador del crecimiento (mg/l)	Repeticiones									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
KIN	0.01	15	33	10	20	45	0	0	0	0	0	KIN	0.01	15	25	35	6	30	52	0	0	0	0
KIN	0.1	15	50	7	4	45	15	15	6	22	0	KIN	0.1	14	52	7	3	44	18	8	22	0	0
KIN	1	45	50	7	5	50	6	40	40	20	10	KIN	1	55	45	9	20	48	6	39	45	25	12
KIN	3	8	12	12	20	15	5	0	0	0	0	KIN	3	12	18	15	22	22	5	0	0	0	0
KIN	5	6	12	10	0	5	12	25	0	0	0	KIN	5	8	8	8	5	15	17	0	0	0	0
KIN	7	23	30	12	15	30	37	3	0	0	0	KIN	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KIN	9	12	7	12	13	15	8	12	22	15	1	KIN	9	10	0	8	4	0	0	4	5	0	6
2,4D	0.01	23	15	4	17	25	22	15	8	0	0	2,4D	0.01	0	2	0	3	2	0	2	14	15	15
2,4D	0.1	15	25	6	5	10	11	35	8	20	0	2,4D	0.1	3	0	2	2	0	0	4	3	0	0
2,4D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4D	1	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	3	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	2,4D	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	5	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	2,4D	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4D	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4D	9	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2,4D	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	0.01	13	25	29	7	0	0	0	0	0	0	BAP	0.01	0	2	7	4	0	0	0	0	0	0
BAP	0.1	12	16	12	25	17	7	0	0	0	0	BAP	0.1	8	25	9	6	20	0	0	0	0	0
BAP	1	14	30	29	12	22	0	0	0	0	0	BAP	1	4	0	0	24	4	0	0	0	0	0
BAP	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	BAP	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	5	20	5	35	15	15	15	0	0	0	0	BAP	5	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0
BAP	7	15	4	7	4	6	25	0	0	0	0	BAP	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAP	9	10	23	17	0	0	0	0	0	0	0	BAP	9	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testigo		10	12	4	11	25	20	9	10	15	12	Testigo		4	10	12	4	0	0	0	0	0	18

Fuente: Datos de laboratorio

X: Representa los tubos de cultivo contaminados por hongos y bacterias.