

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
MENCIÓN: AGRICULTURA SOSTENIBLE**



**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN IN
VITRO Y EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE
Phragmipedium kovachii, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES, UNSM-T, EN LA REGIÓN SAN MARTÍN**

Tesis

Para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS,
MENCIÓN: AGRICULTURA SOSTENIBLE**

PRESENTADO POR:

WILMAR MURRIETA VELA

ASESORES:

JULIO ALFONSO CHIA WONG

VICENTE SERAPIO POCOMUCHA POMA

Tingo María – Perú

2025



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO – FACULTAD DE AGRONOMÍA



“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Nro. -2023-UP-FA-UNAS

En la ciudad universitaria, siendo las 10:00 a.m., del miércoles 23 de agosto de 2023, reunidos en la sala de audiovisuales de la Facultad de Agronomía, se instaló el Jurado Calificador a fin de proceder a la sustentación de la tesis titulada:

“OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* Y EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE *Phragmipedium kovachii*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, UNSM-T, EN LA REGIÓN SAN MARTÍN”

A cargo del candidato al Grado de Maestro en Ciencias Agrícolas, mención: Agricultura Sostenible, Ing. **WILMAR MURRIETA VELA**.

Luego de la exposición y absueltas las preguntas de rigor, el Jurado Calificador procedió a emitir su fallo declarando ~~Aprobado~~ con el calificativo de **MUY BUENO**

Acto seguido, a horas ~~11:58~~^{am.}...el presidente dio por culminada la sustentación; procediéndose a la suscripción de la presente acta por parte de los miembros del jurado, quienes dejan constancia de su firma en señal de conformidad.

M. Sc. **FAUSTO SILVA CARDENAS**
Presidente del Jurado

M. Sc. **GIANFRANCO EGOÁVIL JUMP**
Miembro del Jurado

M. Sc. **MIGUEL EDUARDO ANTEPARRA PAREDES**
Miembro del Jurado

M. Sc. **JULIO ALFONSO CHIA WONG**
Asesor

Dr. **VICENTE SERAPIO POCOMUCHA POMA**
Asesor



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
DIRECCIÓN DE GESTIÓN DE INVESTIGACIÓN - DGI
REPOSITORIO INSTITUCIONAL - UNAS

Correo: repositorio@unas.edu.pe



“Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana”

CERTIFICADO DE SIMILITUD T.I. N° 017 - 2025 - CS-RIDUNAS

El Director de la Dirección de Gestión de Investigación de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, quien suscribe,

CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Investigación; aprobó el proceso de revisión a través del software TURNITIN, evidenciándose en el informe de originalidad un índice de similitud no mayor del 25% (Art. 3° - Resolución N° 466-2019-CU-R-UNAS).

Programa de Estudio:

Maestría en Agricultura Sostenible

Tipo de documento:

Tesis	X	Trabajo de Suficiencia Profesional
-------	---	------------------------------------

TÍTULO	AUTOR	PORCENTAJE DE SIMILITUD
OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN IN VITRO Y EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE <i>Phragmipedium kovachii</i> , EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, UNSM-T, EN LA REGIÓN SAN MARTÍN	WILMAR MURRIETA VELA	22 % Veintidós

Tingo María, 21 de enero de 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
UNIDAD DE GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Dr. Tomas Menacho Mallqui

C.C. Archivo

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
MENCIÓN: AGRICULTURA SOSTENIBLE**



**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN IN
VITRO Y EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE
Phragmipedium kovachii, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES, UNSM-T, EN LA REGIÓN SAN MARTÍN**

Autor	: Wilmar Murrieta Vela
Asesor (es)	: Dr. Julio Alfonso Chia Wong Dr. Vicente Serapio Pocomucha Poma
Área de Investigación	: Biotecnología, mejoramiento, agrobiodiversidad
Línea de Investigación	: Biotecnología y mejoramiento genético de plantas
Eje temático	: Cultivo in vitro de plantas vulnerables o en peligro de extinción
Lugar de Ejecución	: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín- Región San Martín.
Duración	: Junio a diciembre de 2021
Financiamiento	: S/. 5635,00

Tingo María – Perú. 2025



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
VICERRECTOR DE INVESTIGACION
Instituto de Investigación
Unidad de Gestión de la Investigación

FORMATO PARA REGISTRAR EL PROYECTO DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO

Universidad	: Universidad Nacional Agraria de la selva
Escuela de posgrado	: EPG - UNAS
Posgrado	: Maestría en Ciencias Agrícolas
Mención	: Agricultura Sostenible
Título de la Tesis	: OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN IN VITRO Y EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE <i>Phragmipedium kovachii</i> , EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, UNSM-T, EN LA REGIÓN SAN MARTÍN
Objetivo General	: Optimizar un medio de cultivo para la conservación in vitro y el establecimiento de un banco de germoplasma de <i>P. kovachii</i> .
Autor de la Tesis	: Wilmar Murrieta Vela
DNI	: 01112176
Correo electrónico	: Wilmar.murrieta@unas.edu.pe
Asesores	: 1. Dr. Julio Alfonso Chia Wong 2. Dr. Vicente Serapio Pocomucha Poma
Área de Investigación	: Biotecnología, mejoramiento, agrobiodiversidad
Grupo de Investigación	: Valorizando nuestra Biodiversidad mediante biotecnología
Línea de investigación	: Biotecnología y mejoramiento genético de plantas
Lugar de Ejecución	: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín-Región San Martín
Fecha de inicio	: Junio de 2021
Fecha definalización	: Diciembre de 2021
Presupuesto	: S/. 5635,00
Financiamiento	: Propio (x) FIF () Externo ()

Según: Resolución: N° 461-2023-R-UNAS y Resolución: N° 295-2023-R-UNAS

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, quien supo guiarme por el buen camino, darme Fuerzas en los momentos difíciles para seguir adelante.

A mis queridos padres Artidoro y Lusgarda que, con tanto amor, ternura y esfuerzo, hicieron para mí una persona útil a la sociedad.

A mis hermanos Rómulo, Javier, Maribel y Dagoberto por su cariño e interés que siempre me demostraron.

Con cariño:

Wilmar Murrieta Vela

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva de Tingo María (UNAS-TM) y a Escuela de Posgrado de la Facultad de Agronomía (EPG-UNAS-TM), con sus respetadas Autoridades, su plana Docente y su personal Administrativo; por la enseñanza y el apoyo que me brindaron para el logro de la meta trazada de la maestría contribuyeron sus conocimiento intelectual y humano.

A mis asesores Dr. Julio Alfonso Chia Wong y Dr. Vicente Serapio Pocomucha Poma, por su valioso asesoramiento, con su tiempo, dedicación y ánimo constante durante el proceso de la presente investigación, así como por sus consejos y amistad.

A los miembros del Jurado de tesis, M. Sc. Fausto Silva Cárdenas, M. Sc. Miguel Eduardo Anteparra Paredes, M. Sc. Gianfranco Egoavil Jump, por sus acertadas opiniones y grandes aportes para asegurar la calidad y el rigor científico de la presente tesis.

A todas las personas que colaboraron en la presente investigación; entre ellos: Dr. Geomar Vallejos Torres (jefe del LCTV), a la Ing. M.Sc. María Emilia Ruíz Sánchez por su apoyo en la presente investigación, a la Ing. Biotecnóloga María Nelly Pezo Torres por su valioso apoyo, al Ing. Amner Padilla Domínguez, y a la Ing. Grecia Vanessa Fachín Ruíz por su apoyo incondicional, y de una u otra manera estuvieron conmigo, porque cada una aportó un valioso conocimiento en sus pertinentes y acertadas opiniones; y es por ello por lo que a todos y cada uno de ustedes les dedico todo el esfuerzo, sacrificio y tiempo que entregué a esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Clasificación botánica de <i>Phragmipedium kovachii</i>	4
2.3. Banco de germoplasma.....	4
2.4. Tipos de germoplasma.....	5
2.5. Conservación de recursos fitogenéticos.....	5
2.5.1. Preservación <i>in situ</i>	5
2.5.2. Protección <i>ex situ</i>	6
2.5.3. Protección de campo.....	7
2.5.4. Almacenamiento de semillas.....	7
2.5.5. Preservación <i>in vitro</i>	8
2.6. Técnica de conservación <i>in vitro</i>	9
2.6.1. Técnica de desarrollo mínimo.....	9
2.6.2. Método de conservación a baja temperatura.....	10
2.7. <i>Phragmipedium kovachii</i> , producción en laboratorio IN VITRO.....	10
2.8. Estrategias de preservación <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	10
2.9. Perspectivas a futuro.....	11
2.10. Banco de recursos de germoplasma y germinación <i>in vitro</i> de cactáceas endémicas y en estado de conservación.....	11
2.11. Condiciones de incubación.....	12
2.11.1. Medio de cultivo.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Ubicación de la investigación.....	13
3.1.1. Ubicación política.....	13
3.1.2. Ubicación geográfica.....	13
3.2. Componentes en estudio.....	13
3.2.1. Medios de cultivo.....	13
3.2.2. Concentración de Manitol.....	13

3.3. Parámetros evaluados.....	13
3.4. Materiales utilizados	14
3.4.1. Laminas, materiales de metal	14
3.4.2. Espátula Equipos	14
3.4.3. Reactivos	14
3.4.4. Otros	14
3.5. Metodología	15
3.5.1. Características del ensayo.....	15
3.5.2. Variables de estudio.....	16
3.5.3. Descripción de los tratamientos.....	17
3.5.4. Diseño estadístico	20
3.5.5. Obtención del material vegetal	21
3.5.6. Extracción de las plántulas	21
3.5.7. Siembra de plántulas.....	22
3.5.8. Parámetros de evaluación de características morfológicas.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Parámetros morfológicos de plántulas de <i>Phragmipedium kovachii</i>	26
4.1.1. Altura de planta	26
4.1.2. Número de hojas	28
4.1.3. Longitud de hojas	30
4.1.4. Número de tallos.....	32
4.1.5. Número de raíces	35
4.1.6. Longitud de raíces	37
V. CONCLUSIONES.....	40
VI. PROPUESTAS A FUTURO	41
VII. REFERENCIAS	42
ANEXO	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tipos de medios de cultivo y concentraciones de manitol (g/l), utilizados para el desarrollo de plántulas de <i>P. kovachii</i>	17
2. Macro y micronutrientes para preparación de medios de cultivo según Murashigge & Skoog.	18
3. Macro y micronutrientes para preparación de medios de cultivo, según gamborg (B5).	19
4. Descripción de los tratamientos y combinaciones de medios de cultivo y dosis de Manitol para retardar el crecimiento de plántulas de <i>P. kovachii</i>	20
5. ANVA de la altura de plántulas (cm) de <i>P. kovachii</i> , durante el desarrollo vegetativo.	26
6. ANVA del número de hojas de <i>Phragmipedium kovachii</i> , durante el desarrollo vegetativo.	28
7. ANVA de la longitud de hojas de <i>Phragmipedium kovachii</i> , durante el desarrollo vegetativo.	30
8. ANVA del número de tallos de <i>Phragmipedium kovachii</i> , durante el desarrollo vegetativo.	33
9. ANVA del número de raíces de <i>Phragmipedium kovachii</i> , durante el desarrollo vegetativo.	35
10. ANVA de la longitud de raíces de <i>P. kovachii</i> , durante el desarrollo vegetativo.	37
11. Tabla de excel de la primera evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.	49
12. Tabla de excel de la segunda evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.	52
13. Tabla de excel de la tercera evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.	55
14. Tabla de excel de la cuarta evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.	58
15. Tabla de excel de la quinta evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.	62
16. Tabla de excel de la sexta evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.	66

17. Tabla de excel de la séptima evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.....	69
18. Tabla de excel de la octava evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.....	72
19. Tabla de excel de la novena evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.....	75
20. Tabla de excel de la décima evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.....	79
21. Tabla de excel de la onceava evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.....	82
22. Tabla de excel de la doceava evaluación de todos los parámetros morfológicos de <i>P. kovachii</i> , de todas las repeticiones.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Modelo de un banco de germoplasma	5
2. Preservación <i>in vitro</i> de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).	9
3. A) Lavado de tubos ensayo, B) reactivos para pesar, C) pesado de reactivo, D) lavado de pipetas, E) peachimetro de medición, F) balanza analítica para pesar reactivos.....	15
4. A) Estoqueado de medio cultivo, B) preparando y agregando agar, c) tubos de ensayo con medio, D) medio cultivo para esterilizar, E) medios colocados en autoclave, F) esterilización de medio cultivo.	16
5. plántulas de <i>P. kovachii</i> sembradas	21
6. A) Plántula de <i>P. kovachii</i> en botella, B) Extracción de plántula.....	22
7. A) Extracción de plántula de botella, B) Siembra de plántula en tubo, C) sellado del tubo.	22
8. A) Conteo de hojas, B) Anotación números hojas.	23
9. A) Plántula sembrada, B) medición de hoja.	23
10. A) Plántula sembrada, B) conteo número tallos.	24
11. A) Plántula en tubo, B) raíz en crecimiento, C) conteo de raíz.	24
12. A) Plántula en tubo, B) medición de la raíz.....	24
13. A) Plántula en tubo, b) Medición de la altura.....	25
14. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la altura de planta (cm) de <i>P. kovachii</i> , evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) bajo condiciones de laboratorio.....	27
15. La prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de hojas de <i>P. kovachii</i> , evaluados a 165 días posteriormente de la siembra (DDS) en laboratorio.....	29
16. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la longitud de hojas (cm) de <i>P. kovachii</i> , evaluados a 165 días posteriormente de la siembra (DDS) en laboratorio.....	31
17. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de tallos de plantas de <i>P. kovachii</i> , evaluados a 165 días posterior de la siembra (DDS) en laboratorio.....	34
18. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de raíces en plántulas de <i>P. kovachii</i> , evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) en laboratorio.	36
19. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la longitud de raíz en plántulas de <i>P. kovachii</i> , evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) en laboratorio.	38
20. Tubos de ensayos lavados listas para ser utilizadas	46

21. Preparación de medios de cultivo (MS-T, MS ½, Gamborg	46
22. Pesado de insumos para la preparación de medios	47
23. Plántulas de <i>P. kovachii</i> para ser llevadas área incubación	47
24. Revisión del trabajo de investigación en el área de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la UNSM-T. de parte del presidente de Jurado de Tesis Ing. M. Sc. Fausto Silva Cárdenas	48

RESUMEN

La investigación se realizó en la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, departamento de San Martín, específicamente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias, se trabajó con explante de *Phragmipedium kovachii* aisladas del Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales (INIBICO) situado en la región San Martín, con la finalidad de determinar la adaptabilidad en función a los medios de cultivo: M&S total, M&S ½ y Gamborg (B5) y la adición de 0 g, 10 g, 20 g y 30 g de una fuente de azúcar (Manitol) como inhibidor de crecimiento de plántulas de *Phragmipedium kovachii*, teniendo solo medio de cultivo como controles. Para el tratamiento de datos, utilizando un Diseño estadístico Completamente al Azar con ajuste factorial 3 x 4, donde el Factor A es el tipo de medio de cultivo (M & S total, M & S a mitad concentración y solución Gamborg) y el Factor “B” es la concentración de Manitol (0; 10; 20 y 30 g L⁻¹), en total fueron 12 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, considerando como unidad experimental cada repetición (1 explante de *Phragmipedium kovachii*), resultando un total de 120 unidades experimentales. Las evaluaciones se realizaron cada 15 Días Después de la Siembra (DDS) de las plántulas en el medio de cultivo, hasta completar 165 DDS, en donde se consideraron los indicadores morfológicos: cantidad de hojas, cantidad de tallos, cantidad de raíces, altura de planta, tamaño de raíz y longitud de hojas. Los resultados mostraron que el mejor medio de cultivo, en el cual hubo mayor índice de adaptabilidad de las plántulas según las características morfológicas, fue el medio MS, quien presentó 0,94 cm de altura de plántulas, 20 hojas en promedio, 1,78 cm de longitud de hojas en promedio por plántula, 1,38 tallos en promedio, 1,12 raíces y 0,86 cm de longitud de raíces de plántulas respectivamente. Sin embargo, la adición del inhibidor de crecimiento si influyó en los resultados morfológicos, ya que, a mayor concentración del inhibidor, se redujo considerablemente los datos obtenidos en el ensayo.

ABSTRACT

The research was carried out at the National University of San Martín - Tarapoto, department of San Martín, specifically in the Plant Tissue Culture Laboratory (LCTV) belonging to the Faculty of Agrarian Sciences (FCA) of said house of studies, we worked with *Phragmipedium kovachii* seeds isolated from the Biological Research Institute of the Eastern Cordilleras (INIBICO) located in the San Martín region, in order to determine the adaptability according to the culture media: M&S total, M&S ½ and Gamborg (B5) and the addition of 10 g, 20 g and 30 g of a sugar source (Mannitol) as growth inhibitor of *Phragmipedium kovachii* seedlings, having only culture medium as controls. For data treatment, a Completely Random Design (DCA) with a 3 x 4 factorial arrangement was used, where Factor "A" is the type of culture medium (M & S total, M & S at medium concentration and solution Gamborg) and Factor "B" is the concentration of Mannitol (0; 10; 20 and 30 g L⁻¹), in total there were 12 treatments with 10 repetitions each, each repetition being an experimental unit (1 *P. kovachii* seedling), resulting in a total of 120 experimental units. The evaluations were carried out every 15 Days After Sowing (DDS) of the seedlings in the culture medium, until completing 165 DDS, where the morphological indicators were considered: number of leaves, number of stems, number of roots, height of the plant, root length and leaf length. The results indicate that the best culture medium, in which there was a higher adaptability index of the seedlings according to the morphological characteristics, was the MS medium, which presented 0,94 cm in height of seedlings, 20 leaves on average, 1,78 cm in length of leaves on average per seedling, 1,38 stems on average, 1,12 roots and 0,86 cm length of seedling roots, respectively. However, the addition of the growth inhibitor did influence the morphological results, since, at a higher concentration of the inhibitor, the data obtained in the test was considerably reduced.

I. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son un grupo de plantas muy diverso en Perú. Se estima que, en nuestro país, alcanza las 2600 y 3000 especies. Esta diversidad de especies, con su variedad de formas, tamaños y colores, hace de las Orchidaceae una familia con dificultad para catalogar y evaluar. Sin embargo, esta gran variación contrasta con su baja abundancia y alta sensibilidad a los cambios en el medio ambiente, así como la calidad de su hábitat. Sobre el último punto, quizás una de las mayores amenazas es la pérdida del hábitat donde prosperan estas especies. Un problema evidente es la sobre explotación, que en algunos casos ha resultado en la destrucción de poblaciones de algunas especies debido al alto impacto de la explotación comercial de las orquídeas de su hábitat. Por esta razón, las orquídeas están comprendidas en los anexos de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (Cites) (Minam, 2015).

Esta preservación de orquídeas involucra técnicas que permitan una gran diversidad de genotipos, como el uso de técnicas de preservación y hacer mejoramiento para disminuir su pérdida en el tiempo de manera controlada, en un esfuerzo por maximizar la diversidad de muestras recolectadas de las poblaciones. La esfera sexual o su centro de origen (Sánchez & Jiménez, 2010; Rivera et al., 2008). Dentro de los bancos de germoplasma in vitro contienen especies de semillas cortas, poco vigorosas, con especial énfasis en cultivos de propagación vegetativa que son altamente heterocigóticos y requieren duplicación clonal así mantener su integridad genética. Este último ingrediente contiene raíces y tubérculos volátiles durante el acumulamiento, como *Solanum tuberosum* (papa), *Ipomoea batata* (camote) y *Manihot esculenta* Crantz (yuca) como parte de la diversidad de plantas cultivadas principalmente para el consumo humano (Bonilla y Caetano, 2013; García, Feria y Acosta, 2007).

La preservación de estos recursos incluye métodos que permiten maximizar el aumento de la variedad genotípica y minimizar su pérdida en el tiempo, utilizando técnicas de conservación y posterior mejoramiento de manera controlada que busca maximizar la diversidad de muestras recolectadas del campo de población o su centro de origen (Sánchez & Jiménez, 2010; Rivera et al., 2008).

Los bancos de germoplasma in vitro agrupan especies de semillas cortas, pero poco vigorosas, con especial énfasis en labores de propagación vegetativa que son enormemente heterocigóticos y requieren duplicación clonal para mantener su integridad genética. Este último ingrediente contiene raíces y tubérculos de corta vida durante el proceso de almacenamiento, como *S. tuberosum* (papa), *I. batata* (camote) y *M. esculenta* (yuca), que forman parte de la variedad de plantas cultivadas importante para el consumo humano (Caetano,

2013; García, Feria y Acosta, 2007). Por su enorme diversidad genética, también son de gran importancia económica comercial, siendo muy valoradas y queridas a nivel mundial por su variedad en tamaño, forma, color, aroma, y por lo tanto sufren de extracción descontrolada, incluidas las orquídeas, *Phragmipedium kovachii*.

El Banco de germoplasma para la conservación de orquídeas peruanas, desde hace varios años, la Organización Alemana de Cooperación Técnica (más conocida por las siglas GTZ) ha apoyado a países en desarrollo, esta vez con el pueblo indígena Avajun en la selva peruana, y este apoyo incluyó la creación de un banco de semillas de orquídeas, las orquídeas se cultivan en Alto Mayo (provincia de San Martín) y estas orquídeas son muy cotizadas en el mercado internacional y también son muy traficadas, enviadas por delincuentes a Ecuador y Estados Unidos. Esta lucha por proteger estas especies únicas llevará a los bancos de germoplasma. En nuestro país están registradas unas 3500 especies, pero cada cierto tiempo se descubren nuevas especies. Ulrico Rotgers aseguró que el banco será parte del plan de desarrollo rural sostenible de la provincia de San Martín. Actualmente, el comercio de orquídeas es rentable para los contrabandistas. Ejemplares de orquídeas que llevan el nombre de Kovacs (*Phragmipedium kovachii*) alcanzan hasta \$ 30000 en los mercados americano y europeo por su extraordinaria belleza (El Comercio Peru, 2006).

El presente trabajo de investigación consistió en realizar la optimización de un medio de cultivo para la preservación *in vitro* y el establecimiento de un banco de germoplasma la orquídea *P. kovachii* mediante la técnica de preservación *in vitro* utilizando medios de cultivo de MS, MS ½ y Gamborg (B5), y fuente de azúcar (Manitol o Sorbitol), de esa manera la conservación de plantas es importante para mantener por varios años y servirá como fuente de investigación para trabajos futuros. Por tanto, el presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

Objetivo general

Optimizar un medio de cultivo para la conservación *in vitro* y el establecimiento de un banco de germoplasma de *P. kovachii*.

Objetivos específicos

1. Comparar tres medios de cultivo para la conservación *in vitro* de *Phragmipedium kovachii*.
2. Evaluar diferentes concentraciones de manitol para retrasar el crecimiento de explante.
3. Evaluar los diferentes parámetros de crecimiento en las vitro plántulas de *Phragmipedium kovachii*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Bello-Bello et al. (2015) menciona que evaluaron el efecto de dos agentes osmóticos a cuatro concentraciones (0, 10, 20 y 30 g L⁻¹): manitol y polietilenglicol (PEG) y cuatro concentraciones (0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹). Evaluaron dos retardantes vegetales sobre el desarrollo, ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC) sobre la duración y desarrollo de plantas de *V. planifolia* in vitro. Todos los tratamientos se utilizaron brotes de 0,5 cm de altura regenerados in vitro. Estos brotes se cultivaron en medio (MS). Después de 180 días de cultivo, se evaluó supervivencia, longitud de planta, número de hojas, número de raíces y longitud. Las siembras in vitro manifestaron valores mínimos en las variables de crecimiento evaluadas cuando se incrementó la concentración de agentes osmóticos e inhibidores en el medio. El tratamiento con PAC mantuvo el 100 % de duración de los brotes. Pero el compuesto causó anomalías en la parte superior y las raíces de las plantas in vitro. En cambio, para ABA, los brotes presentaron valores más bajos en todas las variables evaluadas y una supervivencia del 90 % cuando se aplicó 3 mg L⁻¹. Los resultados consistieron establecer una técnica de protección in vitro a corto plazo para *V. planifolia* al extender el período entre subcultivos cada 180 días sin afectar la viabilidad y el fenotipo de la planta.

Villanueva et al. (2013) explica que las especies de orquídeas son una de las familias de plantas más buscadas de las plantas ornamentales. Su explotación sin escrúpulos, sumada a las exigencias ambientales para la reproducción y el desarrollo natural, ha llevado a que muchas especies estén amenazadas y en peligro de extinción. El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en Lambojeca, Perú, realiza investigaciones sobre domesticación, micropropagación y conservación de especies de orquídeas en la Provincia de San Martín, en la Región nororiental del Perú. Las especies *Cattleya simbodium*, *Cattleya rex* y *Cattleya máxima* fueron colectadas de sus hábitats naturales. Los ejemplares fueron aclimatados en vivero con sus semillas en medio a base de Murashige & Skoog (macro y micronutrientes) y vitaminas (inositol 100 mg, clorhidrato de piridoxina 0,5 mg, niacina 0,5 mg, ac, pantotenato de calcio 2 mg y tiamina 0,1 mg), agua de coco 100 ml, azúcar 20 g, agar 5,6 g, carbón activado 2 mg/L, pH 5,5 y ácido giberélico,

BAP, ANA como reguladores del crecimiento según la etapa de micropropagación. Se mantienen y eclosionan en condiciones ambientales y doradas típicas de la región costera nororiental de la provincia de Lambayeque *C. maxima* y *C. rex* son especies adaptadas a climas costeros, han demostrado viabilidad para micropropagación y conservación a nivel de laboratorio, y son aptas para propagación y comercialización.

Borges García et al. (2011), nos indica que trabajar con material vegetal para la propagación in vitro es fundamental. Es por ello por lo que optimizó el entorno de micropropagación del ñame chino, para ello evaluó diferentes antioxidantes como carbón vegetal, cisteína y sales de Murashige y Skoog (MS) con bencilaminopurina en el entorno de dispersión óptimo obtenido antes del experimento.

Cerna et al. (2014), señalaron que las actividades humanas ocasionan un peligro para el ecosistema de las orquídeas, es por ello por lo que se propone la existencia de bancos de germoplasma, lo cual preserva las especies amenazadas de este taxón. El estudio realizado se dividió en dos fases: in situ y ex situ. Se realizó en Ecuador, se obtuvieron semillas a partir de capsulas de 50 tipos diferentes de orquídeas, se almacenaron 12 semillas de especies de orquídeas en un tubo vacío. Las orquídeas con mayor viabilidad independientemente del tratamiento fueron: *Sobralia rosea* (90 %), *Sievekingia marsupialis* (90 %), *Maxillaria rufescens* y *Epidendrum sp1* (75 %).

2.2. Clasificación botánica de *Phragmipedium kovachii*

Según el Club peruano de orquídeas (2010), la clasificación botánica es la siguiente:

Reino	: Plantae
Clase	: Liliopsida
Orden	: Asparagales
Familia	: Orchidaceae
Sub familia	: Cyripedioideae
Género	: Phragmipedium, Rolfe
Especie	: <i>P. kovachii</i>

Número cromosómico 2n.: 32

2.3. Banco de germoplasma

Según Andalucía (1994) es necesario contar de medios y técnicas que permitan actuar de forma rápida y eficaz en los casos más críticos. De tal manera las técnicas de preservación *ex situ* (fuera del hábitat natural), son imprescindibles dentro de un programa de conservación global. Un sistema de preservación *ex situ* muy satisfactorio es el banco de germoplasma. Así como una biblioteca es un centro de recursos de información, un banco de genes de plantas es un centro de recursos para material vegetal vivo. Es la preservación de las partes reproductivas de las plantas, ya sean semillas, esporas, polen, bulbos, esquejes u otras

formas vegetales, en un volumen muy pequeño o en la superficie bajo condiciones ambientales específicas para que sean claras y fácilmente identificables. Disponibilidad.



Figura 1. Modelo de un banco de germoplasma

2.4. Tipos de germoplasma

La importancia de un banco de germoplasma es recolectar especies con características útiles para ellos, como las asociadas con la resistencia. Estos germoplasmas pueden incluir parientes silvestres y cultivares desarrollados por agricultores en otras regiones. Es importante adquirir y mantener variedades adaptadas a los agroecosistemas y sistemas agrícolas donde la comunidad agrícola es el principal grupo de usuarios. Luego, el interés pasó del germoplasma con personalidades útiles a las variedades de valor agregado. Cuando el mandato del banco de germoplasma dicta la preservación de la diversidad tradicional de una nación, es responsabilidad del banco recolectar las variedades nativas más antiguas para preservar el patrimonio biocultural de la nacional biocultural (Engels y Visser, 2007).

2.5. Conservación de recursos fitogenéticos

2.5.1. Preservación *in situ*

Forma de conservar los ecosistemas naturales o ecosistemas, y la subsistencia y restauración de ejemplares viables en el caso de especies mejoradas (ETSIA, 2006).

La preservación *in situ* de los tipos de orquídeas en peligro implica la conservación adecuada de sus hábitats. Debido a que tiene un hábitat epífita preferido, cualquier actividad que resulte en la protección de bosques o arbustos contribuye a los esfuerzos de conservación de las orquídeas. Para la conservación *in situ* se debe de conservar poblaciones mínimas viables, análisis de viabilidad de poblaciones y estudios relacionados con la

restauración ambiental en áreas de especies amenazadas. La conservación in situ es la estrategia de preservación de especies ideal o preferida porque involucra la preservación de ecosistemas, y la preservación de especies amenazadas en sus ambientes naturales es el enfoque más apropiado para resolver los problemas de conservación de especies en peligro de extinción porque se cree que la forma más lógica y económica de proteger una entidad biológica es dentro del ecosistema al que pertenece (Gómez-Campo, 1985).

2.5.2. Protección ex situ

La protección ex situ significa que la creación de colecciones de recursos fitogenéticos tiene ventajas prácticas sobre la conservación in situ, ya que la recopilación de material genético e información relacionada puede reducir costos, mejorar el control y facilitar enormemente la entrega. Materiales para investigadores y usuarios en general. Sin embargo, debido a su naturaleza estática, este tipo de conservación tiene la desventaja inherente de impedir que continúe el proceso evolutivo. Con los fondos suficientes para llevar a cabo íntegramente la obra y ocasionar pérdidas irreversibles. Calle. Los Vavilov de San Petersburgo son tan importantes y simbólicos en las colecciones institucionales como el instituto (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 1996).

Actualmente se estima que aproximadamente se almacenan 6 millones de muestras en colecciones ex situ en más de 1300 bancos de germoplasma en todo el mundo (FAO, 1996).

La preservación ex situ pertenece a varias actividades importantes que componen la producción de material fitogenético. Se cree que complementa las estrategias de preservación in situ fuera de sus ambientes naturales, las plantas se conservan ex situ en bancos de germoplasma y colecciones, donde pasan por diversas etapas y procedimientos que requieren personal capacitado. Aunque se reconoce ampliamente que el mecanismo de conservación más eficiente y efectivo es la conservación del hábitat, se reconoce que los métodos de preservación ex situ son un componente clave de los programas generales de conservación, plan de conservación ex situ pertenece a varias actividades importantes que componen la gestión de los recursos fitogenéticos. Se cree que complementa las estrategias de conservación in situ. Fuera de sus hábitats naturales, las especies se conservan ex situ en bancos de germoplasma y colecciones, donde pasan por diversas etapas y procedimientos que requieren personal capacitado. Aunque se reconoce ampliamente que el mecanismo de conservación más eficiente y efectivo es la conservación del hábitat, se da la importancia a los métodos de conservación ex situ son un componente clave de los programas generales de conservación.

Los programas de conservación ex situ complementan la conservación in situ mediante el almacenamiento a largo plazo de germoplasma representativo de la población, lo que permite una mejor comprensión de las propiedades anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado y proporciona la base para programas de mejoramiento, programas de mejora genética y mejoramiento, reintroducción o introducción (Pence, como se citó Iriondo, 2001).

Por otro lado, existen especies como la subespecie *Phragmipedium exstaminodium*. *Exstaminodium* y *Mexipedium xerophyticum*, porque sus hábitats se han perdido o por lo tanto están gravemente amenazados, sus poblaciones son muy escasas, no pueden sobrevivir en el medio natural y deben ser protegidas ex situ (Rebeca et al., 2011).

Existen otras formas de preservar especies en peligro de orquídeas como los bancos de polen, la criopreservación y los bancos de yemas, muchas orquídeas en peligro de extinción. Por ejemplo, las Laelias no son difíciles de cultivar a partir de semillas (excepto por la autoincompatibilidad de *Laelia goludiana*) (Halbinger y Soto, como se citó en Hågsater, Eccardi y Becerra, 2003).

La preservación ex situ no es una condición ideal porque no es la mejor manera de preservar una especie porque la variación genética no se conserva durante la evolución como puede ocurrir en la naturaleza, pero esta estrategia es mejor que perder la especie por completo (Halbinger y Grove, 1997).

2.5.3. Protección de campo

La conservación utilizando colecciones de plantas silvestres preservadas es principalmente para especies que son estériles o cuyas semillas no se pueden preservar por largos períodos de tiempo. También se utiliza para especies que se reproducen asexualmente para mantener clones y que tardan mucho en producir semillas, como las especies forestales. Entre los cultivos conservados en tales colecciones se encuentran algunos cultivos muy importantes como la papa, la yuca, el ñame, la batata, el plátano y los árboles frutales en general.

2.5.4. Almacenamiento de semillas

Esta técnica de conservación es actualmente el más utilizado en los bancos de recursos de germoplasma y es el más efectivo, económico y seguro para la preservación ex situ en la mayoría de las especies de clima templado, pudiendo sus semillas conservar su vigor por mucho tiempo bajo ciertas condiciones. Régimen (semillas de los "ortodoxos"). El proceso de conservación de semillas consta de varias fases sucesivas, comenzando por el registro de entrada y los pasos de limpieza necesarios en cada caso. Luego, las semillas se secan en un ambiente de baja humedad relativa hasta alcanzar la humedad interna

deseada, luego de lo cual se envasan herméticamente y se almacenan en una cámara frigorífica. Elegir el recipiente adecuado es un aspecto crítico de la conservación y, de hecho, la pérdida de hermeticidad durante el almacenamiento puede ser una causa principal de la erosión genética de varios acervos genéticos valiosos.

2.5.5. Preservación in vitro

El cultivo in vitro de especies vegetales sirve para preservar una especie de importancia, para ello se realiza en un ambiente estéril y bajo condiciones adecuadas. La tecnología de conservación de cultivos in vitro se introdujo en la década de 1980 y ahora se utiliza sistemáticamente para la conservación e intercambio de recursos de germoplasma de especies como la papa, la yuca o el plátano (Ashmore, 1997). Las ventajas del cultivo in vitro son las altas tasas de propagación, el mantenimiento de material vegetal en condiciones estériles y los requisitos de espacio reducidos en comparación con las colecciones de campo. Las puntas y los meristemas se prefieren para el almacenamiento in vitro de estructuras de plantas iniciales porque presentan un riesgo mucho menor de variación genética (variación somaclonal) del material que cuando se utilizan 'callos' o estructuras adventicias. El intervalo entre repicados puede extenderse reduciendo el crecimiento del cultivo usando una variedad de sistemas, aunque los más comúnmente usados son la reducción de la temperatura ambiente y la deficiencia de nutrientes. La criopreservación de material cultivado in vitro en nitrógeno líquido también es una alternativa de almacenamiento que aún está en desarrollo (Martínez, s.f).

Las técnicas de preservación in vitro se consideran especialmente importantes en las especies hortícolas con semillas recalcitrantes o de propagación vegetativa, por lo que la yuca es una de las especies más mejoradas utilizando este método (Figura 3). Lo mismo sucede con la totalidad de las rosas, que son heterocigóticas y muy variables y se propagan por métodos vegetativos. En Irán, una gran cantidad de especies de rosas están en peligro y se necesitan métodos de conservación para protegerlas (Kavand et al., 2011).



Figura 2. Preservación *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta*).

La micropropagación implica practicidad y eficiencia, es por ello que se ha implementado en diferentes organizaciones. La propagación *in vitro* de orquídeas es una parte primordial de los programas de preservación, especialmente para la obtención de híbridos comercialmente interesantes (Halbinger y Soto, 1997).

2.6. Técnica de conservación *in vitro*

Según Leyanis García-Águila (2007), hay dos técnicas de preservación *in vitro*, cuyo trabajo varía en función del tiempo de almacenamiento deseado:

2.6.1. Técnica de desarrollo mínimo

La técnica de desarrollo por tiempo mínimo ha sido ampliamente utilizada en la práctica de preservación de germoplasma y hay muchas muestras de aplicación en bancos *in vitro*. Entre otros, *Saccharum* sp. (caña de azúcar) (Taylor y Dukin, 1993), yuca (Roca et al., 1994) y papa (Toledo y Golmirzaie, 1998).

Esta técnica es una de las opciones más importantes de poder garantizar el éxito de los programas de preservación, ya que es relativamente simple y fácil de establecer utilizando el equipo habitual en los laboratorios de cultivo de tejidos. Para ello se modifica la composición del medio, por ejemplo, reduciendo el contenido mineral (Rayas et al., 2002), añadiendo sustancias activas osmóticas y/o incluyendo inhibidores del aumento (Espinosa et al., 2002).

El objetivo es aumentar la vida del cultivo *in vitro* sin provocar cambios genéticos, de modo que los procesos celulares no se detengan por completo, sino que se reduzca su ritmo de avance, reduciendo así la frecuencia de transferencia de plantas a medio fresco (Roca et al., 1994).

2.6.2. Método de conservación a baja temperatura

Para el almacenamiento a prolongado plazo se utiliza la criopreservación (acumulación en nitrógeno deducido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), ya que se abstienen todos los procesos metabólicos y la división celular, además, el material vegetal criopreservado pudiendo almacenar en espacios reducidos, en condiciones seguras, sin variación genética y sin altos precios de manutención (Hirai y Sakai, 2000).

Engelmann y Takagi (2000), considera dos grupos de métodos de criopreservación: los métodos clásicos basados en la deshidratación química parcial y la congelación programada de osmoprotectores, y los métodos más nuevos basados en la vitrificación, que consiste en cambiar el estado líquido a un estado intermedio llamado vítreo. cuerpo, que impide la formación de cristales de hielo, es la principal causa de daño mecánico a la membrana durante la congelación (Towill, 1996).

Se reconocieron muchas técnicas dentro de ellos siete procedimientos, entre ellos: encapsulación-deshidratación, vitrificación propiamente dicha, encapsulación-vitrificación, secado, presecado, secado de presecado y la técnica de la gota (Engelmann, 2000).

2.7. *Phragmipedium kovachii*, producción en laboratorio IN VITRO

En la Región San Martín se cuenta con seis Laboratorios *in vitro*, de las cuales INIBICO, viene trabajando un proyecto sobre la producción en laboratorio mediante la tecnología *in vitro* de plántulas de *Phragmipedium kovachii*, los resultados son sorprendentes, al observar en camas almacigueras miles de plantitas en proceso de aclimatación y decenas de frascos que tienen en su interior miles más de orquídeas, que esperan ser aclimatadas con esta técnica podemos abastecer el mercado local y de esta manera evitaremos extracción de los bosques de germoplasma de la kovachii (Leon, 1995).

2.8. Estrategias de preservación *in situ* y *ex situ*

Los métodos de preservación *ex situ* pueden ser una alternativa viable o el último recurso para evitar una posible extinción (Zelenko, 2007; Seaton y Pritchard, 2003). Pueden variar mucho en forma y disponibilidad, por lo que se deben utilizar todos los sistemas que maximicen la diversidad genética (Frankel y Soulé, 1981).

La conservación del arbusto xerófilo en REPSA ha experimentado varios períodos de existencia frágil, y su existencia se ha deteriorado en cada etapa al haber sufrido varios procesos de degradación. Este hábitat se va deteriorando año tras año y la vegetación autóctona sólo será documentada en herbarios y libros si no se aprecia la importancia del área protegida en su conjunto. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de acuerdos de

conservación inmediatos en paralelo con el mantenimiento del hábitat a través de varias vías de conservación de germoplasma (Ramsay y Dixon, 2003).

El almacenamiento en nitrógeno líquido o la crioconservación pueden convertirse en uno de los sistemas más efectivos para la conservación del germoplasma. La temperatura alcanzada (-196 °C) detiene todos los procesos metabólicos, permitiendo la conservación fisiológica únicamente de células con potencial embriogénico o tejidos, como los meristemas, a partir de los cuales se puede regenerar el mismo genotipo que el donante (Kantha, 1981, 1982). Sin embargo, esta técnica está lejos de ser utilizada para la conservación a largo plazo debido a la reducción significativa en la viabilidad de células y tejidos (Yamada et al., 1991).

2.9. Perspectivas a futuro

La tecnología de conservación de germoplasma se ha aplicado con éxito a algunas variedades de orquídeas REPSA con el objetivo principal de propagación y reintroducción. Sin embargo, queda mucho por hacer, como un estudio demográfico de las especies más vulnerables (Tinoco, en proceso), que permitirá evaluar las plantas que necesitan restauración, teniendo en cuenta los métodos de reproducción, los factores de supervivencia en campo, la diversidad genética, etc. En el caso de las orquídeas terrestres, que se caracterizan por una alta especialización con otros organismos, es claro que las estrategias de conservación simbiótica y simbiótica tienen diferentes ventajas (Ortega-Larrocea et al., 2009).

El mejoramiento asimbiótica brinda acceso a clones de alto valor comercial que pueden comercializarse para reducir la presión de recolección, es una alternativa de ingresos para la financiación de la investigación y también permite la conservación ex situ de genotipos valiosos. Atractivas especies de flores como cutzis (*D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus*) es otra posibilidad. Por otro lado, además de la reproducción asexual para diversos fines, la reproducción simbiótica es muy efectiva en especies del género *Bletia* y ha demostrado ser invaluable en la conservación de genotipos silvestres en programas de conservación (Ortega-Larrocea et al. 2009).

2.10. Banco de recursos de germoplasma y germinación *in vitro* de cactáceas endémicas y en estado de conservación

El cactus es representativo de la biodiversidad de México y una de las doce familias con más géneros y especies en Guanajuato, la mayoría de las cuales son endémicas. Se utilizan como alimento, medicina, forraje y plantas ornamentales. Los métodos tradicionales de conservación a veces no tienen éxito. El cultivo *in vitro* es un método alternativo de cultivo de plantas. El banco de recursos de germoplasma proporciona los

materiales necesarios para la propagación, conservación, investigación y restauración ecológica. El objetivo de este proyecto es establecer un banco de germoplasma para la conservación *ex situ* de tres genotipos amenazados o protegidos de cactáceas anémicas, y analizar y determinar la germinación y los protocolos para fines de conservación. Las semillas recolectadas están destinadas al estudio de procesos en el laboratorio con el objetivo de crear las condiciones ideales para su almacenamiento, conservación y propagación *in vitro*. Un total de 1267 semillas recibieron 1267 semillas de la fábrica. 1138 utiliza este método para recomendar la posibilidad. Para la conservación utilizar bolsas de papel kraft y refrigerar de 0 a 10 °C: Se utilizarán cuatro concentraciones de sales minerales de Murashige y Skoog (0, 25, 50 y 100 %) para cultivos *in vitro* con la adición de la fitohormona 6-bencilo Aminopurina, ácido acético y ácido indolacético, y la incubación será a temperatura ambiente con un fotoperíodo de 16 horas. La biotecnología y los métodos *in vitro* pueden ayudar a preservar el germoplasma de manera más eficiente a corto y mediano plazo (González, s.f.).

2.11. Condiciones de incubación

2.11.1. Medio de cultivo

La disminución de la concentración de minerales (carbohidratos metabolizables) en el medio es una estrategia importante para reducir el crecimiento del explante, y el potencial osmótico del medio también se puede aumentar mediante el uso de concentraciones gelificantes de carbohidratos no metabolizables como el manitol y la adición/eliminación de reguladores de crecimiento para que los explantes absorban nutrientes lentamente y así reduzcan el desarrollo (Engelmann, 2011; Lima et al., 2011; Sánchez & Jiménez, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la investigación

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la Facultad de Ciencias Agraria en la Universidad Nacional de San Martín (UNSM) en la región San Martín, laboratorio que realiza investigación en micro propagación in vitro de orquídeas por más de 20 años con la finalidad de contribuir a la preservación de especies vegetales.

3.1.1. Ubicación política

Departamento : San Martín
Provincia : San Martín
Distrito : Morales
Lugar : UNSM-T

3.1.2. Ubicación geográfica

Altitud : 283 m.s.n.m.
Latitud Sur : 6° 28' 45'' del
Ecuador
Longitud Oeste : 76° 24' 09'' del
Meridiano de Greenwich

3.2. Componentes en estudio

3.2.1. Medios de cultivo

- a. Medio de cultivo M&S concentración total
- b. Medio de cultivo M&S media concentración
- c. Medio de cultivo de GAMBORG B5

3.2.2. Concentración de Manitol

- a. Concentración 0 g/L
- b. Concentración 10 g/L
- c. Concentración 20 g/L
- d. Concentración 30 g/L

3.3. Parámetros evaluados

- Número de hojas
- Número de tallos
- Número de raíces
- Altura de planta
- Longitud de raíz

- Longitud de hojas

3.4. Materiales utilizados

- Frascos de vidrio de 15onzas.
- Tubos de ensayo de 25 x150 mm.
- Matraz Erlenmeyer de 250 y500 ml.
- Placas Petri de 10 x 100 mm.
- Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml.
- Mechero con alcohol.

3.4.1. Laminas, materiales de metal

- Pinza larga.
- Pinza pequeña.
- Mango para bisturí.
- Bisturí N° 10 y 11.
- Tijera.
- Cuchara de metal.

3.4.2. Espátula Equipos

- Aire acondicionado de 24 000 BTU.
- Olla autoclave de 40L.
- Destilador de agua.
- Cámara de flujo laminar.
- Incubadora.
- Refrigeradora de 15 “.
- Peachimetro.
- Balanza analítica.

3.4.3. Reactivos

- Carbón activado.
- Sales minerales M &S y Gamborg.
- Manitol o sorbitol.
- Agar
- Lejía Comercial al 5,25 % de (NaOCl)
- Alcohol 96°
- Sales minerales (Macro y micronutrientes).

3.4.4. Otros

- Algodón.

- Papel toalla.
- Mascarilla.
- Plástico sellador (King max).
- Papel aluminio.
- Hilo pabilo.
- Detergente.
- Mandil.
- Plumón indeleble.
- Fosforo.

3.5. Metodología

3.5.1. Características del ensayo

El ensayo es experimental, realizado en condiciones de laboratorio, estableciendo dos componentes de estudio, y con un diseño experimental para cada componente.

a. Preparación de materiales

Se preparó todos los materiales y equipos a utilizar, es decir lavándolos bien los materiales de vidrio a fin de estar limpios para ser usados en la preparación de medios de cultivo, también se pesaron en una balanza analítica los siguientes insumos: carbón activado 2 g/L, azúcar 20 g/L, agar 11 g/L, y los macro y micronutrientes.

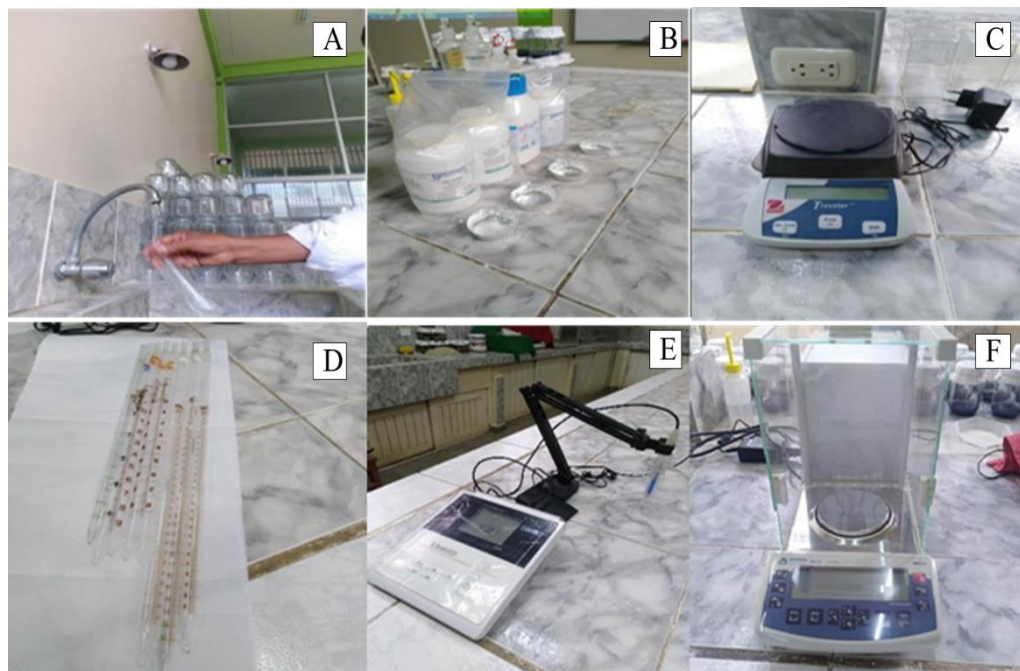


Figura 3. A) Lavado de tubos ensayo, B) reactivos para pesar, C) pesado de reactivo, D) lavado de pipetas, E) peachimetro de medición, F) balanza analítica para pesar reactivos.

b. Preparación de medio de cultivo

Se preparó tres clases de medios nutritivos que son las siguientes: El medio de Murashige Skoog a concentración total (M&S-T), a concentración media (M&S ½) y se utilizaron macro y micronutrientes y como suplemento se agregó azúcar blanca la cantidad de 20 g/L, agar 11 g/L, carbón activado 2 g/L, vitaminas como la tiamina y ácido nicotínico y el medio de cultivo de GAMBORG B5, y los tres medios seajustaron a un pH 7, agitando bien se hizo la dispensada en cada tubo de ensayocolocando 12 ml de medio de cultivo.



Figura 4. A) Estoqueado de medio cultivo, B) preparando y agregando agar, c) tubos de ensayo con medio, D) medio cultivo para esterilizar, E) medios colocados en autoclave, F) esterilización de medio cultivo.

Para la esterilización, esterilicé en autoclave, tres medios a 120° C, y presión atmosférica (15 libras), durante 15 minutos, luego agité bien, enfrié y refrigeré para su uso posterior. Tal como se muestra en la figura 4.

3.5.2. Variables de estudio

Dentro las variables en estudio tendremos los siguientes:

- Variable independiente: adaptabilidad de plántulas de *Pragmipedium kovachii* (En función a los medios de cultivo: (M&S total, M&S ½, Gamborg B5) y fuente de azúcar (Manitol).
- Variable dependiente: efectos morfológicos (En función a los parámetros: número de hojas, número de tallos, números de raíces, altura de la planta, longitud de raíz, longitud de hojas, etc.).

3.5.3. Descripción de los tratamientos

En la Tabla 1, se muestra la descripción de los tratamientos que se distribuyeron para la instalación del ensayo. Así mismo, se muestra las concentraciones de macro y micronutrientes para preparación de medios de cultivo según Murashigge & Skoog (Tabla 2) y Gamborg (B5) (Tabla 3).

Tabla 1. Tipos de medios de cultivo y concentraciones de manitol (g/l), utilizados para el desarrollo de plántulas de *P. kovachii*.

Tratamientos	Medio de cultivo	Concentración de manitol (g/l)
T ₁	MS	0
T ₂	MS	10
T ₃	MS	20
T ₄	MS	30
T ₅	MS 1/2	0
T ₆	MS 1/2	10
T ₇	MS 1/2	20
T ₈	MS 1/2	30
T ₉	Gamborg B5	0
T ₁₀	Gamborg B5	10
T ₁₁	Gamborg B5	20
T ₁₂	Gamborg B5	30

Tabla 2. Macro y micronutrientes para preparación de medios de cultivo según Murashigge & Skoog.

Componentes	Fórmula	CC. total (MS)	A (1/2) MS Concentración
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	20 ml	10 ml
Nitrato de potasio	KNO ₃	20 ml	10 ml
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	5 ml	2,5 ml
Sulfato de magnesio heptahidrato	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 ml	2,5 ml
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5 ml	2,5 ml
Ioduro de potasio	KI	5 ml	2,5 ml
Sulfato de manganeso heptahidrato	MnSO ₄ ·7H ₂ O	5 ml	2,5 ml
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	5 ml	2,5 ml
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5 ml	2,5 ml
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5 ml	2,5 ml
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 ml	2,5 ml
Cloruro de cobalto dihidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 ml	2,5 ml
Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	20 ml	10 ml
Ácido etilendiaminotetracético dihid	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	20 ml	10 ml
Vitaminas			
Thiamina		0,4 ml	0,4 ml
Ácido nicotínico		0,5 ml	0,5 ml
Suplementos			
Carbón activado		2 g	2 g
Azúcar		20 g	20 g
Agar		11,5 g	11,5 g
Agua de coco		10 %- 20 %	10 % - 20 %

Tabla 3. Macro y micronutrientes para preparación de medios de cultivo, según gamborg (B5).

Componentes	Fórmula	Miligramos /litro (mg/l)
Macronutrientes		
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134
Nitrato de potasio	KNO_3	2500
Sulfato de magnesio	MgSO_4	250
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{aq}$	150
Fosfato de potasio monobasico	KH_2PO_4	0,15
Micronutrientes		
Ioduro de potasio	KI	0,75
Ácido bórico	H_3BO_3	3,0
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,0
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Cloruro de cobalto dihidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Ácido etilendiaminotetracetico dihid	Na_2EDTA	37,3
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Vitaminas		
Myo - inositol		100
Ácido nicotínico		1
Piridoxina		1
Tiamina HCL	HCL	10
Hormonas		
Kinetina		0,1

3.5.4. Diseño estadístico

Un diseño completamente al azar (DCA) con permutaciones factoriales 3 x 4, donde el factor A es el tipo de medio (M & S total, M & S medio y solución Gamborg b5) y el factor “B” es la concentración de Manitol (0,10, 20 y 30 g/l). Se realizaron un total de 12 tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento, y cada repetición fue una unidad experimental (1 plántula de *Pragmipedium kovachii*), totalizando de 120 unidades experimentales (Tabla 4). Todos los datos fueron tabulados en hojas de cálculo Excel, siendo procesados y analizados mediante un análisis de varianza (ANVA), y un test de comparación de medias (Tukey, $P < 0,05$). Para realizar este análisis se utilizó un programa estadístico InfoStat (versión 2012e; Córdoba, Argentina).

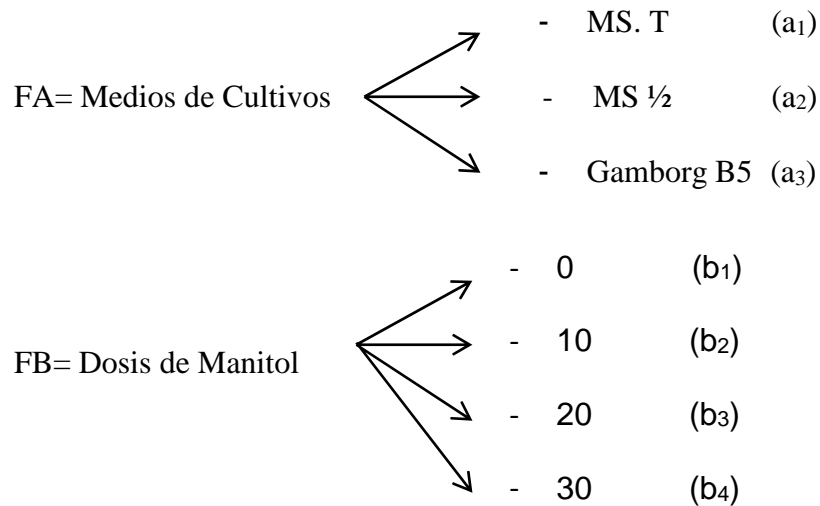


Tabla 4. Descripción de los tratamientos y combinaciones de medios de cultivo y dosis de Manitol para retardar el crecimiento de plántulas de *P. kovachii*.

Tratamientos	Factor “A”	Factor “B”	Descripción
T ₁	a ₁	b ₁	MS-T 0 g
T ₂	a ₁	b ₂	MS-T 10 g
T ₃	a ₁	b ₃	MS-T 20 g
T ₄	a ₁	b ₄	MS-T 30 g
T ₅	a ₂	b ₁	MS-1/2 0 g
T ₆	a ₂	b ₂	MS-1/2 10 g
T ₇	a ₂	b ₃	MS-1/2 20 g
T ₈	a ₂	b ₄	MS-1/2 30 g
T ₉	a ₃	b ₁	Gamborg B5 0 g
T ₁₀	a ₃	b ₂	Gamborg B5 10 g
T ₁₁	a ₃	b ₃	Gamborg B5 20 g
T ₁₂	a ₃	b ₄	Gamborg B5 30 g

3.5.5. Obtención del material vegetal

El material vegetal (plántulas), se ha obtenido del Instituto de Investigación Biológica de Las Cordilleras Orientales (INIBICO), que se dedica a la propagación de orquídeas, siendo autorizado por parte del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). El proceso de selección de plántulas se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, en la figura 5 se observan las plántulas de *P. kovachii*.



Figura 5. plántulas de *P. kovachii* sembradas

3.5.6. Extracción de las plántulas

En el Laboratorio (Área de siembra y transferencia) se procedió a extraer las plántulas de las botellas sembradas uno por uno, para luego colocarlos en cada tubo de ensayo que le corresponde, para evitar contaminación este procedimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, luego se colocó en el área de incubación para seguir su proceso de desarrollo de la plántula.

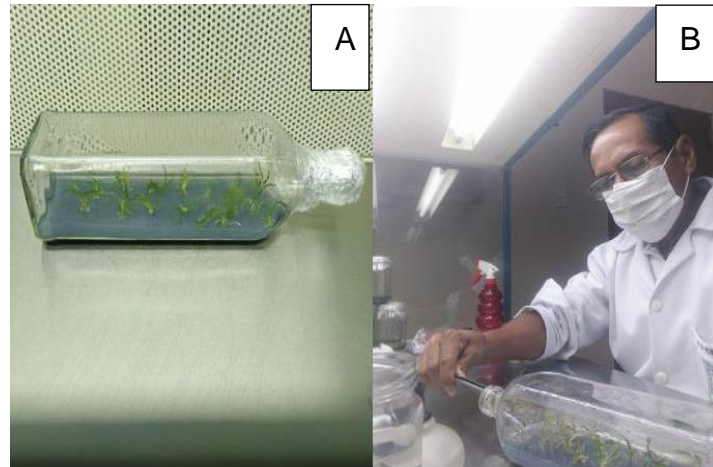


Figura 6. A) Plántula de *P. kovacchii* en botella, B) Extracción de plántula

3.5.7. Siembra de plántulas

El proceso de siembra de las plántulas, se realizó sacándolos de una botella donde estaban para colocarlos en una placa Petri estéril seleccionando a las mejores plantas, luego con una pinza desinfectada y estéril, se realizó la siembra, colocando una plántula en cada tubo de ensayo que contenían elementos nutritivos en estudio. Cada tubo fue sellado con papel, papel aluminio y tapado respectivo, rotulando los datos de siembra, para luego ser llevados al área de incubación a una temperatura, humedad relativa y Luz controlados, para luego dar inicio a la etapa de crecimiento, desarrollo y su conservación e iniciar con las evaluaciones respectivas.

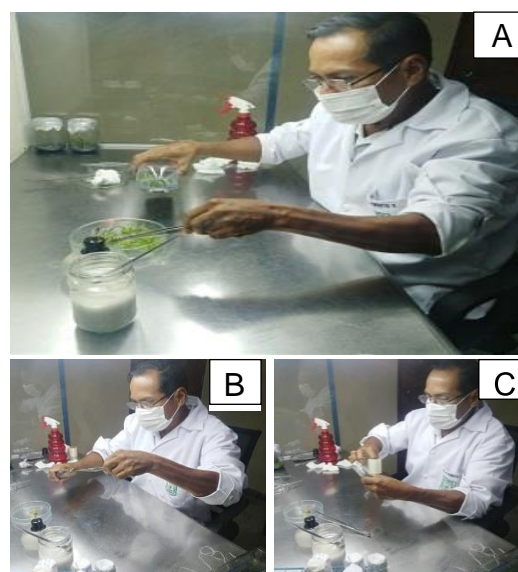


Figura 7. A) Extracción de plántula de botella, B) Siembra de plántula en tubo, C) sellado del tubo.

3.5.8. Parámetros de evaluación de características morfológicas

La toma de datos del desarrollo vegetativo, se realizó cada 15 días después de la siembra (DDS), hasta los 165 DDS, registrando cada dato en una ficha de evaluación.

a. Números de hojas

Para esta característica se contó el número de hojas bien desarrolladas en cada plántula del tubo, con la ayuda de una lupa y su anotación, (Figura 8) para todos los tratamientos.

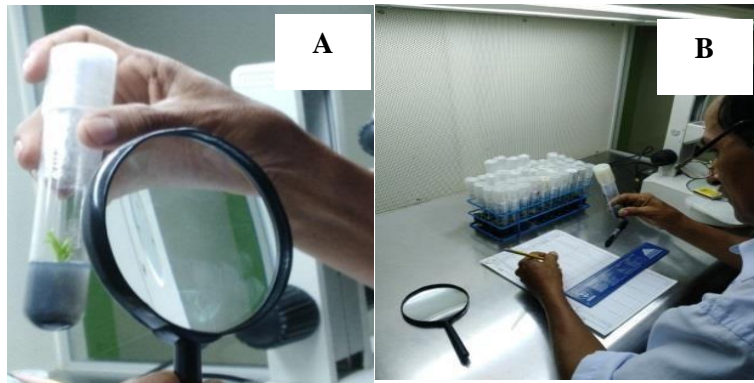


Figura 8. A) conteo de hojas, B) anotación números hojas.

b. Longitud de hojas (cm)

Para caracterizar la longitud se hizo las mediciones mediante una regla milimétrica, desde el nivel del tallo de la plántula hasta la punta final de la hoja, en la Figura 9 se muestra la medición de la hoja.

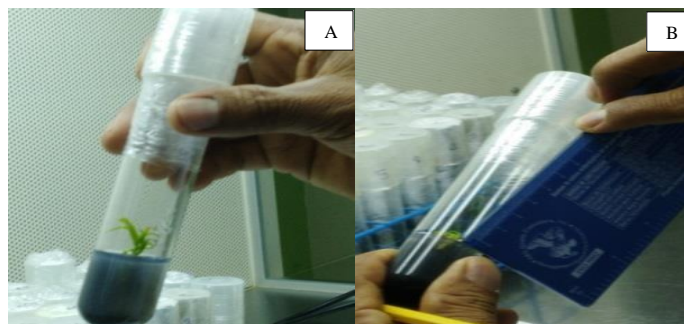


Figura 9. A) Plántula sembrada, B) medición de hoja.

c. Números de tallos

Para esta característica se contó el número de tallos de cada plántula de todos los tratamientos tal como se muestra en Figura 10 y se anotaron los datos.

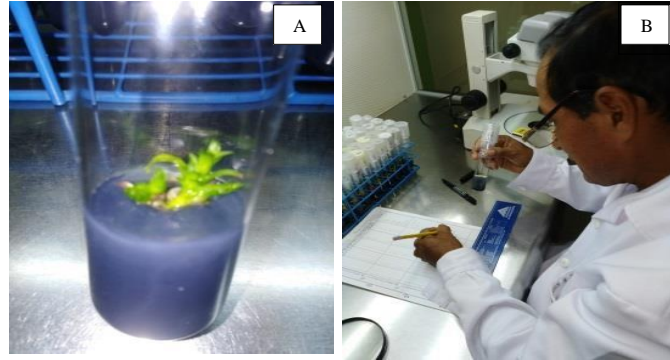


Figura 10. A) Plántula sembrada, B) conteo número tallos.

d. Números de raíces

Para esta característica se contó el número de raíces de cada plántula de todos los tratamientos en estudio tal como se muestra en la Figura 11.

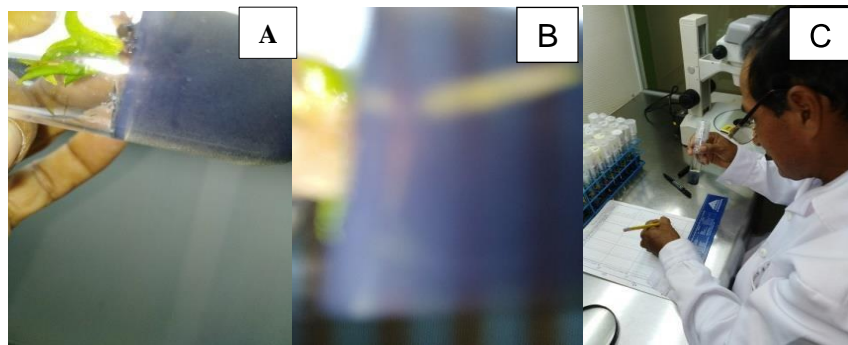


Figura 11. A) Plántula en tubo, B) raíz en crecimiento, C) conteo de raíz.

e. Longitud de raíces (cm)

Para caracterizar la longitud de raíces se hizo las mediciones mediante una regla milimétrica, para todos los tratamientos tal como se muestra en la Figura 12.

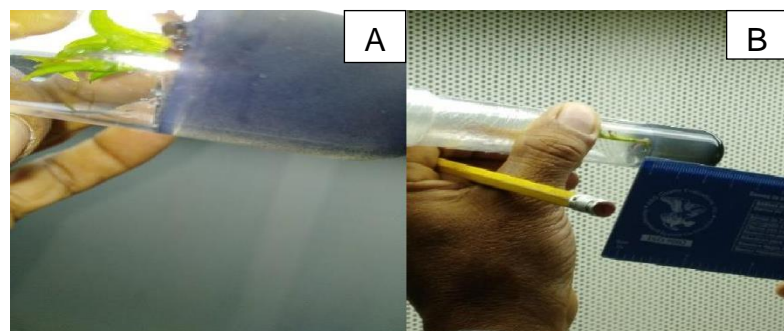


Figura 12. A) Plántula en tubo, B) medición de la raíz.

f. Altura de planta (cm)

Para caracterizar la altura se hizo la medición mediante una regla milimétrica, desde el nivel de la base de la plántula hasta la yema apical del tallo dominante, para todos los tratamientos y se anotó los datos (Figura 13).

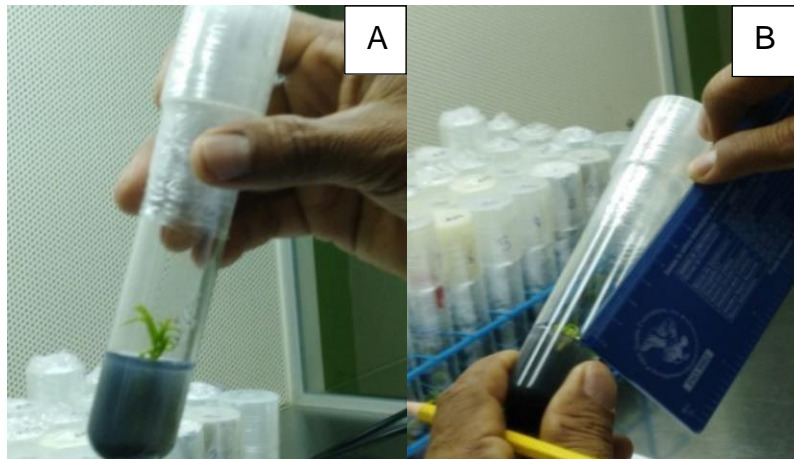


Figura 13. A) Plántula en tubo, b) Medición de la altura.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros morfológicos de plántulas de *Phragmipedium kovachii*

Para determinar las diferencias morfológicas que se encontraron en las plántulas, se realizó mediciones estandarizadas y programadas cada 15 días.

4.1.1. Altura de planta

El Análisis de Varianza (Tabla 5) para la altura de planta (cm) de *P. kovachii*, muestra que hubo diferencias altamente significativas para los dos factores en estudio (Medio de cultivo y Concentración de Manitol), además de la interacción de los mismos.

Tabla 5. ANVA de la altura de plántulas (cm) de *P. kovachii*, durante el desarrollo vegetativo.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	2,35	1,18	10,26	<0,0001 AS
Con de Manitol	3	0,59	0,2	1,72	0,0083 AS
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	2,39	0,4	3,47	0,0036 AS
Error	108	12,39	0,11		
Total	119	17,72			
AS= Altamente significativo					
R ² = 89 %		C.V= 8,3 %			$\bar{x} = 1 \text{ cm}$

La prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) (Figura 14) para la altura de planta (cm) de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que el tratamiento 8 (T₈: MS-T + 30 g de manitol) obtuvo menor altura de planta con un promedio de 0,27 cm, lo que demuestra que el medio de cultivo utilizado con la concentración de azúcares tuvo un retraso en el aumento de la altura de los explantes, ya que, a los 165 DDS, esto ha obtenido un retraso dentro del desarrollo vegetativo de *P. kovachii*, siendo este porcentaje de un total de 10 plántulas en promedio. Congruentemente para los demás tratamientos no hubo diferencias estadísticas significativas entre sí; sin embargo, los tratamientos con media concentración de MS fueron los que menos altura de plántulas presentaron (0,27 cm en promedio).

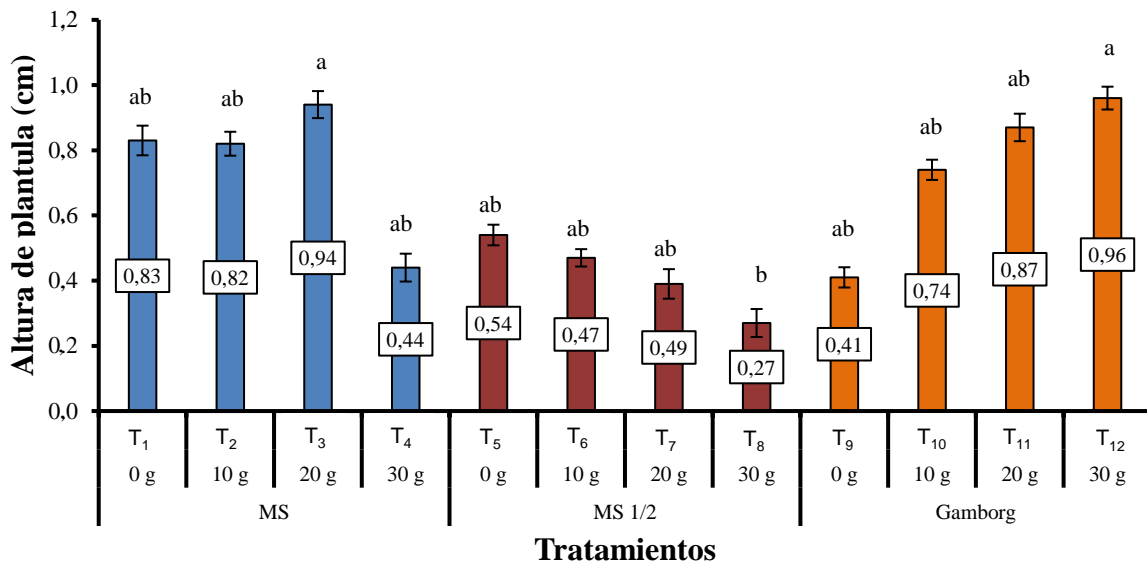


Figura 14. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la altura de planta (cm) de *P. kovachii*, evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) bajo condiciones de laboratorio.

Estos resultados son corroborado por Flores (2019), quien comparó dos formulaciones nutritivas del medio de cultivo M&S modificado más agua de coco y M&S modificado más plátano verde y un testigo (M&S) para la micropropagación de *Prosthechea crassilabia* Poepp & Endl, *Sobralia setigera* Poepp & Endl y *Epidendrum macrocarpum* Rich en condiciones de cultivo *in vitro*, en la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco (UNSAAC), donde obtuvo una mayor altura de planta para la especie *Epidendrum macrocarpum* con 1,17 cm. Seguidamente *Sobralia setigera* con 0,68 cm de tamaño y finalmente *Prosthechea crassilabia* con un promedio de 0,47 cm promedio/plántula a los 273 días. En este aspecto, el manitol solo inhibió el crecimiento de las plántulas del tratamiento MS a media concentración; probablemente este resultado se deba a la poca cantidad de medio de cultivo, resultados semejantes a los de Guzmán (2016), quien reporto menor crecimiento de plántulas de *Pragmipedium kovachii* en el medio MS.

Desde 1973, Echevarría ha declarado que los programas de reproducción de orquídeas en cautiverio son necesarios para preservar las especies casi extintas (Calderón-Sáenz, 2006). Ante esta situación se debe implementar una estrategia de conservación *ex situ*; así como priorizar el registro de variedades de orquídeas para incrementar la diversidad regional con el fin de marcar áreas naturales (Reed, Sarasan, Kane, Bunn & Pence, 2011). Esto es importante ya que, desde ahí parte el manejo integral que se le tiene que dar a la especie con fin de conservación, que se expresan en un buen comportamiento botánico en laboratorio, sin la necesidad de inhibidores de crecimiento.

Estos resultados son semejantes con Bello-Bello et al., (2015) quienes evaluaron efectos de cuatro concentraciones (0; 10; 20 y 30 g L⁻¹) y cuatro concentraciones (0; 1; 2 y 3 mg L⁻¹) de dos osmóticos: manitol y polietilenglicol (PEG). Efectos de dos inhibidores del crecimiento vegetal: ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC) sobre la supervivencia y el crecimiento de plantas de *V. planifolia* in vitro. En todos los tratamientos se utilizaron brotes de 0,5 cm de altura regenerados in vitro. Estos brotes se cultivaron en medio de cultivo (MS) y se encontró que al aumentarla concentración de osmóticos e inhibidores en el medio de cultivo, los cultivos in vitro mostraron valores más bajos en las variables de crecimiento evaluadas. La altura de un cultivo en un determinado tiempo está relacionada con cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo. Diversos trabajos de investigación científica evaluaron la mejora de mezclas complejas, reguladores de crecimiento, carbón activado, concentraciones de azúcar y formas de agregar fuentes de energía para mejorar el proceso de germinación y el desarrollo de las plantas. (Salazar-Rojas & Mata-Rosas, 2003).

4.1.2. Número de hojas

La prueba de varianza (Tabla 6) para el número de hojas de *P. kovachii*, hubo diferencias altamente significativas para ambos factores en estudio (Medio de cultivo y Concentración de Manitol), además de la interacción de los mismos y esto se corrobora con el coeficiente de correlación y variabilidad que estuvieron dentro del rango aceptable Calzada (1982).

Tabla 6. ANVA del número de hojas de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	872,52	436,26	7,42	<0,0001 AS
Con de Manitol	3	2602,49	867,5	14,75	<0,0001 AS
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	2098,88	349,81	5,95	<0,0001 AS
Error	108	6351,1	58,81		
Total	119	11924,99			
AS= Altamente significativo					
R ² = 87 %		C.V= 7,72%		x̄ = 10 hojas	

La prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) (Figura 15) para el número de hojas de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que los tratamientos 4, 7, y 8 (T₄: MS-T, con 30 g de manitol, T₇: MS ½, con 20 g de manitol y T₈: con 30 g de manitol), obtuvieron menor número de hojas con promedio de 4, 3 y 4 hojas respectivamente evaluado a los 165 DDS. La aplicación de manitol retardo el crecimiento de manera significativa en los tratamientos, ya que la reacción fue inversamente negativa (a mayor concentración de azúcares menor número de hojas), llegando a alcanzar niveles promedio de cinco hojas (en los tratamientos de mayor concentración de manitol: 30 g) dentro del desarrollo vegetativo de *Phragmipedium kovachii*.

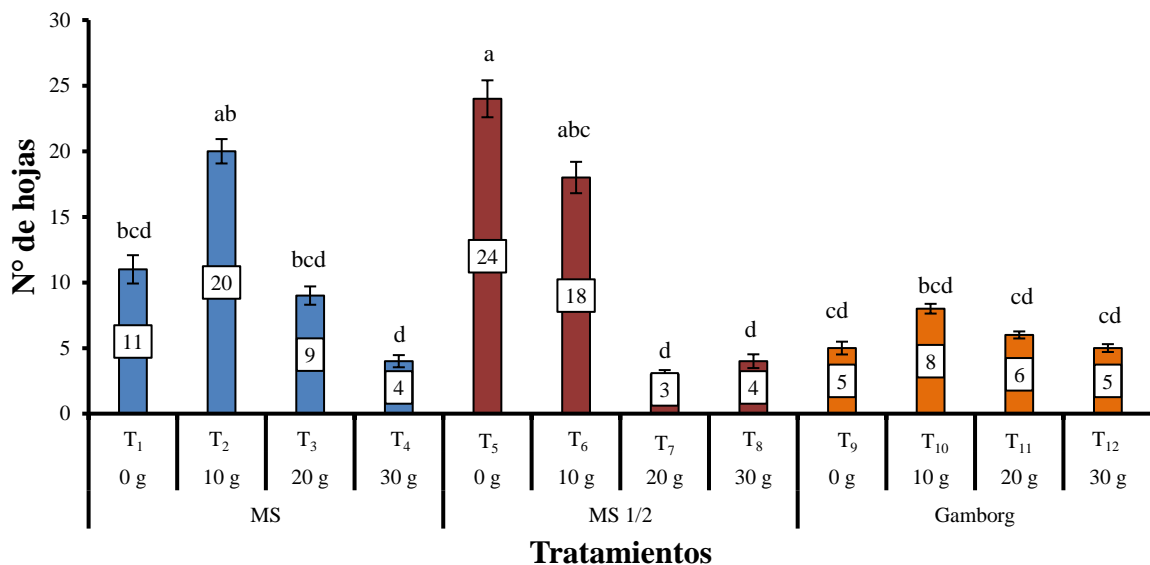


Figura 15. La prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de hojas de *P. kovachii*, evaluados a 165 días posteriormente de la siembra (DDS) en laboratorio.

El número de hojas estuvo relacionado con la altura de cada plántula por tratamiento, teniendo en cuenta que los mejores tratamientos se dieron en el medio MS- T y media concentración; esto se debe a que no hubo diferencia entre el medio MS normal con el MS a media concentración, ya que la adición del inhibidor de crecimiento (manitol) influyó en este indicador. Resultados que son semejantes con Villanueva et al., (2013), en donde estudiaron orquídeas de las especies *Cattleya simbodium*, *C. rexy*, *C. máxima* del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú, en donde las especies fueron aclimatadas en vivero y sus semillas micro propagadas en Medio Basal M & S (macro y micronutrientes) más vitaminas, teniendo como resultado que las especies *Cattleya máxima* y *C. rex* fueron las que se adaptaron a las condiciones climáticas costeras, mostrando viabilidad en la micropropagación y conservación a nivel de laboratorio.

Por su parte, Borges-García, et al., (2011), estudiaron la propagación de *Dioscorea alata* L., seleccionando medios de cultivo para la micropropagación, teniendo como resultados que, Concentración al 75 % de sales MS, carbón activado (0,5 g/L⁻¹) o cisteína (10 mg/L⁻¹) en combinación con regulador de crecimiento ANA, BAP (0,01/0,01 mg/L⁻¹) MS. En el medio de cultivo se mejoró el desarrollo de plantas in vitro como el número de nódulos (3,5), longitud de tallo (4,1 cm), número de hojas (3,8), número de raíces (5,7) y longitud de raíces (6 cm).

Las plantas de orquídeas son componentes fundamentales de los recursos filogenéticos, tienen requisitos complejos para la polinización y la germinación de semillas, sufren pérdida de hábitat y aceleran la degradación de las poblaciones silvestres, lo que demuestra que la importancia de la conservación in vitro (Hidalgo, 2014). La germinación in vitro de semillas de orquídeas facilita la conservación de los recursos de germoplasma de orquídeas y garantiza la producción a gran escala de material vegetal para su inclusión en programas de reintroducción en hábitats naturales, preservando la variabilidad genética (Real et al., 2007). Por tanto, un buen desarrollo vegetativo es fundamental para la conservación *in vitro*, especialmente si se trata de una especie endémica.

4.1.3. Longitud de hojas

La prueba de varianza (Tabla 7) para la longitud de hojas (cm) de *P. kovachii*, muestra diferencias altamente significativas para ambos componentes en estudio (Medio de cultivo y Concentración de Manitol), además de la interacción de los mismos y esto se corrobora con el coeficiente de correlación y variabilidad que estuvieron dentro del rango aceptable Calzada (1982).

Tabla 7. ANVA de la longitud de hojas de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	0,99	0,49	8,11	0,0005 AS
Con. De Manitol	3	0,92	0,31	5,04	0,0026 AS
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	2,09	0,35	5,72	<0,0001 AS
Error	108	6,58	0,06		
Total	119	10,57			
AS= Altamente significativo					
R ² = 88 %		C.V= 4,15 %		x̄ = 1cm	

La prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) (Figura 16) para la longitud de hojas de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que el tratamiento T₁, T₂, T₄ (MS-T + 0 g, 10 g, 30 g de manitol); T₅, T₇, T₈ (MS 1/2 + 0 g, 20 g, 30 g de manitol) y T₉ (GAMBORG B5 + 0 g de manitol), obtuvieron un retraso en la longitud de hojas con los promedios de 0,47; 0,39; 0,49; 0,39; 0,36; 0,28; 0,37 cm, respectivamente. Según estos resultados, el MS-T retardó la longitud de 10 plántulas en promedio; mientras que los demás tratamientos presentaron valores mayores en longitud de hojas, siendo de manera general los tratamientos con MS a media concentración los que tuvieron menor longitud de hojas (0,35 cm en promedio), todo esto a los 165 DDS, la aplicación de manitol no influyó significativamente en los tratamientos.

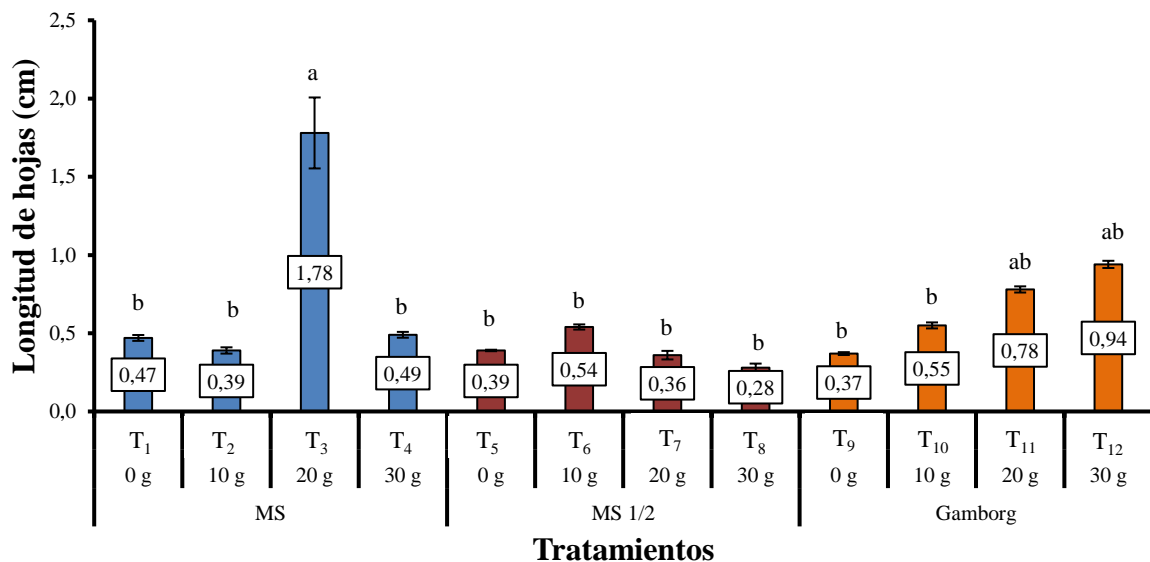


Figura 16. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la longitud de hojas (cm) de *P. kovachii*, evaluados a 165 días posteriormente de la siembra (DDS) en laboratorio.

Cerna et al., (2014), estudiaron la conservación de orquídeas, en el laboratorio de biotecnología vegetal donde determinaron que, refrigerando las semillas a 4 °C, más oscuridad es el método más eficaz de conservación de semillas; como lo indica la prueba de viabilidad de tetrazolio al 1 % contando las semillas teñidas bajo un microscopio. Se evaluaron cinco tratamientos durante la germinación simbiótica in vitro: M&S (T₁), M&S Vitamins (T₂), M&S Auxin (T₃), M&S Activated Carbon 1 % (T₄) y Knudson C (T₅), determinados como los mejores. La germinación in vitro para todas las especies en el estudio fue: (T₄) seguida de (T₁). Las orquídeas con mayor viabilidad independientemente del tratamiento fueron: *Sobralia rosea* (90 %), *Sievekingia marsupialis* (90 %), *Maxillaria rufescens* y *Epidendrum sp 1* (75 %).

Por su parte Guzmán (2016), se evaluó la germinación de *Phragmipedium kovachii* en tres medios con diferente composición mineral Murashige y Skoog (M y S), Robert y Ernst (R y E) y Thomale (G y D) hasta alcanzar el estado de protocormo de la especie. Las cápsulas recolectadas se esterilizan y se siembran 100- 300 unidades en el medio preparado en 30 tubos de ensayo; se evaluaron a 20 °C y 50 % de humedad relativa. Los resultados mostraron que el medio de Robert y Ernst (RE) logró un 52 % más de germinación que ambos medios, Thomale (GD) 25 % y Murashige y Skoog (MS) 23 %.

Sobre esto, Buenavista (2010), menciona que, Obtener plantas de orquídeas a partir de semillas requiere tres pasos significativos:

- Primera fase: establecimiento in vitro y germinación.
- Segunda fase: Desarrollo de protocormos a diferenciación de plántulas.
- Tercera fase: trasplante de plántulas en condiciones de invernadero para iniciar el metabolismo fotosintético adecuado.

Actualmente se utilizan diversas técnicas de cultivo in vitro de orquídeas - para micro propagación clonal de especies, eliminación de enfermedades mediante cultivo de meristemas, creación de bancos de semillas o germende plantas cultivadas en medio mínimo, producción de plantas poliploides, inducción clonal de células somáticas, inducción, mutación, genética, ingeniería, producción de metabolitos secundarios e investigación fundamental.

Diversos estudios han evaluado los efectos potenciadores de mezclas complejas (plátano, coco, tomate y piña), reguladores de desarrollo, carbón activado, concentraciones y adición de azúcares como fuentes de energía para optimizar la germinación y el crecimiento vegetal, tanto para material fitosanitario como comercial, producción (Salazar-Rojas & Mata-Rosas, 2003). Por otro lado, también es importante a considerar para asegurar una alta germinación es el manejo de las condiciones ambientales y fotoperiodos (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2016).

4.1.4. Número de tallos

El análisis de varianza (Tabla 8) para el número de tallos de *P. kovachii*, muestra que hubo diferencias altamente significativas para los dos factores en estudio (Medio de cultivo y Concentración de Manitol); sin embargo, en la interacción de ambos factores no hubo diferencias significativas, lo que implica que ambos factores en estudio no estuvieron relacionados entre sí, más bien, cada uno obtuvo resultados sin la necesidad de la intervención del otro factor y esto se corrobora con el coeficiente de correlación y variabilidad que estuvieron dentro del rango aceptable por Calzada (1982).

Tabla 8. ANVA del número de tallos de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	0,49	0,24	6,61	0,002 AS
Con. De Manitol	3	0,79	0,26	7,17	0,0002 AS
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	0,23	0,04	1,06	0,3938 N. S
Error	108	3,98	0,04		
Total	119	5,5			
AS = Altamente significativo			N. S= No significativo		
R ² = 65 %		C.V= 9,15 %		x̄ = 1 tallo	

La prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) (Figura 17) para el número de tallos de plantas de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que el tratamiento 8 (MS ½ con 30 g de manitol) obtuvo el menor número de tallos con promedio de 0,61 tallos. Los resultados, muestran que los medios de cultivo utilizados influyeron en la adición de azúcares (manitol) afectando el retardo del mayor número de tallos por plántula; sin embargo, los demás tratamientos en estudio estuvieron relativamente equidistantes, ya que la diferencia entre cada uno no fue estadísticamente diferente entre sí (1 tallo en promedio para los tratamientos con MS; 0,7 tallos en promedio para los tratamientos con MS a media concentración y 1 tallo en promedio para los tratamientos con Gamborg), todo esto a los 165 DDS; al mismo tiempo que la aplicación de manitol no influyó significativamente en los demás tratamientos.

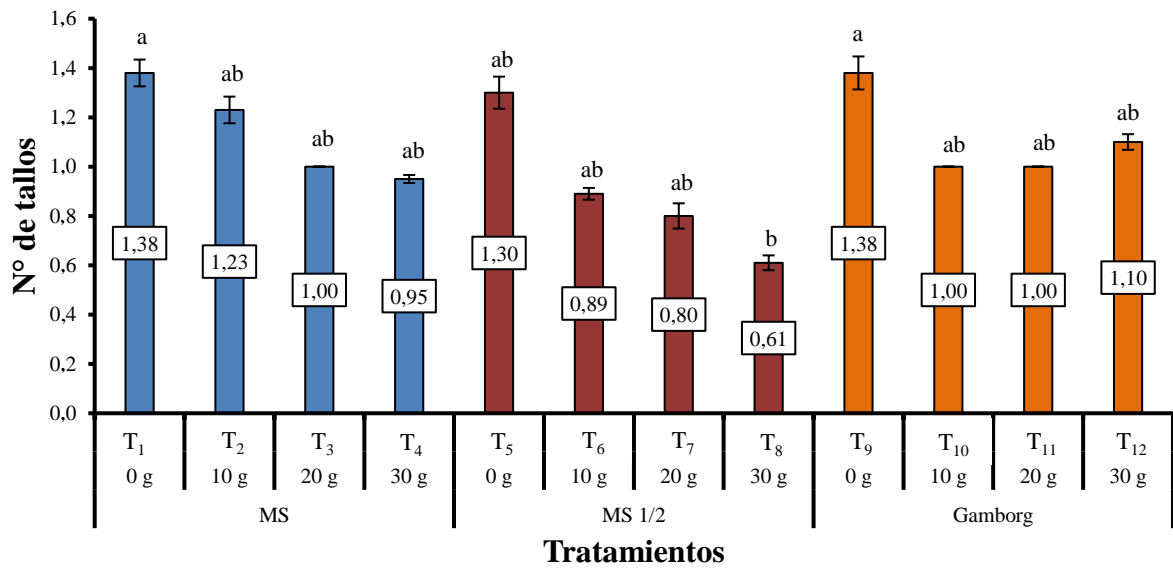


Figura 17. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de tallos de plantas de *P. kovachii*, evaluados a 165 días posterior de la siembra (DDS) en laboratorio.

Estos resultados son semejantes a los que reportó Flores (2019), en donde comparó M&S (1962) modificado enriquecido con agua de coco (MS AC) y M&S (1962) modificado enriquecido con banano verde (MS PL) y control (MS) Dos fórmulas dietéticas *Prostecchia crassilabia* Poepp & Endl, *Sobralia Micropropagación* de especies de orquídeas *setigera* Poepp & Endl y *Epidendrum macrocarpum*, condiciones de cultivo in vitro ricas en semillas. Entre las excrecencias de las tres especies estudiadas, la epidermis del fruto grande fue la especie con mayor rendimiento de datos morfológicos.

Aguilar-Morales & López-Escamilla (2013) compararon la germinación de semillas de *Laelia speciosa* (Kunth) a partir de vainas maduras e inmaduras; no lograron la germinación de semillas a partir de cápsulas maduras, proporcionando embriones encogidos. Se observó una respuesta similar para las especies de *Laelia abida*, donde se pensó que ciertos efectos ecofisiológicos y la variación genética eran los responsables; y *yo speciosa*, este fenómeno se puede atribuir a la necesidad de polinizadores externos y requisitos de apareamiento mixto para la reproducción sexual, así como una tendencia a la exogamia.

Rodríguez et al., (2007) recolectaron cápsulas verdes de 15 especies de orquídeas silvestres cubanas de 60 a 80 días después de la polinización para estudiar la germinación in vitro; Ávila y Salgado (2006) también utilizaron cápsulas que estaban fisiológicamente maduras antes de abrirse para cultivar varias especies mexicanas. Semillas de especies como: *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Epidendrum radicans* *Euchile*

citrina, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Oncidium cavendishianum* y *Onumci*.

Pedrosa (2009) recolectó cápsulas no agrietadas de *Epidendrum elongatum* de ocho meses de edad de fecundación natural en el Jardín Botánico de Bogotá. En todas estas investigaciones se determinaron que el cultivo *in vitro* fue importante para la preservación de especies de orquídeas.

4.1.5. Número de raíces

El Análisis de Varianza (Tabla 9) realizado para el número de raíces de *P.kovachii*, muestra que hubo diferencias altamente significativas para los dos factores en estudio (Medio de cultivo y Concentración de Manitol), así mismo, se demostró diferencias estadísticas altamente significativas en la interacción de ambos factores y esto se corrobora con el coeficiente de correlación y variabilidad que estuvieron dentro del rango aceptable Calzada (1982).

Tabla 9. ANVA del número de raíces de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	12,23	6,12	28,84	<0,0001 AS
Con. De Manitol	3	2,76	0,92	4,33	0,0063 AS
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	14,15	2,36	11,12	<0,0001 AS
Error	108	22,9	0,21		
Total	119	52,03			
AS= Altamente significativo					
$R^2 = 89 \%$		C.V= 9.14 %		$\bar{x} = 1$ raíz	

La prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) (Figura 18) para el número de raíces en plántulas de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que el tratamiento 7 (MS $\frac{1}{2}$ + 20 g de manitol) obtuvo el menor número de raíces con un promedio de 0,67. Contrariamente con los demás tratamientos estudiados quienes no mostraron diferencias significativas entre sí (1 raíz en los tratamientos con MS, 1 raíz en los tratamientos con MS a media concentración), determinando que el medio Gamborg ejerce cierta influencia sobre las plántulas de *P. kovachii*, siempre y cuando estén con concentración de azúcares (manitol), ya que, en estos tratamientos (Gamborg) se está demostrando que a mayor concentración de manitol existe mayor número de raíces,

todo esto a los 165 DDS, la aplicación de manitol no influyó significativamente en los tratamientos.

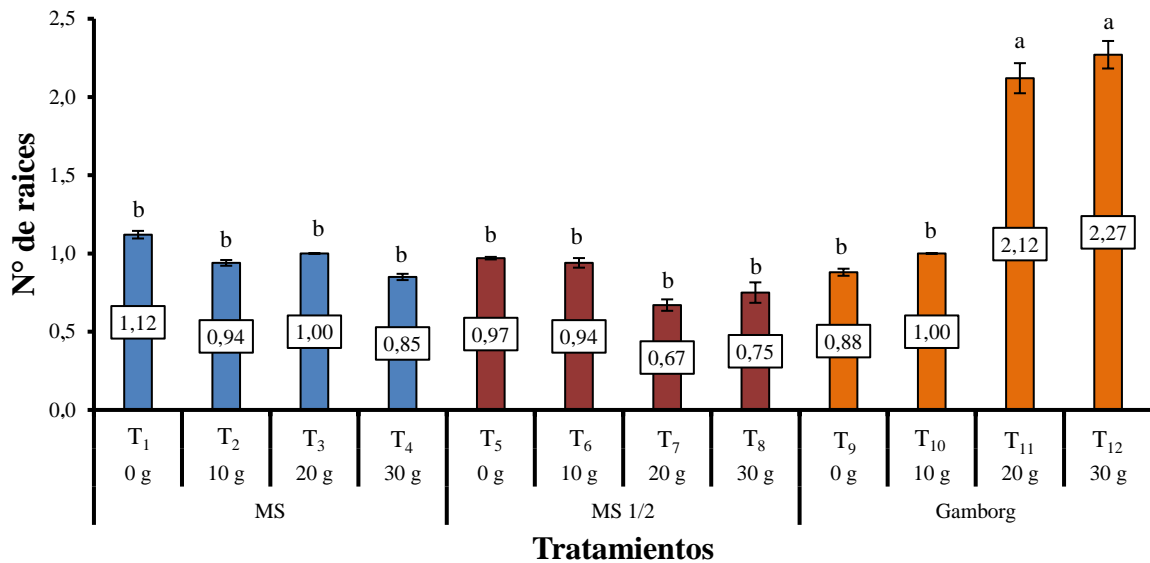


Figura 18. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de raíces en plántulas de *P.kovachii*, evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) en laboratorio.

Según lo descrito por Ortega-Larrocea et al. (2007) la supervivencia de las semillas entre la especie es diferente y se puede perder durante el almacenamiento. Se considera que las condiciones de temperatura especiales son de 5 °C a temperaturas extremadamente bajas y la humedad relativa como una opción ideal para expandir el servicio del embrión.

En el país de Bolivia; Morales, Penacho y Quispe (2004) distribuyeron especies amenazadas del país: *Cattleya nobile*, *Oncidium Stacyi*, *Mormodes morenoi*, *Cyrtopodium* y *Schomburgkia*; Se utilizaron semillas y brotes como explantes. A través de este trabajo se logró crear un banco de semillas y un banco de semillas que contiene 2500 ejemplares, 200 especies de orquídeas y 250 germoplasmas.

Flores-Escobar et al. (2008) estudiaron la propagación in vitro de *Oncidium* a partir de semillas sembradas en medio MS. Los trasplantes realizados se realizaron en el mismo medio, pero suplementado con extractos orgánicos: agua decoco, clara de huevo, carbón activado y polivinilpirrolidona. Al final del estudio, se demostró la efectividad del medio sobre la fuerza y altura de las plántulas.

Díaz et al. (2007) evaluaron los efectos de los cambios en las concentraciones de sales y vitaminas en la germinación de semillas de *Cyrtopodium punctatum*. Kalimuthu et al., (2007) obtuvo un protocolo de propagación para *Oncidium sp*; y detalló la

importancia de utilizar reguladores de crecimiento en las etapas de germinación, producción de protocormos, propagación de brotes y etapas de raíz de alto índice de aptitud. Todos estos estudios demostraron que el uso de medios es muy importante para el desarrollo vegetativo de los trasplantes de plantas de orquídeas, especialmente por la composición de sus raíces.

4.1.6. Longitud de raíces

La prueba de Varianza (Tabla 10) realizado en la longitud de raíz en plántulas de *P. kovachii*, indica que hubo diferencias altamente significativas para los dos factores en estudio (Medio de cultivo y Concentración de Manitol), así como también, se mostraron diferencias altamente significativas en la interacción de ambos factores, corroborándose con el coeficiente de correlación y variabilidad que estuvieron dentro del rango aceptable Calzada (1982).

Tabla 10. ANVA de la longitud de raíces de *P. kovachii*, durante el desarrollo vegetativo.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	0,72	0,36	20,56	<0,0001 AS
Con. De Manitol	3	0,02	0,01	4,47	0,005 AS
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	0,53	0,09	5,02	<0,0001 AS
Error	108	1,9	0,02		
Total	119	3.18			
AS = Altamente significativo					
$R^2 = 84 \%$	C.V= 8.03 %	$\bar{x} = 1 \text{ cm}$			

La prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) (Figura 19) para la longitud de raíces en plántulas de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que los tratamientos T₅ y T₇ (MS ½ + 0 g y 0,20 g con adición de manitol) y T₉ y T₁₀ (Gamborg + 0 g, 10 g de manitol) obtuvieron la menor longitud de raíces respectivamente, en comparación de los demás tratamientos del mismo medio de cultivo, los cuales estuvieron en promedio a 0,6 cm (sin diferencias significativas entre sí). A su vez, se muestra que los niveles más altos de la longitud de raíces lo mostraron los tratamientos 1; 3 y 12, con 0,86 cm, 0,74 cm y 0,58 cm respectivamente. En estos tratamientos la adición de azúcares (manitol) no influyen los medios de cultivo para el desarrollo de plántulas de *P. kovachii* a los 165 DDS.

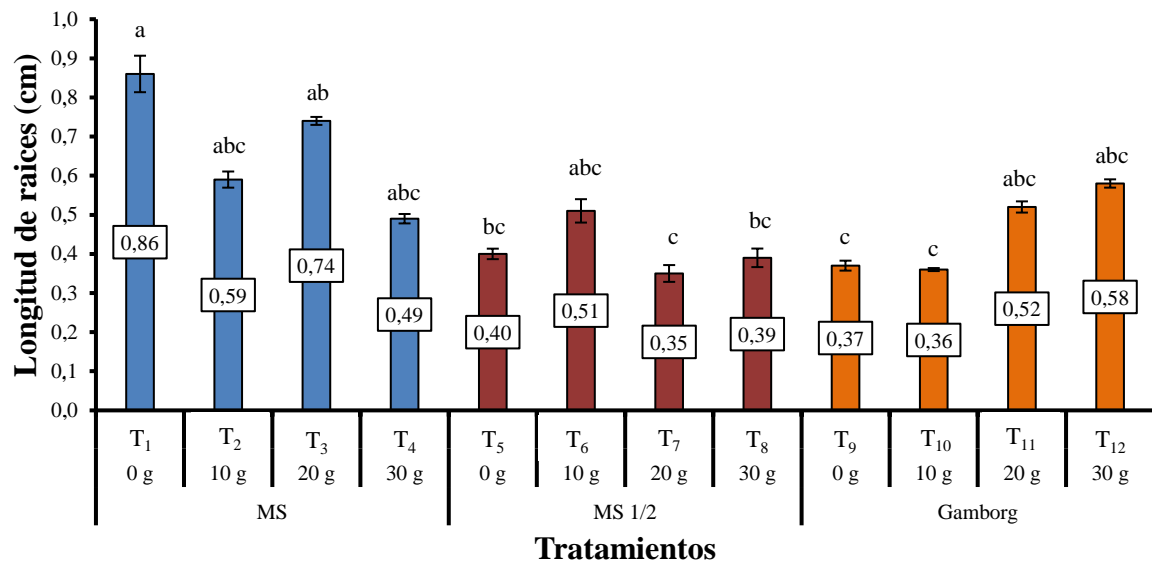


Figura 19. Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la longitud de raíz en plántulas de *P. kovachii*, evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) en laboratorio.

Las pruebas de comparación estadística fueron semejantes a Bello-Bello et al., (2015) quienes evaluaron el efecto de cuatro concentraciones de dos agentes osmóticos: manitol y polietilenglicol (PEG), y cuatro concentraciones de dos inhibidores del desarrollo vegetal: ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC), sobre la duración y desarrollo *in vitro* de plantas de *V. planifolia*. En donde cultivaron brotes en medio de cultivo MS. Teniendo como resultados evaluados a los 180 días, los valores de las variables de crecimiento evaluadas *in vitro* fueron menores cuando se incrementó la concentración de agentes osmóticos e inhibidores en el medio de cultivo. El tratamiento con PAC mantuvo el 100 % de duración de los brotes. Por lo tanto, el compuesto causó anomalías en la parte superior y las raíces de las plantas *in vitro*. Para ABA, los brotes presentaron cantidades más bajas en todas las variables evaluadas y una supervivencia del 90 % cuando se aplicó 3 mg L^{-1} . Estos resultados permiten desarrollar una técnica de protección *in vitro* a mediano plazo para *V. planifolia* que extiende el tiempo entre pases cada 180 días sin afectar la viabilidad y el fenotipo de la planta.

Murashige y Skoog (1962) cuando se utiliza medio sin reguladores de crecimiento y varias concentraciones de sal ha sido utilizado por varios investigadores para el cultivo de semillas de diversas especies de orquídeas, se ha encontrado que germinan más eficientemente debido a su alto contenido de sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácido, ácidos, nitrógeno y potasio necesarios para una nutrición adecuada Salazar-Mercado, (2012). Así, Aguilar-Morales (2013) encontró que cuando semillas de *Laelia spacirosa* se colocaron en cuatro medios de M&S y KnudsonC (KC) con 50 % y 100 % de

composición, diferentes respuestas a los estímulos de germinación fueron dependientes de la concentración de sal y sin suplementación. En medio 50 % MS, la germinación fue visible después de 10 días, mientras que en medio 100 % MS después de 16 días, en medio de Knudson, la germinación ocurrió después de 114 días y 178 días con 50 % y 100 % de sal.

Ha sido ampliamente demostrado que los requerimientos de minerales para la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas varían entre especies, algunas de las cuales crecen bien en medios simples, por ejemplo en un estudio de Knudson C. Rodriguez, (2005) quien evaluó 21 especies en medios M&S (50 % sal) Knudson C, Vancin-Went y Morel habían suplementado con agua de coco (10 %) y sacarosa (2 %), encontrando que todas las especies eran altamente específicas con y sin carbón activado con respecto al tipo de sal y comportamiento variable en presencia o ausencia de carbón activado. Al mismo tiempo, destacan que las tres especies germinan en el medio libremente de la presencia o ausencia de carbón activado; mientras que *Encyclia phoeniceae*, *Polystachya foliosa*, *Schomburgkia lyonsii* y *Phaius tankervilleae* son altamente específicas de sal para lograr la germinación en presencia de carbón activado.

V. CONCLUSIONES

1. Las plántulas de *Phragmipedium kovachii* mostraron diferencias significativas en el crecimiento morfológico al emplear tres tipos de medio de cultivo.
2. La aplicación de azúcares (manitol) en las cuatro concentraciones (0 g 10 g, 20 g y 30 g) inhibió en algunos tratamientos el desarrollo vegetativo de plántulas de *Phragmipedium. Kovachii*.
3. El desarrollo vegetativo de *Phragmipedium. kovachii* se diferenció durante los 165 Días Después de la Siembra (DDS), teniendo excelentes resultados para los parámetros de número de hojas, longitud de hojas y número de raíces, en la aplicación de inhibidor (manitol).

VI. PROPUESTAS A FUTURO

1. Replicar los ensayos de diferentes medios de cultivo hacia el desarrollo de plántulas de *Phragmipedium. kovachii* con la adición de inhibidores de crecimiento.
2. Probar nuevos medios de cultivo que estén determinados como coadyuvantes para retrasar plántulas de *Phragmipedium. kovachii*.
3. Determinar otro posible inhibidor de crecimiento hacia plántulas de *P. kovachii*, en condiciones *in vitro*.

VII. REFERENCIAS

- Bernard, N. (1904). *Recherches experimentales sur les Orchidées*. Revue Général de Botanique. 16: 458-476.
- El Comercio Perú, (2006). *GTZ: banco de germoplasma para las orquídeas peruanas*, Noviembre 15 -2006
- Engelmann, F. (2011). *Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity*. *In vitro Cell. Dev. Biol- Plant*. 47:5–16.
- Engelmann F, Takagi H, (2000). *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma.
- Espinosa, A, Hernández LS, Paneque OG, Pupo JJ, (2002). *Empleo del ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación in vitro de Ipomoea batatas*. *Biotecnología Vegetal* 2(1): 39-42.
- FAO/IPGRI. (1994). *Genebank Standards*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia.
- Frankel, O. H. Y M. E. Soulé. (1981). *Conservation and evolution*. Ambridge University Press, Londres.
- González López, C.I. Banco de Germoplasma y Germinación *in vitro* de Cactáceas Endémicas y en estado de Conservación. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. México. file:///C:/Users/ADVANCE/Desktop/cataceas%20gonzales.pdf
congresos.cio.mx/memorias_congreso_mujer/archivos/sesion2/S2-BCA23.pdf
- González, M. & Martín, C. (2011). *In vitro Preservation of Spanish Biodiversity*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 47: 46–54.
- Halbinger, L. Y M. A. Soto. (1997). *Arenas*. Laelias of México, Herbario AMO, Orquídea (Mex.) 15. Octubre. México DF 160.
- Hirai, D, Sakai A (2000). En: *Engelmann, F y Hiroko Takagi* (ed), pp. 205-211 JIRCAS/IPGRI, Rome <https://vimore.org/watch/7V9ofu280zM/phragmipedium-kovachii-produccion-en-laboratorio-in-vitro/>
- Iriondo, J. (2011). *Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas*. *Investigación Agraria- Producción y protección vegetal*. 16 (1): 5-24.
- Junta de Andalucía, (1994). *Banco de Germoplasma Vegetal Andaluz*. (BGVA) <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnnextoid=e21a3890d0c49110VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=778666edf6e77310VgnVCM2000000624e50aRCRD>

- J.M.M. Engels Y L. Visser, (2007). *Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma*. Manuales de Bioersity para Bancos de Germoplasma No. 6, 25 p
- Kavand, S., Kermani, M., Haghazari, A., Khosravi, P., & Reza, M. (2011). *Micropropagation and mediumterm conservation of Rosa Pulverulenta*. Maringá. 33 (2):297-301.
- Leyanis Garcia Aguila, Manuel De Feria, Karen Acosta, (2007). *Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: leyanis@ibp.co.cu Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario Vladimir I. Lenin. Las Tunas, Cuba. Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 2: 67 - 79, abril - junio, 2007.
- Lima, A., Sampaio, M., Matos, B., Resende, S., Cortizo, M. & Ferreira, J. (2011). *Agentes osmóticos e temperature na conservação in vitro de sempre-viva*. Ciencia Rural. 41 (8): 1354-1361.
- León Martínez, M. A. (1995). Conservación de especies peruanas de orquídeas utilizando técnicas de cultivo de tejidos in vitro. UNALM, Facultad de Ciencias. Tesis, Lima – Perú.
- Martín Martínez, I. Conservación de Recursos Fito genéticos. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF). <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.bancodegermoplasma.upm.es/historia.html>. 7.21, am. 16-10-2017.
- Menchaca García, R. A. et al. (2011). *Conservación de orquídeas, una tarea de todos*. Universidad Autónoma de Chapingo. Primera Edición, agosto 2011. Estado de México. P, 26,27,28,29,30,39,40.
- Ministerio De Agricultura, (2007). *Evaluación poblacional, distribución y estado de conservación de phragmipedium kovachii en el Perú*. Instituto Nacional de Recursos Naturales, Intendencia Forestal y de Fauna Silvestre. Dirección de Conservación de la Biodiversidad. Lima – Perú. <http://www.inrena.gob.pe/iffs/iffs_biodiv_estud_flora_fauna_silvestre.htm>. Acceso:
- Mohan, S. (2011). *Prospects of in vitro conservation of date palm genetic diversity for sustainable production*. Emir. J. Food Agric. 23 (2): 110-119
- Ortega, Larrocea, et al. (2009). *Conservación y Propagación de Orquídeas*. Departamento de Edafología, Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ortega-Larrocea, M. P. (2008). *Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de*

- restauración edafocológica*. Pp. 85-96, en: Alvarez-Sánchez, J. y A. Monroy-Ata (comps.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Parrot. (2002). Citado por: Silva, J; Montes, S; Acosta, L; Arias, E; García, A, *Embriogénesis somática: una alternativa para la propagación, mejoramiento y conservación de germoplasma en cacao*, centro de estudios de biotecnología vegetal, universidad de granma, cuba inca, cuba, estación de cuarentena de café y cacao, velasco, holguín, cuba, iiaa “j.dimitrov” cuba, disponible en la página https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1104/1/cuadbiod16_2.pdf
- Perú Ministerio Del Ambiente (minam). (2015). Guía De Identificación de Orquídeas con Mayor Demanda Comercial, 99 p.: ilus. color.; mapas.; 584.4, ISBN 978-612-4174-19-3.
- Ramsay, M. M. Y K. W. Dixon. (2003). *Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids*. Pp. 259-286, en: K. W. Dixon, S. P. Kell, R. I. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation. Natural History*
- Roca, Wm, Escobar R, Mafla G. (1994). *Conservación de germoplasma de yuca in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali.
- Sánchez, N. & Jiménez, V. (2010). *Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales*. *Agronomía Mesoamericana*. 21 (1): 193-205.
- Simpson, M. (2010). *Plant systematics*. Academic Press. Second Edition. 740pp.
- Shimura y Koda, (2004). *Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de Laelia eyermaniana Rchb. F, plants generated in vitro*. *Polibotanica* N° 32. Mexico. Ago.
- Toledo, J, Golmirzaie A. (1998). *Conservación in vitro de Solanum spp bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental*. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. Habana. Cuba.
- Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumara Y S. Higuchi. (1991). *Cryopreservation of apical meristems of white clover (Trifolium repens L.)*. *Plant Science*. 73:111-116.
- Zettler, L. W. Y T. M. Mcinnis (1993). *Symbiotic seed germination and development of Spiranthes cernua and Goodyera pubescens (Orchidaceae: Spiranthes Lindleyana)*. 8: 155-162.

ANEXO



Figura 20. Tubos de ensayos lavados listas para ser utilizadas



Figura 21. Preparación de medios de cultivo (MS-T, MS ½, Gamborg)



Figura 22. Pesado de insumos para la preparación de medios



Figura 23. Plántulas de *P. kovachii* para ser llevadas área incubación



Figura 24. Revisión del trabajo de investigación en el área de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la UNSM-T. de parte del presidente de Jurado de Tesis Ing. M. Sc. Fausto Silva Cárdenas.

Tabla 11. Tabla de excel de la primera evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta
T ₁ - M & S- TOT	27/06/2019						
Repetición							
1		2	1,7	1	1	0,5	0,8
2		7	0,91	2	1	0,5	1,5
3		5	0,8	1	1	0,6	0,5
4		1	0,5	1	1	0,8	0,6
5	0	5	0,42	2	1	1	0,8
6		3	0,6	1	1	1	0,7
7		4	0,55	1	1	1	0,8
8		3	0,7	1	1	1	0,6
9		6	1,11	2	1	1,5	1,2
10		4	0,45	2	1	0,8	0,5
T ₂							
Repetición							
1		8	0,93	1	1	1	0,5
2		5	0,58	1	1	1,2	0,7
3		5	0,26	1	1	0,6	0,6
4	10	4	0,22	1	1	0,5	0,5
5		3	0,53	1	1	0,5	0,5
6		5	0,2	1	0,8	0,7	0,8
7		7	0,4	2	1	0,4	0,7
8		6	0,75	2	1	1	1,3
9		3	0,43	1	1	0,4	0,7
10		3	0,76	1	1	0,8	0,7
T ₃							
Repetición							
1		5	0,5	1	1	0,8	0,7
2		4	1,4	1	1	0,9	0,6
3		3	1	1	1	0,7	0,6
4		5	0,76	1	1	1	1,5
5	20	5	0,42	1	1	0,9	0,3
6		2	0,7	1	1	1,3	0,4
7		3	9	1	1	0,9	0,6
8		6	0,71	1	1	1,4	1,4
9		3	0,9	1	1	1	0,4
10		5	0,74	1	1	1,2	1
T ₄							
Repetición							
1		2	0,6	1	1	0,5	0,5
2		4	0,65	1	1	0,5	0,6
3		4	0,72	1	1	0,6	0,7
4		4	0,8	1	1	0,9	1,5

5	30	6	0,45	2	1	0,4	0,4
6		8	0,33	2	1	0,6	0,7
7		4	1	1	1	0,5	0,9
8		4	1,12	1	1	1	0,4
9		1	1,4	1	1	0,8	0,9
10		7	0,32	1	1	0,8	0,4
<hr/>							
T ₅ - M & S- 1/2							
Repetición							
1		3	1	2	1	0,6	0,6
2		8	0,27	2	1	0,4	0,6
3		10	0,36	3	1	0,4	0,5
4		2	0,45	1	1	0,3	0,3
5	0	5	0,48	1	1	0,6	0,3
6		9	0,54	1	1	0,3	0,5
7		4	0,47	1	1	0,3	0,6
8		9	0,56	1	1	0,4	0,6
9		8	0,62	1	1	0,5	0,5
10		8	0,57	1	1	0,4	0,7
T ₆							
Repetición							
1		9	0,58	1	1	0,5	0,5
2		8	0,58	1	1	1,5	0,7
3		9	0,52	1	1	0,5	0,7
4		5	0,82	1	1	0,4	0,5
5	10	3	0,86	1	1	0,4	0,5
6		3	1,3	1	1	0,6	0,9
7		8	0,48	1	1	0,4	0,5
8		2	1,25	1	1	0,5	0,4
9		3	0,9	1	1	0,7	0,5
10		7	0,67	1	1	0,4	0,2
T ₇							
Repetición							
1		5	0,98	1	1	1	0,8
2		5	0,46	1	1	0,5	0,5
3		3	0,86	1	1	1	0,9
4		1	1,5	1	1	0,2	0,6
5	20	1	1,4	1	1	0,3	0,3
6		2	1,05	1	1	1,3	1
7		5	1,12	2	1	0,4	0,5
8		2	0,35	1	1	0,4	0,5
9		2	0,85	1	1	0,7	1,2
10		2	0,85	1	1	0,5	2,1
T ₈							
Repetición							
1		2	1,5	1	1	0,6	0,3
2		3	1,53	1	1	0,5	0,5

3		2	1,15	1	1	0,8	0,4
4		1	0,2	1	1	0,5	0,6
5	30	1	1	2	1	1	1
6		1	0,6	1	1	0,5	1,3
7		3	1,23	1	1	0,4	0,5
8		1	0,2	2	1	0,8	0,7
9		2	0,55	1	1	0,8	1,5
10		1	0,2	1	1	1	1,4

T₉ - Gamborg

Repetición

1		4	0,35	2	1	0,7	0,6
2		3	0,5	1	1	0,5	0,9
3		1	0,6	1	1	0,3	1
4		9	0,36	1	1	0,3	0,6
5	0	5	0,38	1	1	0,6	0,7
6		3	0,43	1	1	0,3	0,8
7		6	0,31	1	1	0,7	1
8		7	0,38	2	1	0,6	0,5
9		4	0,65	2	1	0,6	0,6
10		7	0,37	2	1	0,3	0,5

T₁₀

Repetición

1		4	0,32	1	1	0,4	0,4
2		4	0,47	1	1	0,4	0,5
3		3	0,3	1	1	0,3	0,5
4		5	0,4	1	1	0,4	1
5	10	5	0,4	1	1	0,3	1
6		3	0,73	1	1	0,3	0,7
7		3	0,9	1	1	0,3	0,6
8		3	0,56	1	1	0,3	0,6
9		3	0,7	1	1	0,3	0,5
10		6	0,76	1	1	0,3	0,6

T₁₁

Repetición

1		6	1	1	2	0,55	1,5
2		3	0,93	1	1	0,8	0,4
3		4	0,95	1	3	0,66	1,1
4		4	0,67	1	3	0,53	1
5	20	2	1,55	1	1	0,6	0,5
6		6	0,43	1	1	0,5	1,5
7		3	1,6	1	3	0,45	1
8		4	0,87	1	1	0,5	1,5
9		3	1,16	1	1	0,4	1,2
10		3	1,1	1	1	0,6	0,6

T₁₂

Repetición

1		7	0,62	2	1	0,6	0,8
2		3	1,13	1	1	1	0,8
3		8	0,53	1	3	1	1,3
4		3	1,1	1	2	0,5	0,7
5	30	3	1,2	1	2	0,5	1
6		9	0,65	1	2	1	1,1
7		3	1,2	1	4	0,4	1
8		3	1,33	1	2	0,7	0,9
9		3	0,8	1	2	0,5	0,4
10		3	0,76	1	1	De P- 1	0,4

Tabla 12. Tabla de excel de la segunda evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	Nº Hojas	Long. hojas	Nº Tallos	Nº Raíces	Long. raíz	Altura planta
T ₁ - M & S- TOT		15/07/2019					
Repetición							
1		3	0,93	1	1	0,6	0,8
2		8	0,86	2	1	0,7	1,5
3		4	0,55	1	1	1	0,6
4		1	0,5	1	1	0,8	0,6
5	0	8	0,28	2	1	1	0,9
6		3	0,53	1	1	1	0,8
7		3	0,43	1	1	1	0,9
8		3	0,53	1	1	1	0,7
9		9	0,6	2	1	1,6	1
10		7	0,31	2	1	0,8	0,5
T ₂							
Repetición							
1		10	0,89	1	1	1,2	0,5
2		6	0,45	1	1	1,3	0,7
3		5	0,24	1	1	0,7	0,6
4	10	4	0,18	1	1	0,5	0,5
5		4	0,38	2	1	0,5	0,5
6		5	0,2	1	1	0,9	0,8
7		10	0,23	2	1	1	0,7
8		6	0,78	2	1	1	1,2
9		3	0,53	1	1	0,5	0,7
10		3	0,57	1	1	0,8	0,7
T ₃							
Repetición							
1		6	0,38	1	1	0,8	0,7
2		5	0,82	1	1	0,9	0,6
3		4	0,82	1	1	0,7	0,7
4		6	0,66	1	1	1,1	1,5
5	20	7	0,37	1	1	0,9	0,3

6		2	0,65	1	1	1	0,4
7		4	0,68	1	1	0,9	0,6
8		6	65	1	1	1,2	1,3
9		3	0,76	1	1	1	0,4
10		5	68	1	1	1,2	1
T ₄							
Repetición							
1		3	0,46	1	1	0,6	0,5
2		4	0,6	1	1	0,6	0,6
3		4	0,72	1	1	0,6	0,8
4		5	0,58	1	1	1	1,3
5	30	6	0,48	2	1	0,6	0,4
6		8	0,27	2	1	0,6	0,8
7		4	0,82	1	1	0,5	1
8		5	0,9	1	1	1	0,5
9		1	1,5	1	1	0,8	1
10		7	0,3	1	1	0,8	0,5
T ₅ - M & S- 1/2							
Repetición							
1		3	1	2	1	0,6	0,7
2		8	0,35	2	1	0,4	0,6
3		10	0,34	3	1	0,5	0,7
4		2	0,35	1	1	0,3	0,5
5	0	6	0,6	1	1	0,6	0,7
6		11	0,4	1	1	0,3	0,7
7		4	0,42	1	1	0,3	0,6
8		9	0,58	1	1	0,5	1
9		8	0,57	1	1	0,5	0,5
10		8	0,42	1	1	0,4	0,7
T ₆							
Repetición							
1		9	0,75	1	1	0,5	0,5
2		8	0,5	1	1	1,5	0,8
3		9	0,64	1	1	0,5	0,7
4		5	0,74	1	1	0,4	0,7
5	10	4	0,82	1	1	0,4	0,5
6		3	1,26	1	1	0,6	0,5
7		8	0,48	1	1	0,4	0,5
8		3	0,9	1	1	0,6	0,4
9		4	1,12	1	1	0,7	0,5
10		7	0,7	1	1	0,5	0,3
T ₇							
Repetición							
1		3	0,46	1	1	1	0,8
2		3	0,5	2	1	0,5	0,5
3		3	0,93	1	1	1	1

4		1	1,5	1	1	0,2	0,6
5	20	3	0,2	1	1	0,3	0,3
6		1	0,5	1	1	1,3	1,8
7		6	1,05	2	1	0,4	0,5
8		2	0,4	1	1	0,5	0,5
9		1	1	1	1	0,7	1,2
10		1	1	1	1	0,5	2
T ₈							
Repetición							
1		2	1,5	1	1	0,6	0,3
2		2	1,5	1	1	0,5	0,5
3		2	1,25	1	1	0,8	0,5
4		2	0,2	1	1	0,7	0,6
5	30	0	0	2	1	1	1
6		1	0,6	1	1	0,5	1,1
7		3	1,16	1	1	0,4	0,5
8		0	0	2	1	0,6	1
9		0	0	1	1	0,8	1,6
10		1	0	1	1	1	0
T ₉ - Gamborg							
Repetición							
1		4	0,4	2	1	0,7	0,5
2		3	0,43	1	1	0,5	1
3		1	0,6	1	1	0,3	0,9
4		9	0,36	1	1	0,3	0,7
5	0	6	0,35	2	1	0,7	0,6
6		4	0,37	1	1	0,3	0,9
7		4	0,45	1	1	0,7	0,9
8		8	0,4	2	1	0,5	0,5
9		6	0,46	2	1	0,7	0,5
10		7	0,34	2	1	0,3	0,6
T ₁₀							
Repetición							
1		4	0,35	1	1	0,4	0,4
2		5	0,48	1	1	0,5	0,5
3		3	0,3	1	1	0,3	0,5
4		5	0,36	1	1	0,4	1
5	10	5	0,42	1	1	0,5	1
6		4	0,5	1	1	0,3	0,9
7		4	0,7	1	1	0,3	0,7
8		3	0,46	1	1	0,3	0,6
9		4	0,57	1	1	0,4	0,6
10		5	0,8	1	1	0,3	0,6
T ₁₁							
Repetición							
1		6	0,65	1	2	0,85	1,4

2		3	0,6	1	1	0,9	0,3
3		4	1	1	3	0,6	0,8
4		5	0,64	1	3	0,56	0,9
5	20	4	0,87	1	1	0,7	0,4
6		8	0,48	1	1	0,5	1,6
7		5	0,96	1	3	0,75	0,8
8		5	0,82	1	1	0,5	1,1
9		3	1,16	1	1	0,4	1
10		3	1	1	1	0,6	0,6
T ₁₂							
Repetición							
1		7	0,81	2	1	0,6	0,8
2		3	1,16	1	1	1	0,8
3		8	0,52	1	3	1	1
4		3	1,16	1	2	0,6	0,6
5	30	3	1,2	1	2	0,5	1
6		10	0,68	1	4	0,75	1,2
7		3	1,1	1	2	0,4	1,1
8		3	1,33	1	2	0,7	1
9		4	0,9	1	1	0,5	0,5
10		3	0,96	1	1	1	0,5

Tabla 13. Tabla de excel de la tercera evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raiz	Altura planta
T ₁ - M & S- TOT		31/07/2019					
Repetición							
1		3	1,3	1	1	0,6	0,8
2		9	0,5	2	1	0,4	1,5
3		5	0,36	1	1	1	0,6
4		1	0,5	1	1	0,8	0,6
5	0	10	0,21	2	1	1	0,9
6		3	0,36	1	1	1	0,8
7		3	0,5	1	1	1	0,9
8		4	0,57	1	1	1	0,7
9		10	0,77	2	1	1,5	1,2
10		8	0,23	2	1	0,8	0,5
T ₂							
Repetición							
1		12	0,65	1	1	1,1	0,5
2		12	0,37	1	1	1,4	1
3		7	0,27	1	1	0,8	0,6
4	10	4	0,2	1	1	0,5	0,5
5		7	0,37	2	1	0,5	0,5

6		5	0,24	1	1	0,7	0,8
7		12	0,25	2	1	0,6	0,7
8		8	0,52	2	1	1	1,4
9		2	0,4	1	1	0,5	0,7
10		6	0,43	1	1	0,8	0,7
T ₃							
Repetición							
1		7	0,34	1	1	0,7	0,7
2		6	0,71	1	1	0,8	0,8
3		4	0,97	1	1	0,7	0,6
4		7	0,5	1	1	1,1	1,5
5	20	10	0,27	1	1	0,8	0,6
6		2	0,75	1	1	0,8	0,4
7		5	0,64	1	1	0,9	0,7
8		7	0,21	1	1	1,2	1,2
9		5	0,54	1	1	1	0,5
10		6	0,6	1	1	1,2	1
T ₄							
Repetición							
1		3	0,3	1	1	0,6	0,5
2		4	0,7	1	1	0,6	0,6
3		4	0,47	1	1	0,6	0,8
4		5	0,26	1	1	0,8	1,4
5	30	4	0,65	2	1	0,5	0,4
6		8	0,27	2	1	0,6	0,8
7		4	0,8	1	1	0,5	1
8		5	0,9	1	1	1	0,5
9		2	0,9	1	1	0,7	1
10		9	0,31	1	1	0,7	0,5
T ₅ - M & S- 1/2							
Repetición							
1		4	0,82	2	1	0,6	0,7
2		9	0,33	2	1	0,4	0,6
3		13	0,31	3	1	0,5	0,7
4		2	0,45	1	1	0,3	0,3
5	0	6	0,65	1	1	0,5	0,3
6		18	0,06	1	1	0,3	0,6
7		6	0,5	1	1	0,3	0,6
8		15	0,36	1	1	0,5	0,8
9		12	0,05	1	1	0,5	0,5
10		12	0,39	1	1	0,4	0,7
T ₆							
Repetición							
1		12	0,74	1	1	0,5	0,5
2		8	0,58	1	1	1,4	0,8
3		14	0,5	1	1	0,6	0,6

4		5	0,88	1	1	0,6	0,5
5	10	7	0,55	1	1	0,5	0,5
6		4	1,07	1	1	0,6	1
7		9	0,54	1	1	0,4	0,5
8		5	0,64	1	1	0,6	0,4
9		7	0,97	1	1	1	0,5
10		7	0,6	1	1	0,5	0,3
T ₇							
Repetición							
1		3	0,23	1	1	1	0,9
2		4	0,4	2	1	0,5	0,6
3		3	1,03	1	1	1	1
4		3	0,5	1	1	0,3	0,7
5	20	3	0,13	1	1	0,3	0,3
6		0	0	0	0	0	0
7		3	0,93	2	1	0,4	0,6
8		2	0,4	1	1	0,5	0,5
9		0	0	0	0	0	0
10		0	0	0	0	0	0
T ₈							
Repetición							
1		1	1,4	1	1	0,8	0,3
2		2	1	1	1	0,5	0,5
3		1	1,2	1	1	0,8	0,5
4		2	0,2	1	1	0,6	0,7
5	30	0	0	0	0	0	0
6		2	0,35	1	1	0,5	1,4
7		4	0,9	1	1	0,5	0,5
8		0	0	0	0	0	0
9		0	0	0	0	0	0
10		0	0	0	0	0	0
T ₉ - Gamborg							
Repetición							
1		5	0,38	2	1	0,6	0,7
2		3	0,4	1	1	0,4	1
3		1	0,5	1	1	0,3	1
4		11	0,31	1	1	0,3	0,7
5	0	8	0,37	2	1	0,7	0,7
6		6	0,35	1	1	0,3	1
7		3	0,6	1	1	0,7	1
8		8	0,38	2	1	0,5	0,5
9		6	0,48	2	1	0,6	0,6
10		7	0,3	2	1	0,3	0,6
T ₁₀							
Repetición							
1		3	0,4	1	1	0,4	0,4

2		5	0,4	1	1	0,5	0,5
3		3	0,26	1	1	0,3	0,6
4		6	0,3	1	1	0,4	1
5	10	7	0,41	1	1	0,5	1
6		4	0,4	1	1	0,4	0,7
7		4	0,75	1	1	0,3	0,7
8		3	0,63	1	1	0,4	0,6
9		5	0,66	1	1	0,4	0,6
10		5	0,74	1	1	0,3	0,7
T ₁₁							
Repetición							
1		9	0,46	1	2	0,8	1,4
2		3	0,86	1	1	0,8	0,4
3		4	0,92	1	3	0,46	1
4		5	0,7	1	3	0,4	1
5	20	4	0,82	1	1	0,6	0,5
6		7	0,48	1	1	0,4	1,7
7		8	0,71	1	3	0,5	1
8		6	0,75	1	1	0,5	1,4
9		4	0,87	1	1	0,4	1,3
10		3	0,96	1	1	0,5	0,7
T ₁₂							
Repetición							
1		7	1,04	2	1	0,6	0,8
2		3	1,06	1	1	0,8	1
3		8	0,45	1	3	0,73	1,4
4		3	0,93	1	2	0,55	0,7
5	30	3	1,36	1	2	0,55	1
6		10	0,61	1	4	0,7	1,5
7		3	1	1	2	0,5	1,2
8		3	1,2	1	2	0,9	1
9		4	0,95	1	1	0,5	0,5
10		3	0,7	1	1	0,8	0,5

Tabla 14. Tabla de excel de la cuarta evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta
T ₁ - M & S- TOT	14/08/2019						
Repetición							
1		4	0,72	1	1	0,9	0,8
2		12	0,45	2	1	0,7	1,4
3		5	0,5	1	1	1	0,6
4		1	0,5	1	1	0,8	0,4
5	0	15	0,25	2	1	1,2	0,9
6		3	0,5	1	1	1	0,8

7		4	0,47	1	1	1	1
8		4	0,57	1	1	1	0,7
9		11	0,86	2	1	1,5	1,4
10		10	0,19	2	1	0,8	0,5
T ₂							
Repetición							
1		12	0,74	1	1	1,1	0,5
2		12	0,4	1	1	1,4	1
3		7	0,22	1	1	0,8	0,6
4	10	6	0,21	1	1	0,5	0,5
5		8	0,31	2	1	0,5	0,5
6		6	0,21	1	1	0,8	0,8
7		12	0,3	2	1	0,6	0,6
8		8	0,68	2	1	1	1,4
9		2	0,55	1	1	0,5	0,7
10		7	0,35	1	1	0,8	0,7
T ₃							
Repetición							
1		7	0,32	1	1	0,8	0,7
2		6	0,98	1	1	0,8	0,8
3		5	1,06	1	1	0,7	1,7
4		7	0,6	1	1	1,1	1,5
5	20	10	0,32	1	1	0,8	0,6
6		2	0,75	1	1	0,8	0,4
7		5	0,56	1	1	0,8	0,7
8		7	0,8	1	1	1,2	1,5
9		5	0,64	1	1	1	0,6
10		4	0,25	1	1	1,2	1
T ₄							
Repetición							
1		4	0,2	1	1	0,5	0,5
2		4	0,65	1	1	0,5	0,7
3		5	0,44	1	1	0,6	0,8
4		6	0,25	1	1	0,7	1,4
5	30	3	0,7	2	1	0,5	0,4
6		8	0,36	2	1	0,6	0,8
7		4	0,62	1	1	0,5	1
8		6	0,76	1	1	1	0,5
9		2	0,2	1	1	0,7	1
10		9	0,27	1	1	0,7	0,5
T ₅ - M & S- 1/2							
Repetición							
1		4	0,82	2	1	0,5	0,7
2		10	0,28	2	1	0,4	0,6
3		13	0,28	3	1	0,5	0,7
4		2	0,35	1	1	0,3	0,3

5	0	8	0,52	1	1	0,5	0,3
6		18	0,26	1	1	0,3	0,6
7		8	0,38	1	1	0,3	0,8
8		20	0,42	1	1	0,5	0,5
9		12	0,34	1	1	5	0,5
10		12	0,31	1	1	0,4	0,7
T ₆							
Repetición							
1		12	0,45	1	1	0,5	0,5
2		8	0,45	1	1	1,3	0,8
3		14	0,48	1	1	0,6	0,7
4		8	0,72	1	1	0,5	0,5
5	10	7	0,52	1	1	0,5	0,5
6		5	0,96	1	1	0,5	1
7		9	0,51	1	1	0,4	0,5
8		8	0,35	1	1	0,6	0,4
9		9	0,88	1	1	1	0,5
10		7	0,58	1	1	0,5	0,3
T ₇							
Repetición							
1		3	0,26	1	1	1	0,9
2		4	0,5	1	1	0,5	0,6
3		3	1,13	1	1	1	1
4		4	0,45	1	1	0,3	0,7
5	20	4	0,27	1	1	0,3	0,3
6		0	0	0	0	0	0
7		2	0,4	2	1	0,4	0,6
8		2	0,35	1	1	0,5	0,5
9		0	0	0	0	0	0
10		0	0	0	0	0	0
T ₈							
Repetición							
1		4	0,17	1	1	0,8	0,3
2		4	0,6	1	1	0,6	0,5
3		1	1,2	1	1	0,8	0,5
4		2	0,2	1	1	0,6	0,7
5	30	0	0	0	0	0	0
6		3	0,1	1	1	0,5	1,4
7		6	0,66	1	1	0,6	0,5
8		0	0	0	0	0	0
9		0	0	0	0	0	0
10		0	0	0	0	0	0
T ₉ - Gamborg							
Repetición							
1		6	0,26	2	1	0,6	0,5
2		3	0,36	1	1	0,4	1

3		1	0,7	1	1	0,3	1
4		12	0,3	1	1	0,3	0,7
5	0	9	0,41	2	1	0,6	0,7
6		6	0,28	1	1	0,3	1
7		2	0,65	1	1	0,7	1
8		9	0,32	2	1	0,5	0,5
9		7	0,46	2	1	0,6	0,6
10		6	0,4	2	1	0,3	0,6
T ₁₀							
Repetición							
1		4	0,36	1	1	0,4	0,3
2		6	0,42	1	1	0,5	0,5
3		7	0,27	1	1	0,3	0,7
4		6	0,36	1	1	0,4	1
5	10	7	0,37	1	1	0,5	1
6		4	0,47	1	1	0,4	0,7
7		4	0,77	1	1	0,3	0,7
8		4	0,43	1	1	0,4	0,6
9		5	0,78	1	1	0,4	0,6
10		5	0,46	1	1	0,3	0,7
T ₁₁							
Repetición							
1		9	0,37	1	2	0,45	1,5
2		3	0,96	1	1	0,7	0,4
3		4	1,25	1	3	0,55	1
4		5	0,52	1	3	0,4	1
5	20	4	0,77	1	1	0,5	0,5
6		9	0,38	1	1	0,5	1,8
7		8	0,63	1	3	0,4	1
8		6	0,8	1	1	0,5	1,5
9		4	0,8	1	1	0,4	1,4
10		3	1	1	1	0,5	0,7
T ₁₂							
Repetición							
1		8	0,77	2	1	0,6	0,9
2		3	1,2	1	1	1	1
3		8	0,46	1	3	0,56	1,4
4		3	1,1	1	2	0,55	0,7
5	30	3	1,33	1	2	0,45	1
6		10	0,68	1	4	0,67	1,5
7		3	1,16	1	2	0,85	1,3
8		4	1,3	1	2	0,5	1,1
9		5	0,95	1	1	0,8	0,5
10		3	1,13	1	1		0,5

Tabla 15. Tabla de excel de la quinta evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	Nº Hojas	Long. hojas	Nº Tallos	Nº Raíces	Long. raíz	Altura planta	Nº Brotes
T ₁ - M & S-								
TOT		29/08/2019						
Repetición								
1		4	0,8	1	1	0,8	1	
2		14	0,44	2	1	0,7	1,6	
3		6	0,4	1	1	0,7	0,6	
4		1	0,5	1	1	0,8	0,6	
5	0	17	0,25	2	1	1	0,9	1
6		3	0,46	1	1	1	0,8	
7		4	0,4	1	1	1	1	
8		5	0,52	1	1	1	0,7	
9		11	0,6	2	1	1,5	1,4	
10		14	0,25	2	1	0,8	0,5	
T ₂								
Repetición								
1		15	0,54	1	1	1,1	0,5	1
2		13	0,34	1	1	1,3	1	1
3		10	0,25	1	1	0,6	0,6	
4	10	6	0,26	1	1	0,5	0,5	
5		12	0,26	2	1	0,5	0,5	2
6		9	0,18	1	1	0,7	0,8	
7		14	0,26	2	1	0,5	0,7	1
8		11	0,63	2	1	1	1,4	
9		2	0,4	1	1	0,5	0,7	
10		10	0,26	1	1	0,8	0,7	
T ₃								
Repetición								
1		9	0,35	1	1	0,7	0,7	
2		7	0,6	1	1	0,8	0,8	
3		5	0,98	1	1	0,7	0,7	
4		8	0,57	1	1	1	1,5	
5	20	14	0,4	1	1	0,8	0,6	3
6		2	0,75	1	1	0,8	0,4	
7		6	0,55	1	1	0,9	0,7	
8		7	0,75	1	1	1,4	1,5	1
9		6	0,5	1	1	1	0,5	
10		5	0,54	1	1	1,2	1	

T ₄								
Repetición								
1		4	0,22	1	1	0,5	0,5	
2		5	0,52	1	1	0,6	0,7	
3		5	0,52	1	1	0,6	0,8	
4		6	0,21	1	1	0,9	1,4	1
5	30	2	1,05	2	1	0,5	0,4	
6		8	0,31	2	1	0,6	0,8	
7		4	0,52	1	1	0,5	1	
8		7	0,7	1	1	1	0,5	
9		4	0,35	1	1	1	1	
10		12	0,25	1	1	0,7	0,5	2
T ₅ - M & S- 1/2								
Repetición								
1		3	0,5	2	1	0,6	0,7	
2		10	0,34	2	1	0,5	0,6	
3		13	0,28	3	1	0,5	0,7	
4		2	0,5	1	1	0,3	0,3	
5	0	11	0,28	1	1	0,5	0,3	3
6		20	0,28	1	1	0,3	0,7	4
7		11	0,3	1	1	0,3	0,6	2
8		18	0,28	1	1	0,5	0,8	6
9		14	0,3	1	1	0,6	0,5	5
10		16	0,28	1	1	0,4	0,7	3
T ₆								
Repetición								
1		12	0,42	1	1	0,5	0,5	
2		9	0,46	1	1	1,4	0,8	
3		15	0,6	1	1	0,6	0,7	4
4		12	0,58	1	1	0,5	0,5	2
5	10	7	0,5	1	1	0,5	0,5	1
6		7	0,81	1	1	0,6	1	1
7		12	0,35	1	1	0,4	0,5	
8		9	0,41	1	1	0,6	0,4	
9		10	0,83	1	1	1	0,5	2
10		7	0,55	1	1	0,5	0,3	
T ₇								
Repetición								
1		4	0,17	1	1	1,2	0,9	1
2		4	0,45	2	1	0,5	0,6	

3		3	1,13	1	1	0,7	1	1
4		4	0,42	1	1	0,3	0,7	1
5	20	0	0	1	1	0,3	0,3	1
6		0	0	0	0	0	0	
7		1	0,5	2	1	0,4	0,6	
8		1	0,4	1	1	0,5	0,5	
9		0	0	0	0	0	0	
10		0	0	0	0	0	0	
T ₈								
Repetición								
1		4	0,27	1	3	0,36	0,3	1
2		5	0,32	1	2	0,55	0,5	2
3		1	1	1	1	0,8	0,5	
4		2	0,3	1	1	0,6	0,7	1
5	30	0	0	0	0	0	0	
6		2	0,2	1	1	0,6	1,4	1
7		6	0,48	1	1	0,5	0,5	1
8		0	0	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		0	0	0	0	0	0	
T ₉ - Gamborg								
Repetición								
1		6	0,28	2	1	0,6	0,5	
2		3	0,36	1	1	0,4	1	
3		0	0	0	0	0	0	
4		15	0,33	1	1	0,3	0,7	
5	0	8	0,36	2	1	0,7	0,7	
6		5	0,3	1	1	0,3	1	
7		1	0,8	1	1	0,6	1	
8		8	0,33	2	1	0,5	0,5	
9		8	0,4	2	1	0,6	0,6	
10		7	0,41	2	1	0,3	0,6	
T ₁₀								
Repetición								
1		5	0,26	1	1	0,4	0,3	
2		5	0,4	1	1	0,5	0,5	
3		10	0,26	1	1	0,3	0,7	
4		6	0,36	1	1	0,4	1	
5	10	8	0,51	1	1	0,5	1	
6		5	0,58	1	1	0,4	0,7	

7		2	1,25	1	1	0,3	0,7
8		4	0,37	1	1	0,4	0,6
9		5	0,8	1	1	0,4	0,6
10		5	0,6	1	1	0,3	0,7
T ₁₁							
Repetición							
1		9	0,34	1	2	1,25	1,5
2		3	0,9	1	1	0,5	0,4
3		5	0,82	1	3	0,46	1
4		5	0,68	1	3	0,33	1
5	20	4	0,77	1	2	0,3	0,5
6		8	0,4	1	2	0,4	1,8
7		10	0,65	1	3	0,26	1
8		8	0,75	1	1	0,5	1,5
9		4	0,82	1	1	0,4	1,4
10		4	0,8	1	3	0,36	0,7
T ₁₂							
Repetición							
1		7	0,65	2	1	0,6	0,9
2		3	1,06	1	3	0,26	1
3		9	0,65	1	3	0,4	1,4
4		3	1,03	1	2	0,45	0,7
5	30	3	1,3	1	2	0,4	1
6		10	0,75	1	4	0,82	1,5
7		3	1,2	1	2	0,35	1,3
8		5	0,82	1	3	0,26	1,1
9		4	0,9	1	1	0,5	0,5
10		3	0,93	1	1	0,7	0,5

Tabla 16. Tabla de excel de la sexta evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raiz	Altura planta	N° Brotes
T ₁ - M & S- TOT	13/09/2019							
Repetición								
1		5	0,66	1	2	0,35	0,8	
2		16	0,35	2	1	0,6	1,5	1
3		6	0,38	1	1	0,8	0,5	
4		1	0,5	1	1	0,6	0,5	
5	0	17	0,24	2	1	0,8	0,8	1
6		3	0,4	1	2	0,35	0,5	
7		4	0,42	1	1	0,8	1	
8		5	0,42	1	2	0,4	0,5	
9		15	0,45	2	1	0,4	1,4	
10		13	0,23	2	1	0,3	0,5	
T ₂								
Repetición								
1		15	0,6	1	1	0,5	0,6	1
2		12	0,36	1	1	0,5	1,1	2
3		12	0,19	1	1	0,4	0,6	1
4	10	10	0,33	1	1	0,5	0,6	
5		12	0,31	2	1	0,5	0,6	2
6		13	0,16	1	1	0,5	0,6	
7		17	0,24	2	1	0,5	0,6	2
8		12	0,55	2	1	0,6	1,4	
9		0	0	0	0	0	0	
10		12	0,25	1	1	0,3	0,6	
T ₃								
Repetición								
1		12	0,36	1	1	0,7	0,6	
2		7	0,82	1	1	0,6	0,7	
3		5	0,9	1	1	0,5	1,6	
4		8	0,46	1	1	0,6	1,5	
5	20	14	0,52	1	1	0,6	0,6	2
6		2	0,75	1	1	0,4	0,5	
7		6	0,56	1	1	0,7	0,6	
8		7	0,68	1	1	0,8	1,5	
9		6	0,56	1	1	0,6	0,4	
10		5	0,3	1	1	0,6	1	
T ₄								
Repetición								
1		3	0,26	1	1	0,5	0,5	
2		5	0,58	1	1	0,5	0,7	
3		6	0,4	1	1	0,4	0,5	
4		7	0,2	1	1	0,6	1,1	1

5	30	2	0,75	1	1	0,4	0,4	
6		6	0,33	2	1	0,5	0,6	
7		3	0,26	1	1	0,4	0,7	
8		6	0,78	1	1	0,6	0,5	
9		4	0,47	1	1	0,6	1	
10		12	0,26	1	1	0,4	0,5	
<hr/>								
T ₅ - M & S- 1/2								
Repetición								
1		2	0,65	2	2	0,4	0,5	
2		11	0,24	2	1	0,4	0,6	1
3		14	0,26	3	1	0,4	0,5	1
4		2	0,5	1	1	0,3	0,3	
5	0	12	0,25	1	1	0,3	0,3	3
6		20	0,29	1	1	0,3	0,5	4
7		12	0,23	1	1	0,3	0,4	2
8		22	0,33	1	1	0,3	1	4
9		16	0,33	1	1	0,2	0,5	5
10		16	0,31	1	1	0,4	0,5	3
T ₆								
Repetición								
1		contaminado	0					
2		11	0,35	1	1	0,5	0,5	1
3		15	0,35	1	1	0,4	0,6	5
4		13	0,39	1	1	0,5	0,5	3
5	10	11	0,38	1	1	0,5	0,4	1
6		7	0,61	1	1	0,6	0,9	1
7		12	0,43	1	1	0,4	0,5	
8		10	0,14	1	1	0,5	0,5	
9		15	0,51	1	1	1	0,4	2
10		contaminado	0	0	0	0	0	
T ₇								
Repetición								
1		4	0,2	1	1	1	0,8	1
2		4	0,45	2	1	0,5	0,4	
3		3	1,1	1	1	0,5	1	
4		4	0,2	1	1	0,3	0,7	
5	20	5	0,24	1	1	0,5	0,3	
6		0	0	0	0	1	0	1
7		0	0	2	1	0,4	0	
8		0	0	1	1	0,4	0	
9		0	0	1	1	0,4	0	
10		0	0	1	1	0,5	0	
T ₈								
Repetición								
1		5	0,2	1	3	0,23	0,3	1
2		7	0,68	1	1	0,9	0,6	2

3		0	0	1	1	0,5	0	
4		3	0,23	1	1	0,5	0,5	
5	30	0	0	2	1	0,4	0	
6		4	0,1	1	1	0,4	1,3	1
7		6	0,43	1	1	0,4	0,3	
8		0	0	2	1	1	0	
9		0	0	1	2	0,5	0	
10		0	0	0	0	0	0	
<hr/>								
T ₉ - Gamborg								
Repetición								
1		6	0,36	2	1	0,3	0,5	
2		2	0,5	1	1	0,3	1	
3		1	0,8	1	1	0,2	0,7	
4		15	0,34	1	1	0,3	0,7	
5	0	7	0,42	2	1	0,5	0,4	
6		5	0,22	1	1	0,3	1	1
7		2	0,5	1	1	0,3	1	
8		9	0,35	2	1	0,5	0,6	
9		7	0,42	2	1	0,5	0,4	
10		7	0,44	2	1	0,3	0,5	
T ₁₀								
Repetición								
1		5	0,26	1	1	0,4	0,3	
2		5	0,44	1	1	0,4	0,4	
3		12	0,25	1	1	0,3	0,8	1
4		7	0,38	1	1	0,4	1	
5	10	7	0,41	1	1	0,3	1	
6		6	0,55	1	1	0,3	0,6	
7		2	1,55	1	1	0,3	0,8	
8		9	0,37	1	1	0,3	0,5	1
9		9	0,74	1	1	0,3	1	1
10		5	0,66	1	1	0,3	0,6	
T ₁₁								
Repetición								
1		9	0,45	1	2	0,75	0,6	2
2		3	0,86	1	1	0,6	0,4	
3		5	0,8	1	3	0,56	0,7	1
4		5	0,88	1	5	0,52	0,8	
5	20	3	1,1	1	3	0,36	0,4	
6		9	0,41	1	2	0,3	1,7	1
7		10	0,69	1	3	0,6	1	2
8		8	0,63	1	2	0,4	1,2	1
9		4	0,85	1	1	0,4	1,4	
10		4	0,72	1	3	0,26	1	
T ₁₂								
Repetición								

1		9	0,7	2	2	0,35	0,8	
2		3	1,06	1	3	0,26	1	
3		10	0,52	1	3	0,43	1,5	2
4		3	1,06	1	3	0,56	0,6	
5	30	3	1,36	1	2	0,3	1,2	
6		10	0,82	1	4	1,05	1,6	2
7		3	1,2	1	2	0,65	1,4	
8		5	0,84	1	3	0,46	1,1	1
9		4	0,9	1	1	0,5	0,5	
10		3	0,7	1	1	0,5	0,5	

Tabla 17. Tabla de excel de la séptima evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta	N° Brotes
T ₁ - M & S- TOT	28/09/2019							
Repetición								
1		4	0,8	1	2	0,25	0,7	
2		16	0,38	2	1	0,6	1,5	1
3		6	0,45	1	1	0,8	0,5	
4		1	0,5	1	1	0,5	0,5	
5	0	20	0,27	2	1	0,8	0,8	1
6		3	0,4	1	2	0,35	0,5	
7		4	0,37	1	1	0,8	1	
8		4	0,47	1	3	0,4	0,5	
9		15	0,46	2	1	0,4	1,4	
10		14	0,24	2	1	0,3	0,5	
T ₂								
Repetición								
1		16	0,68	1	1	0,5	0,6	2
2		14	0,53	1	1	0,5	1,2	2
3		12	0,26	1	1	0,4	0,7	1
4	10	10	0,42	1	1	0,5	0,8	
5		14	0,24	2	1	0,5	0,7	2
6		17	0,21	1	1	0,5	0,6	
7		19	0,29	2	1	0,5	0,6	2
8		10	0,88	2	1	0,6	1,4	
9	contaminado	0	0	0	0	0	0	
10		13	0,22	1	1	0,6	0,6	1
T ₃								
Repetición								
1		12	0,35	1	1	0,6	0,6	
2		7	0,8	1	1	0,6	0,8	
3		5	0,9	1	1	0,5	1,6	
4		9	0,54	1	1	0,6	1,5	
5	20	15	0,5	1	1	0,6	0,6	2

	6		2	0,65	1	1	0,4	0,5	
	7		7	0,47	1	1	0,6	0,6	
	8		6	0,85	1	1	0,6	1,5	
	9		6	0,6	1	1	0,6	0,4	
	10		6	0,28	1	1	0,5	1	
T ₄									
	Repetición								
	1		3	0,33	1	1	0,5	0,5	
	2		6	0,5	1	1	0,5	0,6	
	3		6	0,45	1	1	0,4	0,9	
	4		8	0,2	1	1	0,6	1,1	1
	5	30	2	1,05	1	1	0,6	0,4	
	6		2	0,4	2	1	0,5	0,6	
	7		4	0,3	1	1	0,4	0,7	
	8		3	0,53	1	1	0,5	0,5	
	9		4	0,47	1	1	0,6	1,1	
	10		12	0,28	1	1	0,4	0,5	2
<hr/>									
T ₅ - M & S- 1/2									
	Repetición								
	1		2	0,7	2	2	0,4	0,5	
	2		15	0,28	2	1	0,4	0,5	
	3		20	0,4	2	1	0,4	0,6	2
	4		2	0,5	1	1	0,3	0,3	
	5	0	20	0,32	1	1	0,3	0,4	3
	6		20	0,44	1	1	0,3	0,7	4
	7		14	0,33	1	1	0,3	0,5	3
	8		22	0,38	1	1	0,3	1	6
	9		16	0,32	1	1	0,3	0,5	4
	10		18	0,32	1	1	0,4	0,6	3
T ₆									
	Repetición								
	1	contaminado	0	0,43	0	0	0	0	0
	2		11	0,41	1	1	0,5	0,5	1
	3		20	0,51	1	1	0,4	0,6	5
	4		14	0,42	1	1	0,5	0,5	3
	5	10	11	0,6	1	1	0,5	0,4	1
	6		8	0,63	1	1	0,6	0,8	1
	7		12	0,38	1	1	0,4	0,6	
	8		12	0,48	1	1	0,5	0,5	
	9		15	0,64	1	2	0,85	0,4	3
	10	contaminado	0	0	0	0	0	0	
T ₇									
	Repetición								
	1		5	0,26	1	1	0,8	0,8	1
	2		5	0,44	2	1	0,5	0,4	
	3		3	1,1	1	1	0,5	1	

	4		5	0,22	1	1	0,3	0,8	1
	5	20	6	0,28	1	1	0,5	0,3	1
	6		0	0	0	0	0	0	
	7		0	0	0	0	0	0	
	8		0	0	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		0	0	0	0	0	0	
T ₈									
	Repetición								
	1		6	0,25	1	3	0,43	0,3	1
	2		8	0,46	1	1	1,2	0,6	3
	3		0	0	0	0	0	0	
	4		2	0,3	1	1	0,5	0,5	1
	5	30	0	0	0	0	0	0	
	6		6	0,13	1	1	0,5	1,3	1
	7		5	0,42	1	1	0,6	0,3	1
	8		0	0	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		0	0	0	0	0	0	
<hr/>									
T ₉ - GAMBORG									
	Repetición								
	1		6	0,28	2	1	0,3	0,5	
	2		2	0,45	1	1	0,3	1	
	3		0	0	0	0	0	0	
	4		15	0,44	1	1	0,3	0,7	3
	5	0	7	0,42	2	1	0,5	0,5	
	6		5	0,3	1	1	0,3	0,8	1
	7		0	0	0	0	0	0	
	8		9	0,37	2	1	0,5	0,6	
	9		5	0,68	2	1	0,5	0,5	
	10		7	0,45	2	1	0,3	0,5	
T ₁₀									
	Repetición								
	1		5	0,36	1	1	0,4	0,3	
	2		5	0,5	1	1	0,4	0,4	
	3		13	0,53	1	1	0,3	0,9	1
	4		7	0,48	1	1	0,4	1	
	5	10	7	0,51	1	1	0,3	1,1	
	6		6	0,65	1	1	0,3	0,6	
	7		3	0,9	1	1	0,3	0,8	
	8		9	0,33	1	1	0,3	0,5	1
	9		9	0,79	1	1	0,3	1,1	1
	10		5	0,68	1	1	0,3	0,6	
T ₁₁									
	Repetición								
	1		11	0,36	1	2	0,85	0,7	2

	2		3	1	1	1	0,6	0,4	
	3		5	0,8	1	3	0,56	0,8	1
	4		5	0,62	1	5	0,58	0,8	
	5	20	3	1,06	1	3	0,36	0,5	
	6		7	0,5	1	2	0,3	1,6	1
	7		10	0,79	1	3	0,6	1	2
	8		8	0,77	1	2	0,35	1,2	1
	9		4	0,85	1	1	0,4	1,4	1
	10		4	0,9	1	3	0,53	1	
T ₁₂									
	Repetición								
	1		6	0,76	2	2	0,35	0,8	
	2		3	1,16	1	3	0,3	1	
	3		12	0,51	1	3	0,83	1,4	2
	4		4	0,7	1	3	0,6	1	
	5	30	3	1,23	1	2	0,25	1	
	6		10	0,86	1	4	1,05	1,5	2
	7		3	1,3	1	3	0,6	1,4	
	8		5	0,88	1	3	0,43	1	
	9		4	1,05	1	1	0,5	0,5	
	10		3	0,8	1	1	0,5	0,5	

Tabla 18. Tabla de excel de la octava evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta	N° Brotos	
T ₁ - M & S- TOT	14/10/2019								
	Repetición								
	1		4	0,82	1	2	4,3	0,8	
	2		22	0,3	2	1	0,5	1,4	4
	3		7	0,4	1	2	0,7	0,5	
	4		1	0,5	1	1	0,5	0,5	
	5	0	23	0,27	2	1	0,6	1	1
	6		3	0,43	1	1	0,5	0,7	
	7		3	0,2	1	1	0,4	1	
	8		4	0,5	1	1	0,6	0,6	
	9		15	0,45	2	1	0,7	1,6	
	10		20	0,25	2	1	0,6	0,7	
T ₂									
	Repetición								
	1		16	0,68	1	1	0,6	0,8	2
	2		16	0,53	1	1	0,7	1,4	2
	3		18	0,26	1	1	0,5	0,7	1
	4	10	10	0,42	1	1	0,4	0,8	
	5		18	0,24	2	1	0,4	1	3

	6		22	0,21	1	1	0,4	0,7	
	7		20	0,29	2	1	0,4	0,8	3
	8		10	0,88	2	1	0,6	1,2	
	9	contaminado	0	0	0	0	0	0	
	10		17	0,22	1	1	0,6	0,8	3
T ₃	Repetición								
	1		12	0,35	1	1	0,6	0,7	
	2		8	0,8	1	1	0,6	1	
	3		5	0,9	1	1	0,5	1,6	
	4		9	0,54	1	1	0,7	1,5	
	5	20	17	0,5	1	1	0,5	0,5	2
	6		2	0,65	1	1	0,6	0,4	
	7		5	0,47	1	1	0,6	0,7	
	8		5	0,85	1	1	0,6	1,3	
	9		7	0,6	1	1	0,5	0,7	
	10		7	0,28	1	1	0,7	1	
T ₄	Repetición								
	1		4	0,33	1	1	0,4	0,6	
	2		5	0,5	1	1	0,4	0,8	
	3		6	0,45	1	1	0,5	0,7	
	4		9	0,2	1	1	0,6	1,2	1
	5	30	0	1,05	0	0	0	0	
	6		0	0,4	0	0	0	0	
	7		3	0,3	1	1	0,4	0,7	
	8		0	0,53	0	0	0	0	
	9		3	0,47	1	1	1	1	
	10		12	0,28	1	1	0,4	0,4	
<hr/>									
T ₅ - M & S- 1/2									
	Repetición								
	1		0	0	0	0	0	0	
	2		15	0,28	2	1	0,4	0,6	
	3		21	0,4	3	1	0,3	0,8	2
	4		2	0,5	1	1	0,3	0,3	
	5	0	20	0,32	1	1	0,3	0,5	3
	6		20	0,44	1	1	0,4	1	4
	7		16	0,33	1	1	0,4	0,6	3
	8		24	0,38	1	1	0,3	0,6	6
	9		22	0,32	1	1	0,3	0,6	4
	10		22	0,32	1	1	0,3	0,7	3
T ₆	Repetición								
	1	contaminado	0		0	0	0	0	
	2		15	0,41	1	1	1,1	0,6	
	3		20	0,51	1	1	0,3	0,7	5

	4		16	0,42	1	1	0,3	0,5	3
	5	10	14	0,6	1	1	0,3	0,5	1
	6		9	0,63	1	1	0,4	0,8	1
	7		14	0,38	1	1	0,3	0,5	
	8		15	0,48	1	1	0,3	0,5	
	9		17	0,64	1	2	1	0,6	3
	10	contaminado	0	0	0	0	0	0	
T ₇	Repetición								
	1		6	0,28	1	1	0,5	1	1
	2		3	0,53	2	1	0,3	0,8	
	3		3	1,03	1	1	0,4	1	
	4		6	0,23	1	1	0,4	0,8	1
	5	20	6	0,3	1	1	0,3	0,3	1
	6		0	0	0	0	0	0	
	7		0	0	0	0	0	0	
	8		0	0	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		0	0	0	0	0	0	
T ₈	Repetición								
	1		10	0,24	1	3	0,43	0,5	1
	2		8	0,46	1	1	1,3	0,6	3
	3		0	0	0	0	0	0	
	4		0	0	0	0	0	0	
	5	30	0	0	0	0	0	0	
	6		6	0,2	0	1	0,5	1,3	1
	7		7	0,24	1	1	0,5	0,3	1
	8		0	0	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		0	0	0	0	0	0	
<hr/>									
T ₉ - Gamborg									
	Repetición								
	1		6	0,28	2	1	0,3	0,5	
	2		2	0,45	1	1	0,3	1	
	3		0	0	0	0	0	0	
	4		15	0,44	1	1	0,3	0,8	3
	5	0	7	0,42	2	1	0,5	0,5	
	6		6	0,3	1	1	0,3	0,8	1
	7		0	0	0	0	0	0	
	8		10	0,37	2	1	0,3	0,6	1
	9		6	0,68	2	1	0,4	0,5	
	10		6	0,45	2	1	0,4	0,4	
T ₁₀	Repetición								
	1		6	0,36	1	1	0,3	0,3	

	2		5	0,5	1	1	0,3	0,4	
	3		13	0,53	1	1	0,4	1	1
	4		7	0,48	1	1	0,5	1	
	5	10	7	0,51	1	1	0,3	1,1	
	6		6	0,65	1	1	0,4	0,6	
	7		4	0,9	1	1	0,4	1	
	8		8	0,33	1	1	0,3	0,4	1
	9		9	0,79	1	1	0,4	1	1
	10		5	0,68	1	1	0,3	0,6	
T ₁₁	Repetición								
	1		11	0,36	1	2	1	0,7	2
	2		3	1	1	1	0,4	0,3	
	3		5	0,8	1	2	0,56	0,6	1
	4		5	0,62	1	5	0,44	1	
	5	20	3	1,06	1	2	0,4	0,4	
	6		9	0,5	1	2	0,5	1,6	1
	7		9	0,79	1	3	0,7	0,8	2
	8		7	0,77	1	2	0,4	1,3	1
	9		5	0,85	1	1	0,3	1,3	1
	10		5	0,9	1	3	0,43	0,7	1
T ₁₂	Repetición								
	1		6	0,76	2	2	0,35	0,7	
	2		3	1,16	1	3	0,35	0,8	
	3		12	0,51	1	3	0,66	1,2	2
	4		4	0,7	1	3	0,6	1	1
	5	30	3	1,23	1	2	0,4	1	
	6		11	0,86	1	4	0,6	1,6	2
	7		3	1,3	1	3	0,83	1,3	
	8		5	0,88	1	3	0,66	1	1
	9		4	1,05	1	1	0,5	0,5	
	10		3	0,8	1	1	0,5	0,5	

Tabla 19. Tabla de excel de la novena evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta	N° Brotes
T ₁ - M & S- TOT	29/10/2019							
Repetición								
		4	0,82	1	2	4,3	0,8	
		25	0,32	2	1	0,5	1,4	4
		5	0,4	1	2	0,7	0,5	
		1	0,5	1	1	0,5	0,5	
	0	27	0,3	2	1	0,6	1	1

	6		3	0,43	1	1	0,5	0,7	
	7		3	0,2	1	1	0,4	1	
	8		3	0,5	1	1	0,6	0,6	
	9		17	0,46	2	1	0,7	1,6	
	10		20	0,28	2	1	0,6	0,7	
T ₂									
	Repetición								
	1		17	0,68	1	1	0,6	0,8	2
	2		20	0,54	1	1	0,7	1,4	2
	3		18	0,26	1	1	0,5	0,7	1
	4	10	14	0,42	1	1	0,4	0,8	
	5		22	0,25	2	1	0,4	1	3
	6		28	0,24	1	1	0,4	0,7	
	7		24	0,29	2	1	0,4	0,8	3
	8		10	0,88	2	1	0,6	1,2	
	9	contaminado	0	0	0	0	0	0	
	10		20	0,22	1	1	0,6	0,8	3
T ₃									
	Repetición								
	1		12	0,35	1	1	0,6	0,7	
	2		7	0,8	1	1	0,6	1	
	3		5	0,9	1	1	0,5	1,6	
	4		10	0,54	1	1	0,7	1,5	
	5	20	20	0,52	1	1	0,5	0,5	2
	6		1	0,65	1	1	0,6	0,4	
	7		5	0,47	1	1	0,6	0,7	
	8		3	0,85	1	1	0,6	1,3	
	9		12	0,6	1	1	0,5	0,7	
	10		10	0,28	1	1	0,7	1	
T ₄									
	Repetición								
	1		5	0,33	1	1	0,4	0,6	
	2		5	0,5	1	1	0,4	0,8	
	3		6	0,45	1	1	0,5	0,7	
	4		9	0,2	1	1	0,6	1,2	1
	5	30	0	1,05	0	0	0	0	
	6		0	0,4	0	0	0	0	
	7		3	0,3	1	1	0,4	0,7	
	8		0	0,53	0	0	0	0	
	9		1	0,47	1	1	1	1	

	10		14	0,28	1	1	0,4	0,4	
T ₅ - M & S- 1/2									
Repetición									
	1		0	0	0	0	0	0	
	2		17	0,28	2	1	0,4	0,6	
	3		24	0,42	3	1	0,3	0,8	2
	4		2	0,5	1	1	0,3	0,3	
	5	0	27	0,35	1	1	0,3	0,5	3
	6		20	0,44	1	1	0,4	1	4
	7		25	0,36	1	1	0,4	0,6	3
	8		30	0,42	1	1	0,3	0,6	6
	9		22	0,34	1	1	0,3	0,6	4
	10		26	0,35	1	1	0,3	0,7	3
T ₆									
Repetición									
	1	contaminado	0		0	0	0	0	
	2		20	0,41	1	1	1,1	0,6	
	3		28	0,54	1	1	0,3	0,7	5
	4		25	0,44	1	1	0,3	0,5	3
	5	10	15	0,6	1	1	0,3	0,5	1
	6		11	0,63	1	1	0,4	0,8	1
	7		14	0,38	1	1	0,3	0,5	
	8		17	0,49	1	1	0,3	0,5	
	9		17	0,64	1	2	1	0,6	3
	10	contaminado	0	0	0	0	0	0	
T ₇									
Repetición									
	1		6	0,28	1	1	0,5	1	1
	2		3	0,53	2	1	0,3	0,8	
	3		3	1,03	1	1	0,4	1	
	4		6	0,23	1	1	0,4	0,8	1
	5	20	8	0,3	1	1	0,3	0,3	1
	6		0	0	0	0	0	0	
	7		0	0	0	0	0	0	
	8		0	0	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		0	0	0	0	0	0	
T ₈									
Repetición									
	1		13	0,24	1	3	0,43	0,5	1

2		12	0,46	1	1	1,3	0,6	3
3		0	0	0	0	0	0	
4		0	0	0	0	0	0	
5	30	0	0	0	0	0	0	
6		8	0,2	0	1	0,5	1,3	1
7		8	0,24	1	1	0,5	0,3	1
8		0	0	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		0	0	0	0	0	0	
<hr/>								
T ₉ - Gamborg								
<hr/>								
Repetición								
1		6	0,28	2	1	0,3	0,5	
2		2	0,45	1	1	0,3	1	
3		0	0	0	0	0	0	
4		16	0,44	1	1	0,3	0,8	3
5	0	8	0,42	2	1	0,5	0,5	
6		6	0,3	1	1	0,3	0,8	1
7		0	0	0	0	0	0	
8		8	0,37	2	1	0,3	0,6	1
9		8	0,68	2	1	0,4	0,5	
10		6	0,45	2	1	0,4	0,4	
T ₁₀								
Repetición								
1		7	0,36	1	1	0,3	0,3	
2		5	0,5	1	1	0,3	0,4	
3		13	0,53	1	1	0,4	1	1
4		7	0,48	1	1	0,5	1	
5	10	10	0,51	1	1	0,3	1,1	
6		7	0,65	1	1	0,4	0,6	
7		3	0,9	1	1	0,4	1	
8		8	0,33	1	1	0,3	0,4	1
9		10	0,79	1	1	0,4	1	1
10		4	0,68	1	1	0,3	0,6	
T ₁₁								
Repetición								
1		13	0,36	1	2	1	0,7	2
2		3	1	1	1	0,4	0,3	
3		5	0,8	1	2	0,56	0,6	1
4		5	0,62	1	5	0,44	1	
5	20	3	1,06	1	2	0,4	0,4	

	6		9	0,5	1	2	0,5	1,6	1
	7		12	0,79	1	3	0,7	0,8	2
	8		9	0,77	1	2	0,4	1,3	1
	9		6	0,85	1	1	0,3	1,3	1
	10		5	0,9	1	3	0,43	0,7	1
T ₁₂									
	Repetición								
	1		6	0,76	2	2	0,35	0,7	
	2		3	1,16	1	3	0,35	0,8	
	3		12	0,51	1	3	0,66	1,2	2
	4		4	0,7	1	3	0,6	1	1
	5	30	3	1,23	1	2	0,4	1	
	6		11	0,86	1	4	0,6	1,6	2
	7		3	1,3	1	3	0,83	1,3	
	8		5	0,88	1	3	0,66	1	1
	9		4	1,05	1	1	0,5	0,5	
	10		3	0,8	1	1	0,5	0,5	

Tabla 20. Tabla de excel de la décima evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta	N° Brotes
T ₁ - M & S- TOT	13/11/2019							
	Repetición							
		3	0,82	1	2	4,3	0,8	
		25	0,32	2	1	0,5	1,4	4
		4	0,4	1	2	0,7	0,5	
		0	0	0	0	0	0	
	0	27	0,3	2	1	0,6	1	1
		4	0,43	1	1	0,5	0,7	
		3	0,2	1	1	0,4	1	
		3	0,5	1	1	0,6	0,6	
		19	0,46	2	1	0,7	1,6	
		22	0,29	2	1	0,6	0,7	
T ₂								
	Repetición							
		21	0,69	1	1	0,6	0,8	2
		20	0,54	1	1	0,7	1,4	2
		20	0,28	1	1	0,5	0,7	1
	10	14	0,42	1	1	0,4	0,8	
		23	0,25	2	1	0,4	1	3
		32	0,26	1	1	0,4	0,7	
		28	0,3	2	1	0,4	0,8	3

	8		12	0,88	2	1	0,6	1,2	
	9	contaminado	0	0	0	0	0	0	
	10		20	0,22	1	1	0,6	0,8	3
T ₃	Repetición								
	1		12	0,35	1	1	0,6	0,7	
	2		7	0,8	1	1	0,6	1	
	3		3	0,9	1	1	0,5	1,6	
	4		8	0,54	1	1	0,7	1,5	
	5	20	20	0,52	1	1	0,5	0,5	2
	6		1	0,65	1	1	0,6	0,4	
	7		6	0,47	1	1	0,6	0,7	
	8		3	0,85	1	1	0,6	1,3	
	9		13	0,6	1	1	0,5	0,7	
	10		10	0,28	1	1	0,7	1	
T ₄	Repetición								
	1		5	0,33	1	1	0,4	0,6	
	2		5	0,5	1	1	0,4	0,8	
	3		6	0,45	1	1	0,5	0,7	
	4		8	0,2	1	1	0,6	1,2	1
	5	30	0	1,05	0	0	0	0	
	6		0	0,4	0	0	0	0	
	7		3	0,3	1	1	0,4	0,7	
	8		0	0,53	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		14	0,28	1	1	0,4	0,4	
<hr/>									
T ₅ - M & S- 1/2									
	Repetición								
	1		0	0	0	0	0	0	
	2		16	0,28	2	1	0,4	0,6	
	3		27	0,43	3	1	0,3	0,8	2
	4		2	0,5	1	1	0,3	0,3	
	5	0	32	0,38	1	1	0,3	0,5	3
	6		34	0,49	1	1	0,4	1	4
	7		34	0,39	1	1	0,4	0,6	3
	8		38	0,46	1	1	0,3	0,6	6
	9		30	0,39	1	1	0,3	0,6	4
	10		32	0,37	1	1	0,3	0,7	3
T ₆	Repetición								
	1	contaminado	0		0	0	0	0	
	2		25	0,42	1	1	1,1	0,6	
	3		38	0,59	1	1	0,3	0,7	5
	4		28	0,44	1	1	0,3	0,5	3
	5	10	18	0,6	1	1	0,3	0,5	1

	6		10	0,63	1	1	0,4	0,8	1
	7		20	0,4	1	1	0,3	0,5	
	8		20	0,49	1	1	0,3	0,5	
	9		22	0,66	1	2	1	0,6	3
	10	contaminado	0	0	0	0	0	0	
T ₇	Repetición								
	1		6	0,28	1	1	0,5	1	1
	2		3	0,53	2	1	0,3	0,8	
	3		3	1,03	1	1	0,4	1	
	4		6	0,23	1	1	0,4	0,8	1
	5	20	8	0,3	1	1	0,3	0,3	1
	6		0	0	0	0	0	0	
	7		0	0	0	0	0	0	
	8		0	0	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		0	0	0	0	0	0	
T ₈	Repetición								
	1		12	0,24	1	3	0,43	0,5	1
	2		10	0,46	1	1	1,3	0,6	3
	3		0	0	0	0	0	0	
	4		0	0	0	0	0	0	
	5	30	0	0	0	0	0	0	
	6		8	0,2	0	1	0,5	1,3	1
	7		10	0,24	1	1	0,5	0,3	1
	8		0	0	0	0	0	0	
	9		0	0	0	0	0	0	
	10		0	0	0	0	0	0	
<hr/>									
T ₉ - Gamborg									
<hr/>									
	Repetición								
	1		5	0,28	2	1	0,3	0,5	
	2		2	0,45	1	1	0,3	1	
	3		0	0	0	0	0	0	
	4		16	0,44	1	1	0,3	0,8	3
	5	0	8	0,42	2	1	0,5	0,5	
	6		8	0,3	1	1	0,3	0,8	1
	7		0	0	0	0	0	0	
	8		8	0,37	2	1	0,3	0,6	1
	9		8	0,68	2	1	0,4	0,5	
	10		6	0,45	2	1	0,4	0,4	
T ₁₀	Repetición								
	1		8	0,36	1	1	0,3	0,3	
	2		5	0,5	1	1	0,3	0,4	
	3		15	0,53	1	1	0,4	1	1

	4		6	0,48	1	1	0,5	1	
	5	10	9	0,51	1	1	0,3	1,1	
	6		7	0,65	1	1	0,4	0,6	
	7		3	0,9	1	1	0,4	1	
	8		9	0,33	1	1	0,3	0,4	1
	9		9	0,79	1	1	0,4	1	1
	10		4	0,68	1	1	0,3	0,6	
T ₁₁	Repetición								
	1		11	0,36	1	2	1	0,7	2
	2		3	1	1	1	0,4	0,3	
	3		4	0,8	1	2	0,56	0,6	1
	4		5	0,62	1	5	0,44	1	
	5	20	3	1,06	1	2	0,4	0,4	
	6		10	0,5	1	2	0,5	1,6	1
	7		12	0,79	1	3	0,7	0,8	2
	8		10	0,77	1	2	0,4	1,3	1
	9		6	0,85	1	1	0,3	1,3	1
	10		5	0,9	1	3	0,43	0,7	1
T ₁₂	Repetición								
	1		4	0,76	2	2	0,35	0,7	
	2		3	1,16	1	3	0,35	0,8	
	3		10	0,51	1	3	0,66	1,2	2
	4		4	0,7	1	3	0,6	1	1
	5	30	3	1,23	1	2	0,4	1	
	6		11	0,86	1	4	0,6	1,6	2
	7		3	1,3	1	3	0,83	1,3	
	8		5	0,88	1	3	0,66	1	1
	9		4	1,05	1	1	0,5	0,5	
	10		3	0,8	1	1	0,5	0,5	

Tabla 21. Tabla de excel de la onceava evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta	N° Brotes
T ₁ - M & S- TOT	28/11/2019							
	Repetición							
		3	0,82	1	2	4,3	0,8	
		25	0,32	2	1	0,5	1,4	4
		4	0,4	1	2	0,7	0,5	
		0	0	0	0	0	0	
	0	27	0,3	2	1	0,6	1	1
		4	0,43	1	1	0,5	0,7	
		3	0,2	1	1	0,4	1	
		3	0,5	1	1	0,6	0,6	

9		19	0,46	2	1	0,7	1,6	
10		22	0,29	2	1	0,6	0,7	
T ₂								
Repetición								
1		21	0,69	1	1	0,6	0,8	2
2		20	0,54	1	1	0,7	1,4	2
3		20	0,28	1	1	0,5	0,7	1
4	10	14	0,42	1	1	0,4	0,8	
5		23	0,25	2	1	0,4	1	3
6		32	0,26	1	1	0,4	0,7	
7		28	0,3	2	1	0,4	0,8	3
8		12	0,88	2	1	0,6	1,2	
9	contaminado	0	0	0	0	0	0	
10		20	0,22	1	1	0,6	0,8	3
T ₃								
Repetición								
1		12	0,35	1	1	0,6	0,7	
2		7	0,8	1	1	0,6	1	
3		3	0,9	1	1	0,5	1,6	
4		8	0,54	1	1	0,7	1,5	
5	20	20	0,52	1	1	0,5	0,5	2
6		1	0,65	1	1	0,6	0,4	
7		6	0,47	1	1	0,6	0,7	
8		3	0,85	1	1	0,6	1,3	
9		13	0,6	1	1	0,5	0,7	
10		10	0,28	1	1	0,7	1	
T ₄								
Repetición								
1		5	0,33	1	1	0,4	0,6	
2		5	0,5	1	1	0,4	0,8	
3		6	0,45	1	1	0,5	0,7	
4		8	0,2	1	1	0,6	1,2	1
5	30	0	1,05	0	0	0	0	
6		0	0,4	0	0	0	0	
7		3	0,3	1	1	0,4	0,7	
8		0	0,53	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		14	0,28	1	1	0,4	0,4	
T ₅ - M & S- 1/2								
Repetición								
1		0	0	0	0	0	0	
2		16	0,28	2	1	0,4	0,6	
3		27	0,43	3	1	0,3	0,8	2
4		2	0,5	1	1	0,3	0,3	
5	0	32	0,38	1	1	0,3	0,5	3
6		34	0,49	1	1	0,4	1	4

7		34	0,39	1	1	0,4	0,6	3
8		38	0,46	1	1	0,3	0,6	6
9		30	0,39	1	1	0,3	0,6	4
10		32	0,37	1	1	0,3	0,7	3
T ₆								
Repetición								
1	contaminado	0		0	0	0	0	
2		25	0,42	1	1	1,1	0,6	
3		38	0,59	1	1	0,3	0,7	5
4		28	0,44	1	1	0,3	0,5	3
5	10	18	0,6	1	1	0,3	0,5	1
6		10	0,63	1	1	0,4	0,8	1
7		20	0,4	1	1	0,3	0,5	
8		20	0,49	1	1	0,3	0,5	
9		22	0,66	1	2	1	0,6	3
10	contaminado	0	0	0	0	0	0	
T ₇								
Repetición								
1		6	0,28	1	1	0,5	1	1
2		3	0,53	2	1	0,3	0,8	
3		3	1,03	1	1	0,4	1	
4		6	0,23	1	1	0,4	0,8	1
5	20	8	0,3	1	1	0,3	0,3	1
6		0	0	0	0	0	0	
7		0	0	0	0	0	0	
8		0	0	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		0	0	0	0	0	0	
T ₈								
Repetición								
1		12	0,24	1	3	0,43	0,5	1
2		10	0,46	1	1	1,3	0,6	3
3		0	0	0	0	0	0	
4		0	0	0	0	0	0	
5	30	0	0	0	0	0	0	
6		8	0,2	0	1	0,5	1,3	1
7		10	0,24	1	1	0,5	0,3	1
8		0	0	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		0	0	0	0	0	0	
T ₉ - Gamborg								
Repetición								
1		5	0,28	2	1	0,3	0,5	
2		2	0,45	1	1	0,3	1	
3		0	0	0	0	0	0	
4		16	0,44	1	1	0,3	0,8	3

5	0	8	0,42	2	1	0,5	0,5	
6		8	0,3	1	1	0,3	0,8	1
7		0	0	0	0	0	0	
8		8	0,37	2	1	0,3	0,6	1
9		8	0,68	2	1	0,4	0,5	
10		6	0,45	2	1	0,4	0,4	
T ₁₀								
Repetición								
1		8	0,36	1	1	0,3	0,3	
2		5	0,5	1	1	0,3	0,4	
3		15	0,53	1	1	0,4	1	1
4		6	0,48	1	1	0,5	1	
5	10	9	0,51	1	1	0,3	1,1	
6		7	0,65	1	1	0,4	0,6	
7		3	0,9	1	1	0,4	1	
8		9	0,33	1	1	0,3	0,4	1
9		9	0,79	1	1	0,4	1	1
10		4	0,68	1	1	0,3	0,6	
T ₁₁								
Repetición								
1		11	0,36	1	2	1	0,7	2
2		3	1	1	1	0,4	0,3	
3		4	0,8	1	2	0,56	0,6	1
4		5	0,62	1	5	0,44	1	
5	20	3	1,06	1	2	0,4	0,4	
6		10	0,5	1	2	0,5	1,6	1
7		12	0,79	1	3	0,7	0,8	2
8		10	0,77	1	2	0,4	1,3	1
9		6	0,85	1	1	0,3	1,3	1
10		5	0,9	1	3	0,43	0,7	1
T ₁₂								
Repetición								
1		4	0,76	2	2	0,35	0,7	
2		3	1,16	1	3	0,35	0,8	
3		10	0,51	1	3	0,66	1,2	2
4		4	0,7	1	3	0,6	1	1
5	30	3	1,23	1	2	0,4	1	
6		11	0,86	1	4	0,6	1,6	2
7		3	1,3	1	3	0,83	1,3	
8		5	0,88	1	3	0,66	1	1
9		4	1,05	1	1	0,5	0,5	
10		3	0,8	1	1	0,5	0,5	

Tabla 22. Tabla de excel de la doceava evaluación de todos los parámetros morfológicos de *P. kovachii*, de todas las repeticiones.

Tratamientos	Concentración	N° Hojas	Long. hojas	N° Tallos	N° Raíces	Long. raíz	Altura planta	N° Brotes
T ₁ - M & S- TOT		13/12/2019						
Repetición								
1		3	0,82	1	2	4,3	0,8	
2		25	0,32	2	1	0,5	1,4	4
3		4	0,4	1	2	0,7	0,5	
4		0	0	0	0	0	0	
5	0	27	0,3	2	1	0,6	1	1
6		4	0,43	1	1	0,5	0,7	
7		3	0,2	1	1	0,4	1	
8		3	0,5	1	1	0,6	0,6	
9		19	0,46	2	1	0,7	1,6	
10		22	0,29	2	1	0,6	0,7	
T ₂								
Repetición								
1		21	0,69	1	1	0,6	0,8	2
2		22	0,54	1	1	0,7	1,4	2
3		20	0,28	1	1	0,5	0,7	1
4	10	14	0,42	1	1	0,4	0,8	
5		28	0,25	2	1	0,4	1	3
6		32	0,26	1	1	0,4	0,7	
7		28	0,3	2	1	0,4	0,8	3
8		12	0,88	2	1	0,6	1,2	
9	contaminado	0	0	0	0	0	0	
10		20	0,22	1	1	0,6	0,8	3
T ₃								
Repetición								
1		12	0,35	1	1	0,6	0,7	
2		9	0,8	1	1	0,6	1	
3		1	0,9	1	1	0,5	1,6	
4		8	0,54	1	1	0,7	1,5	
5	20	20	0,52	1	1	0,5	0,5	2
6		1	0,65	1	1	0,6	0,4	
7		6	0,47	1	1	0,6	0,7	
8		2	0,85	1	1	0,6	1,3	
9		20	0,6	1	1	0,5	0,7	
10		10	0,28	1	1	0,7	1	
T ₄								
Repetición								
1		5	0,33	1	1	0,4	0,6	
2		7	0,5	1	1	0,4	0,8	
3		6	0,45	1	1	0,5	0,7	

4		8	0,2	1	1	0,6	1,2	1
5	30	0	1,05	0	0	0	0	
6		0	0,4	0	0	0	0	
7		3	0,3	1	1	0,4	0,7	
8		0	0,53	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		14	0,28	1	1	0,4	0,4	
<hr/>								
T ₅ - M & S- 1/2								
Repetición								
1		0	0	0	0	0	0	
2		16	0,28	2	1	0,4	0,6	
3		27	0,43	3	1	0,3	0,8	2
4		0	0	0	0	0	0	
5	0	32	0,38	1	1	0,3	0,5	3
6		34	0,49	1	1	0,4	1	4
7		34	0,39	1	1	0,4	0,6	3
8		38	0,46	1	1	0,3	0,6	6
9		30	0,39	1	1	0,3	0,6	4
10		32	0,37	1	1	0,3	0,7	3
T ₆								
Repetición								
1	contaminado	0	0	0	0	0	0	
2		25	0,42	1	1	1,1	0,6	
3		38	0,59	1	1	0,3	0,7	5
4		28	0,44	1	1	0,3	0,5	3
5	10	18	0,6	1	1	0,3	0,5	1
6		10	0,63	1	1	0,4	0,8	1
7		20	0,4	1	1	0,3	0,5	
8		20	0,49	1	1	0,3	0,5	
9		22	0,66	1	2	1	0,6	3
10	contaminado	0	0	0	0	0	0	
T ₇								
Repetición								
1		7	0,28	1	1	0,5	1	1
2		3	0,53	2	1	0,3	0,8	
3		2	1,03	1	1	0,4	1	
4		6	0,23	1	1	0,4	0,8	1
5	20	8	0,3	1	1	0,3	0,3	1
6		0	0	0	0	0	0	
7		0	0	0	0	0	0	
8		0	0	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		0	0	0	0	0	0	
T ₈								
Repetición								
1		12	0,24	1	3	0,43	0,5	1

2		10	0,46	1	1	1,3	0,6	3
3		0	0	0	0	0	0	
4		0	0	0	0	0	0	
5	30	0	0	0	0	0	0	
6		8	0,2	0	1	0,5	1,3	1
7		10	0,24	1	1	0,5	0,3	1
8		0	0	0	0	0	0	
9		0	0	0	0	0	0	
10		0	0	0	0	0	0	

T₉ - Gamborg

Repetición

1		5	0,28	2	1	0,3	0,5	
2		0	0	0	0	0	0	
3		0	0	0	0	0	0	
4		16	0,44	1	1	0,3	0,8	3
5	0	7	0,42	2	1	0,5	0,5	
6		8	0,3	1	1	0,3	0,8	1
7		0	0	0	0	0	0	
8		7	0,37	2	1	0,3	0,6	1
9		5	0,68	2	1	0,4	0,5	
10		4	0,45	2	1	0,4	0,4	

T₁₀

Repetición

1		8	0,36	1	1	0,3	0,3	
2		5	0,5	1	1	0,3	0,4	
3		15	0,53	1	1	0,4	1	1
4		6	0,48	1	1	0,5	1	
5	10	9	0,51	1	1	0,3	1,1	
6		6	0,65	1	1	0,4	0,6	
7		3	0,9	1	1	0,4	1	
8		12	0,33	1	1	0,3	0,4	1
9		9	0,79	1	1	0,4	1	1
10		4	0,68	1	1	0,3	0,6	

T₁₁

Repetición

1		10	0,36	1	2	1	0,7	2
2		3	1	1	1	0,4	0,3	
3		4	0,8	1	2	0,56	0,6	1
4		5	0,62	1	5	0,44	1	
5	20	3	1,06	1	2	0,4	0,4	
6		8	0,5	1	2	0,5	1,6	1
7		10	0,79	1	3	0,7	0,8	2
8		8	0,77	1	2	0,4	1,3	1
9		5	0,85	1	1	0,3	1,3	1
10		5	0,9	1	3	0,43	0,7	1

T₁₂

Repetición								
1		4	0,76	2	2	0,35	0,7	
2		3	1,16	1	3	0,35	0,8	
3		10	0,51	1	3	0,66	1,2	2
4		4	0,7	1	3	0,6	1	1
5	30	3	1,23	1	2	0,4	1	
6		11	0,86	1	4	0,6	1,6	2
7		3	1,3	1	3	0,83	1,3	
8		5	0,88	1	3	0,66	1	1
9		4	1,05	1	1	0,5	0,5	
10		3	0,8	1	1	0,5	0,5	
