



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución - 4.0 Internacional \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Vea una copia de esta licencia en <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>





FACULTAD DE ECOLOGÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Tesis

Uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación

Para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental

Autor:

Juan Luis Santa Cruz Padilla
<https://orcid.org/0000-0003-2201-5724>

Asesor:

Blga. Dra. Astriht Ruiz Ríos
<https://orcid.org/0000-0002-1142-5851>

Código: 6052620

Moyobamba, Perú

2024



FACULTAD DE ECOLOGÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Tesis

Uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación

Para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental

Autor:

Juan Luis Santa Cruz Padilla

Sustentado y aprobado el 15 de mayo del 2024, ante el honorable jurado:



Presidente de Jurado
Ing. M.Sc. Rubén Ruiz Valles



Secretario de Jurado
Ing. M.Sc. Percy Martínez Dávila



Vocal de Jurado
Econ. Wilhelm Cachay Ortiz



Asesor
Blga. Dra. Astrit Ruiz Ríos

Moyobamba, Perú

2024

Declaratoria de autenticidad

Juan Luis Santa Cruz Padilla, con DNI N° 73213359, egresado de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ecología de la Universidad Nacional de San Martín, autor de la tesis titulada: **Uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación.**

Declaramos bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencia de las fuentes bibliográficas consultadas, siguiendo las normas APA actuales
3. Toda información que contiene la tesis no ha sido plagiada;
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín.

Moyobamba, 15 de mayo de 2024



Juan Luis Santa Cruz Padilla
DNI N° 73213359

Ficha de identificación

<p>Título del proyecto Uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (<i>Cattleya rex</i>) con fines de conservación</p>	<p>Área de Investigación: Ciencia y Tecnología Ambiental Línea de investigación: Gestión de la Biodiversidad Sublínea de investigación: Diversidad, taxonomía y ecología de orquídeas Grupo de Investigación: Gestión de la biodiversidad, Resolución N °032-224-UNSM/CF/FE, Moyobamba 01 de febrero del 2024 Tipo de investigación: Básica <input type="checkbox"/>, Aplicada <input checked="" type="checkbox"/>, Desarrollo experimental <input type="checkbox"/></p>
<p>Autor: Juan Luis Santa Cruz Padilla</p>	<p>Facultad de Ecología Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental https://orcid.org/0000-0003-2201-5724</p>
<p>Asesor: Blga. Dra. Astriht Ruiz Ríos</p>	<p>Facultad de Ecología Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental Unidad o Laboratorio Ingeniería Ambiental https://orcid.org/0000-0002-1142-5851</p>

Dedicatoria

El presente trabajo va dedicado a mis padres, Letaniel Anibal Santa Cruz Flores, Margarita Padilla Tuesta, por haberme forjado como la persona que soy, con valores y principios, por la educación que me brindaron durante todos estos años, por el afecto y amor que recibí de ellos que desde pequeño me enseñaron a ser mejor persona, que me impulsaron y motivaron.

Para mi hermana (Alicia) y mis hermanos, (Marcos, Alexander, Ángel David), por ser parte de mi crecimiento como persona y enseñarme a ser agradecido y por afecto y amor que siempre me brindan.

A Karina Román Huamán, por su apoyo en el trayecto de ejecución de tesis y en mi formación como profesional.

Agradecimientos

Agradezco a Dios en primer lugar por darme la vida, y por haberme otorgado una familia maravillosa quienes han creído siempre en mí quienes me enseñaron la humildad y sacrificio para ver a tu familia superarse a sí mismos y ser una persona de bien en la sociedad.

A la Universidad Nacional de San Martín y a los docentes universitarios que estuvieron brindándome su apoyo y sus enseñanzas que son arte de nuestra formación como profesional, a mi asesora Dra. Blga. Astriht Ruíz Ríos por apoyarme siempre y motivarme.

Índice general

Ficha de identificación.....	6
Dedicatoria	7
Agradecimientos	8
Índice general.....	9
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	12
RESUMEN	13
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN A LA INVESTIGACIÓN	15
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	18
2.1. Antecedentes de la investigación.....	18
2.2. Fundamentos teóricos.....	20
2.3. Definición de términos básicos	29
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Ámbito y condiciones de la investigación	31
3.1.1 Contexto de la investigación.....	31
3.1.2 Periodo de ejecución	31
3.1.3 Control ambiental y protocolos de bioseguridad.....	31
3.1.4 Aplicación de principios éticos internacionales	32
3.2. Sistema de variables	32
3.2.1 Variables principales.....	32
3.3 Procedimientos de la investigación.....	33
3.3.1 Determinar un protocolo de desinfección de semillas <i>Cattleya rex</i> bajo condiciones in vitro.....	34
3.3.2 Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona en cultivo in vitro sobre protocormos de <i>Cattleya rex</i>	36
3.3.3 Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona a través del cultivo in vitro de <i>Cattleya rex</i>	38
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40

4.1	Protocolo de desinfección de semillas <i>Cattleya rex</i> bajo condiciones in vitro	40
4.2	Efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona en cultivo in vitro sobre protocormos de <i>Cattleya rex</i>	44
	CONCLUSIONES	54
	RECOMENDACIONES.....	55
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	ANEXOS.....	64

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las orquídeas	21
Tabla 2. Etapas de la micropropagación	27
Tabla 3. Descripción de variables por objetivo específico	32
Tabla 4. Tratamientos utilizados para la desinfección de semillas de <i>Cattleya rex</i>	35
Tabla 5. Medios de cultivo utilizados para el desarrollo de protocormos de semillas de <i>Cattleya rex</i>	36
Tabla 6. Análisis de varianza para el efecto de tratamientos de NaClO en la desinfección de semillas de <i>Cattleya rex</i>	42
Tabla 7. Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el día de inicio de formación de protocormos de <i>Cattleya rex</i>	44
Tabla 8. Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el porcentaje de formación de protocormos de <i>Cattleya rex</i> al día 30	45
Tabla 9. Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre la altura de plantas de <i>Cattleya rex</i>	50
Tabla 10. Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el número de hojas de plantas de <i>Cattleya rex</i>	50
Tabla 11. Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el número de raíces de plantas de <i>Cattleya rex</i>	51
Tabla 12. Datos de inicio de formación de protocormos de <i>Cattleya rex</i>	65
Tabla 13. Datos de formación de protocormos de <i>Cattleya rex</i> al día 30	65
Tabla 14. Datos de altura de plantas de <i>Cattleya rex</i> al día 120.....	66
Tabla 15. Datos de número de hojas de plantas de <i>Cattleya rex</i> al día 120.....	67
Tabla 16. Datos de número de raíces de plantas de <i>Cattleya rex</i> al día 120.....	68

Índice de figuras

Figura 1. Subfamilias de la familia Orchidaceae. (a) Epidendroideae, (b) Vanilloideae, (c) Cyripedioideae, (d) Orchidoideae.....	21
Figura 2. <i>Cattleya rex</i> . (a) Detalle en flor, (b) Planta cultivada en estado vegetativo, (c) Detalle de la flor.	25
Figura 3. Etapas de la micropropagación. (a) Etapa I, (b) Etapa II, (c) Etapa IV.	27
Figura 4. Desinfección de semillas <i>Cattleya rex</i> . (a) Preparación de tratamientos de NaClO, (b) Preparación de semillas para la desinfección, (c) Desinfección de semillas con tratamientos de NaClO.	41
Figura 5. Porcentaje de contaminación de frascos con semillas de <i>Cattleya rex</i> obtenidos del proceso de desinfección.....	42
Figura 6. Evaluación de Tukey ($p < 0,05$) para el efecto de NaClO para la desinfección de semillas de <i>Cattleya rex</i>	43
Figura 7. Evaluación de Tukey ($p < 0,05$) para el efecto de extractos de piña y cocona. (a) Día de comienzo de formación de protocormos; (b) Porcentaje de formación de protocormos al día 30.	45
Figura 8. Altura (mm) de explantes de <i>Cattleya rex</i> obtenidos con extractos de piña y cocona.	47
Figura 9. Número de hojas de explantes de <i>Cattleya rex</i> obtenidos con extractos de piña y cocona.	48
Figura 10. Número de raíz de explantes de <i>Cattleya rex</i> obtenidos con extractos de piña y cocona.	49
Figura 11. Evaluación de Tukey ($p < 0,05$) para el efecto de extractos de piña y cocona. (a) Altura; (b) Número de hojas; (c) Número de raíces.	51

RESUMEN

Uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación

Diferentes fuentes orgánicas como el agua de coco y extracto de frutas presentan concentraciones significativas de aminoácidos, vitaminas y compuestos orgánicos, capaces de actuar como reguladores de crecimiento y siendo excelentes aditivos para el cultivo in vitro de orquídeas, además, el desarrollo de las diferentes actividades humanas ponen en peligro de extinción la conservación de orquídeas como la *Cattleya rex*, para esto se debe buscar alternativas para la micropropagación de las especies con fines de conservación. El estudio buscó evaluar el uso de extractos orgánicos de piña y cocona en la micropropagación de la orquídea *C. rex* con fines de conservación. La población y muestra estuvo conformada por frascos con semillas y plantas de *C. rex* con contenido de medios de cultivo. La investigación fue experimental con un diseño de bloques completos al azar (DBCA), con cuatro tratamientos de hipoclorito de sodio (NaClO) para evaluar la desinfección de semillas: T0 (0 % de NaClO), T1 (0,1 % de NaClO), T2 (0,25 % de NaClO) y T3 (0,5 % de NaClO); y, cinco tratamientos para evaluar el desarrollo de protocormos, altura, número de hojas y raíces: T0 (sin extracto de piña y cocona), T1 (12,5 g de piña), T2 (25,0 g de piña), T3 (12,5 g de cocona) y T4 (25,0 g de cocona). Se desarrolló un protocolo y se determinó el tratamiento óptimo de NaClO para la desinfección de semillas; asimismo, se prepararon cinco medios de cultivo para evaluar el día de inicio y porcentaje de formación de protocormos al día 30; finalmente, los mismos medios de cultivo con extracto de piña y cocona se utilizaron para evaluar el desarrollo de la altura, número de hojas y número de raíces de plantas de *C. rex*: para procesar y analizar datos se desarrolló el estadístico descriptivo e inferencial con la prueba de análisis de varianza y prueba Tukey a un 95 % de confianza, el análisis estadístico se realizó en el programa InfoStat. Se determinó que 0,5 % de NaClO favoreció una mayor desinfección de semillas de *C. rex*; asimismo, se determinó diferencias significativas en los días de inicio y formación de protocormos al día 30, siendo el medio de cultivo con 12,5 g de piña el tratamiento óptimo que favoreció el inicio de formación de protocormos en el menor número de días (21,1 días) y el mayor porcentaje de protocormos al día 30 (100,0 %); finalmente, hubo diferencias significativas en el desarrollo de la altura y número de hojas de plantas de *C. rex* según tratamientos, cuyo medio de cultivo óptimo fue 12,5 g de piña que permitió determinar la mayor altura promedio (19,58 mm) y número de hojas promedio (14,88 hojas/planta), además, los tratamientos utilizados no influyeron en el número de raíces. Se concluye que el uso de extractos orgánicos de piña y cocona si favorece la micropropagación de la *Cattleya rex* con fines de conservación, promoviendo el desarrollo de la altura y número de hojas.

Palabras clave: extractos orgánicos, micropropagación, orquídea *Cattleya rex*, conservación de orquídeas.

ABSTRACT

Use of organic extracts in the micropropagation of the orchid (*Cattleya rex*) for conservation purposes

Different organic sources such as coconut water and fruit extracts present significant concentrations of amino acids, vitamins and organic compounds, capable of acting as growth regulators and being excellent additives for in vitro cultivation of orchids. At the same time, the development of different human activities puts the conservation of orchids such as *Cattleya rex* in danger of extinction, so alternatives must be sought for the micropropagation of the species for conservation purposes. The study aimed to evaluate the use of organic extracts of pineapple and cocona in the micropropagation of the orchid *C. rex* for conservation purposes. The population and sample consisted of flasks containing culture media with seeds and plants of *C. rex*. The research was experimental with a randomized complete block design (RCBD), with four treatments of sodium hypochlorite (NaClO) to evaluate seed disinfection: T0 (0 % NaClO), T1 (0.1 % NaClO), T2 (0.25 % NaClO) and T3 (0.5 % NaClO); and, five treatments to evaluate the development of protocorms, height, number of leaves and roots: T0 (no pineapple and cocona extract), T1 (12.5 g pineapple), T2 (25.0 g pineapple), T3 (12.5 g cocona) and T4 (25.0 g cocona). A protocol was developed and the optimal NaClO treatment for seed disinfection was determined. Five culture media were prepared to evaluate the day of initiation and percentage of protocorms formation at day 30; finally, the same culture media with pineapple and cocona extract were used to evaluate the development of height, number of leaves and number of roots of plants of *C. rex* plants. Descriptive and inferential statistics were developed for data processing and analysis using the analysis of variance test and Tukey test at 95 % confidence, the statistical analysis was performed in the InfoStat program. It was determined that 0.5 % NaClO favored a greater disinfection of *C. rex* seeds; likewise, significant differences were determined in the days of initiation and formation of protocorms at day 30, being the culture medium with 12.5 g of pineapple the optimal treatment that favored the initiation of protocorms formation in the least number of days (21.1 days) and the highest percentage of protocorms at day 30 (100.0 %). Finally, there were significant differences in the development of the height and number of leaves of *C. rex* plants according to treatments, whose optimal culture medium was 12.5 g of pineapple, which allowed determining the greatest average height (19.58 mm) and average number of leaves (14.88 leaves/plant); in addition, the treatments used did not influence the number of roots. It is concluded that the use of organic extracts of pineapple and cocona does favor the micropropagation of *Cattleya rex* for conservation purposes, promoting the development of height and number of leaves.

Keywords: *Cattleya rex* orchid, micropropagation, orchid conservation, organic extracts.



CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN A LA INVESTIGACIÓN

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae y son el grupo más valioso de plantas con flores que han avanzado en la variación floral con floraciones visualmente impresionantes entre las monocotiledóneas (Besi et al., 2023; Wong et al., 2017), además de su riqueza floral, la diversidad de orquídeas juega un papel importante tanto en el aspecto económico como medicinal (Chakraborty et al., 2022; Zhan et al., 2022). Las Orchidaceae son la segunda familia de angiospermas más grande, con más de 900 géneros y 27 000 especies en casi todo el mundo (Teo et al., 2019) y la familia se divide en seis subfamilias: Orchidoideae, Epidendroideae, Cypripediodeae, Vanilloideae y Apostasiodeae (Cetzal et al., 2014). Sudamérica representa más del 30 % de todas las especies de orquídeas conocidas, siendo Colombia, Ecuador, Brasil, Perú y Bolivia unos de los países más ricos del mundo en biodiversidad de orquídeas (Dolce et al., 2020).

Cattleya es uno de los géneros de orquídeas más populares, la exquisita belleza de sus flores explica su gran demanda en el comercio mundial de la floricultura (Pant et al., 2020), las flores son de gran tamaño y se le conoce como “La reina de las orquídeas” debido a la belleza en la variación de color en sus flores (Hariyadi et al., 2023). Los híbridos de *Cattleya* son muy apreciados en el mercado internacional de la floricultura, pero sus características hortícolas aún pueden beneficiarse de una mejora genética, en particular la producción de cultivares precoces y una floración independiente de la estación, mejora que le permitiría a la *Cattleya* competir con las orquídeas *Phalaenopsis* y *Dendrobium*, así como con otros grupos de flores de maceta y cortadas (Cardoso et al., 2016).

A nivel mundial, las especies de orquídeas se encuentran amenazadas principalmente debido a la acción humana (Mercado y Jaimes, 2022), su rareza inherente y sus necesidades específicas de conservación, además de impactos de carácter negativo como actividades recreativas, el turismo, la contaminación y el cambio climático (Wraith et al., 2020). Aunque parezcan sobre el papel entre los grupos de organismos con mayor protección legal, muchas especies de orquídeas se encuentran amenazadas por el comercio insostenible e ilegal con fines medicinales, alimentarios y hortícolas (Hinsley et al., 2018). Por ejemplo, en Colombia las orquídeas se encuentran dentro de las familias de plantas con mayor cantidad de especies amenazadas, cuya situación es idéntica en el resto de países sudamericanos y donde las dos principales amenazas son antropogénicas: la deforestación y la recolección en estado silvestre (Dolce et al., 2020).

Se estima que la cantidad de especies de orquídeas en el Perú sea entre 2 600 y 3 000 especies presentes en departamentos como Cusco, San Martín, Junín, Madre de Dios, Cajamarca, Huancavelica, Pasco, Amazonas, Loreto, Ucayali, Puno, La Libertad, Lima y Ayacucho (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI) y Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), 2020). Las orquídeas del género *Cattleya* se comercializan como planta vegetativa, flor y planta con flor, y en el comercio internacional se encuentra en la segunda posición en el país de la totalidad de orquídeas que se exportan (Briceño, 2004). Sin embargo, a pesar de caracterizarse como recursos valiosos, aunque limitados, se encuentran alterados por la extracción indiscriminada e ilegal y por la falta de estrategias que permitan salvaguardarla (Carhuamaca, 2019). De la totalidad de especies identificadas en el país, 301 se han categorizado en amenaza, de las cuales la mayor cantidad se encuentra en la categoría vulnerable (VU) (220), seguido de especies en peligro crítico (CR) (62) y en peligro (EN) (19) (MIDAGRI y SERFOR, 2020).

El desarrollo de técnicas para propagar y conservar in vitro, como también la aclimatación, son considerados importantes para aquellas especies en estado de extinción, ya que estos permiten promover la multiplicación y conservación de tales especies, evitando de tal forma que la variabilidad genética se pierda (Menezes-Sá et al., 2022). La reproducción in vitro se emplea exitosamente para que las especies sean conservadas ex situ, como también para reproducir y mejorar genéticamente los diferentes cultivos; no obstante, los medios de cultivo empleados difieren de acuerdo a la especie o variedad utilizada (Arenas, 2019).

El periodo de producción de las orquídeas es largo y requieren permanecer en condiciones adecuadas, por lo cual la propagación in vitro es un método eficiente en la reducción de los tiempos de producción (Saravia-Castillo et al., 2022). Por tal motivo, es pertinente buscar medios de cultivo in vitro económicos que permitan la rápida germinación, propagación y conservación de las especies de orquídeas, por ejemplo, el empleo de compuestos orgánicos que favorecen la germinación de semillas, estimula el desarrollo y crecimiento de *C. warscewiczii* y *C. gaskelliana*, con lo cual se contribuye a la disminución de costos producidos por reguladores de crecimiento vegetativo (Mercado y Jaimes, 2022).

El departamento de San Martín es uno de los principales productores de orquídeas (MIDAGRI y SERFOR, 2020). Sin embargo, son muchas situaciones que desestabilizan el ecosistema, por ejemplo, la deforestación, quema de bosques, cambio de uso de suelos, invasión de tierras, uso indiscriminado de las comunidades locales y por

comerciantes que solo ven el aprovechamiento económico, además de otras actividades más que producen la pérdida de flora y conlleva a la destrucción y desequilibrio de los hábitats naturales de las orquídeas como *C. rex*, motivos que ameritan catalogarlo en peligro de extinción. Es así que se desarrolló el presente estudio con el fin de proponer el uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea *C. rex* para la conservación de la genética de esta especie.

Bajo la problemática y contexto sustentado se formuló el siguiente problema de investigación: ¿El uso de extractos orgánicos favorece la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación? A partir de ello, se formuló la hipótesis nula (H_0): El uso de extractos orgánicos no favorece la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación; y, la hipótesis alterna (H_a): El uso de extractos orgánicos si favorece la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación. El objetivo general del estudio fue: Evaluar el uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación. Los específicos fueron: 1ro: Determinar un protocolo de desinfección de semillas *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro; 2do: Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona en cultivo in vitro sobre protocormos de *Cattleya rex*; y, 3ro: Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona a través del cultivo in vitro de *Cattleya rex*.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Antecedentes internacionales

Menezes-Sá et al. (2022). Establecieron el protocolo para la micropropagación y conservación in vitro de la orquídea *Cattleya tigrina* A. Rich. Encontraron que en las variables de supervivencia y presencia de raíces el medio semisólido fue superior al medio líquido, situación adversa en el caso de número de brotes; para la aclimatación, con corteza de pino las plantas desarrollaron altura mejorada con enraizamiento y brotación; asimismo, la conservación fue satisfactoria y las plantas se mantuvieron viables en 730 días con el medio Murashige y Skoog (MS) con 25 % de sales a 18 °C o 25 °C; finalmente, las plantas se propagaron en el medio semisólido (25 mL) y líquido estacionario (10 mL), mientras que se aclimataron en cortezas de pino y se conservaron en el medio MS con 25 % de las sales (18 °C o 25 °C).

Saravia-Castillo et al. (2022). Determinaron condiciones óptimas para la propagación in vitro de *Cattleya maxima* Lindl. y *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, para lo cual realizaron dos experimentos: enraizamiento y multiplicación. Para la multiplicación los tratamientos se diferenciaron de acuerdo al complemento de MS (medio Murashige y Skoog), harina de plátano, kinetina o 6 bencilaminopurina (BAP); en tanto, en el enraizamiento los complementos fueron: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenoacético (NAA), ácido indol-3-butírico (IBA) o harina de plátano. Encontraron que la harina de plátano (50 g/L) incrementó la altura de *C. maxima* (multiplicación) y *P. amabilis* (enraizamiento); BAP (0,005 g/L) y Kinetin (0,003 g/L) aumentaron el número de hojas y brotes en *C. maxima* (multiplicación); en el enraizamiento NAA (0,003 g/L) incrementó el número de hojas en *C. maxima* (multiplicación), harina de plátano estimuló la formación de raíces y 2,4-D (0.003 g/L) puede causar efectos fitotóxicos e inhibir la formación de raíces.

Arenas (2019). Desarrolló un protocolo para desinfectar explantes y preparar medios de cultivo MS para vitropropagar explantes extraídos de campo y de subcultivos de especies de *Vanilla planifolia* G. Jackson. Realizaron 6 siembras en diversos medios de cultivo con niveles de 100, 70, 40 y 10 % de MS como de sacarosa incorporado con agua de coco, para el sembrado de subcultivos cambió el MS, la sacarosa e incorporó agua de coco; en tanto, el procedimiento de desinfección consistió en ensayar diversas cantidades y tiempos de exposición al alcohol, cloruro de mercurio y cloro. Encontró que

la aparición de hongos contaminantes fue retardada con el tratamiento 40 % de MS y la incorporación de agua de coco en los medios de cultivo produjo efectos significativos, particularmente al formar raíces.

Antecedentes nacionales

Chacón-Campana et al. (2021). Evaluaron la germinación asimbiótica de cuatro especies de orquídeas *Epidendrum spilatum*, *Bletia catenulata*, *Rodriguezia longifolia* y *Epidendrum secundum* en medio de cultivo "Murashige y Skoog" (MS) con la incorporación de tres suplementos orgánicos: pulpa de plátano, pulpa de piña y agua de coco. Encontraron que para las orquídeas *Epidendrum spilatum*, *Bletia catenulata* y *Rodriguezia longifolia* el MS más pulpa de piña mostró los mejores resultados y para la orquídea *Epidendrum secundum* MS con plátano obtuvo el mayor porcentaje de germinación. Concluyeron que la adición de sustancias orgánicas en los medios de cultivo mejora la germinación asimbiótica de las semillas de orquídeas.

Vilcherrez-Atoche et al. (2020). Establecieron un protocolo reproducible de propagación in vitro y multiplicación masiva para conservar el germoplasma de *Cattleya maxima* J. Lindley en condiciones naturales. Las semillas fueron obtenidas del invernadero "Orquídeas Moyobamba" de la ciudad de Moyobamba y utilizaron el medio MS suplementado con sustancias orgánicas complejas (harina de plátano (BF) y agua de coco (CW)) así como con el tratamiento NAA-BAP. Encontraron mayor tasa de germinación de semillas (97,12 %) con el tratamiento de 40 g/L de BF y 20 % de CW y con el tratamiento NAA-BAP una tasa de formación y supervivencia de cuerpos similares protocormos (PLBs) del 100 %; finalmente, establecieron un protocolo importante de propagación in vitro empleando agua de coco y harina de plátano.

Antecedentes regionales

Ruiz-Rios (2023). A través de sistema de inmersión temporal evaluó el comportamiento en la micropropagación de especies *Cattleya violácea* y *Cattleya rex*. Evaluó 4 tratamientos que fueron: "T0 (3 ml/l de complejo B, 7,1 ml/l de bayfolan, 20 g/l de azúcar blanca, 40 g/l de plátano, 100 ml/l de agua de coco), T1 (T0 + 1 mg/l de ANA), T2 (T0 + 1 mg/l de 6-BAP) y T3 (T0 + 1 mg/l de ANA + 1 mg/l de 6-BAP)", con frecuencia y tiempo de inmersión de 3 horas y 5 minutos, respectivamente; además, evaluó el efecto de 3 densidades (20, 40 y 60 plántulas), 3 frecuencias de inmersión (3, 6 y 8 horas) y 3 tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos). Determinó como medio de cultivo más eficiente para ambas orquídeas a una densidad de 20 plántulas, 5 minutos de tiempo de inmersión y frecuencia de 3 horas en 500 ml de medio de cultivo con T2.

Ruiz (2021a). Evaluó el efecto de cuatro medios de cultivo en la formación de protocormos in vitro con semillas de *Phragmipedium besseae* y *Phragmipedium kovachii*. Estudió las 4 etapas de la germinación hasta que se formen los protocormos utilizando 4 medios de cultivo: MS ("Murashige y Skoog" a media concentración (MS 1/2)), MS+AC (MS 1/2 + 20 % de agua de coco), MS+JP (MS 1/2 + 20 % de jugo de piña) y K (Knudson). Encontró que en la etapa de germinación de semillas de *Phragmipedium kovachii* el medio de cultivo MS formó mayor porcentaje de protocormos (16,09 %) y en *Phragmipedium besseae* los medios de cultivo no favorecieron la formación de protocormos, solo observó la fase 1 (inhibición de semillas) y fase 2 (ruptura de testa).

Ruiz (2021b). Estableció un protocolo para la micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, para fines de conservación. Estudió la germinación y la influencia de citoquininas y auxinas en las etapas de multiplicación de protocormos y en enraizamiento de las plántulas, para ello utilizó diversas proporciones de citoquininas y auxinas con 4 tratamientos para cada fase. Encontró una germinación del 60,48 % y durante la etapa de multiplicación los protocormos presentaron color verde en los primeros días y cambiaron con el tiempo a un color marrón; asimismo, determinó que T3 (0,75 mg/l de auxina + 7,50 mg/l de citoquinina) fue el tratamiento más significativo en el número de hojas, longitud y tasa de crecimiento de protocormos, en cambio, en la etapa de enraizamiento los tratamientos no mostraron diferencias significativas para altura de las plántulas, longitud de raíces/plántula y número de raíces/plántula.

2.2. Fundamentos teóricos

2.2.1. Orquídeas

Las orquídeas son la familia de plantas con flores más evolucionada y diversa de la Tierra, cuyos orígenes de estas plantas se remontan a millones de años; sin embargo, la antigüedad exacta de la familia ha sido objeto de debate durante mucho tiempo, ya que no existían restos fósiles antiguos con los que trabajar (Schiff, 2018).

La familia de las orquídeas, Orchidaceae, comprende 26 000 especies en 749 géneros y es una de las dos mayores familias de plantas de hoja caduca o angiospermas, un amplio grupo que incluye hierbas, árboles, arbustos y enredaderas. Las orquídeas se dividen en cinco subfamilias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Epidendroideae y Orchidoideae. Esta subdivisión se basa en estudios de ADN y morfología y refleja diferencias importantes en las características vegetativas y, sobre

todo, en la forma en que están contruidos las flores de las orquídeas (Chase y Christenhusz, 2017).

a. Taxonomía de las orquídeas

Las orquídeas presentan la siguiente clasificación taxonómica (Tabla 1):

Tabla 1

Clasificación taxonómica de las orquídeas

Taxonomía	
Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Liliopsida
Orden	: Asparagales
Familia	: Orchidaceae
Subfamilias	: Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae

Fuente: Tomado y adaptado de Menchaca (2011).

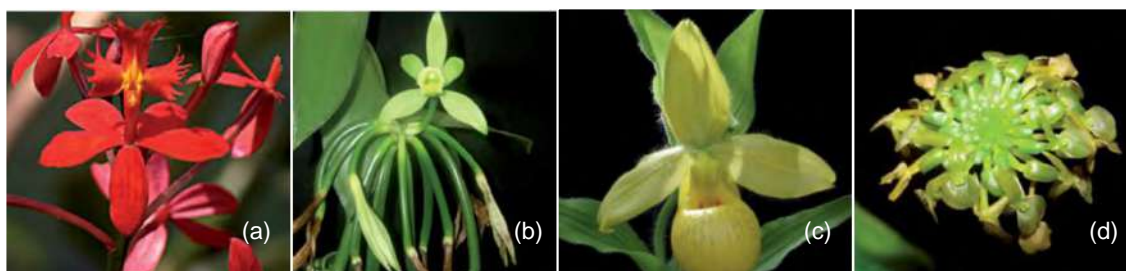


Figura 1

Subfamilias de la familia Orchidaceae. (a) Epidendroideae, (b) Vanilloideae, (c) Cypripedioideae, (d) Orchidoideae. Fuente: Tomado de Menchaca (2011). (NO CURSIVA – NORMAL)

b. Distribución y endemismo de las orquídeas en el Perú

En la flora peruana, la familia Orchidaceae es la familia florística de mayor diversidad, con aproximadamente 2 020 especies distribuidos en 212 géneros (Brako & Zarucchi, 1993; Ulloa et al., 2004), aunque de acuerdo al “Cuarto Informe del CBD” se estima que en realidad la cantidad podría variar entre 2 500 y 3 500 especies. Según estudios realizados por David Bennett Jr. y Eric Christenson (1993) el mayor número de orquídeas se encuentra en la ceja selvática (entre los 500 y 3 600 m.s.n.m.); en tanto, la menor diversidad se encuentra en la zona de la selva baja (entre 300 m.s.n.m.) y en la sierra (entre 2 600 y 3 600 m.s.n.m.).

A menudo se interpreta erróneamente que el endemismo se refiere a distribuciones estrechas (restricción del área de distribución). En realidad, se dice que un taxón es endémico de una zona si vive en ella y en ningún otro lugar. La expresión "zona endémica" se utiliza para identificar el área geográfica de la que es nativo un taxón,

mientras que "zona de endemismo" indica un área caracterizada por el solapamiento de las distribuciones de dos o más taxones (Fattorini, 2017).

En el Perú existe una gran riqueza de orquídeas, lo cual en gran parte se debe a la extensa gama de pisos ecológicos y microclimas, esto permite un elevado índice de diversificación local. Las especies de orquídeas se distribuyen en departamentos como Huánuco, Cusco, San Martín, Junín, Cajamarca, Huancavelica, Pasco, Amazonas, La Libertad, Lima, Ayacucho, Madre de Dios, Loreto, Ucayali y Puno. La gran diversidad de especies, con una amplia gama de colores, aromas, tamaños y formas, ubica a las Orchidaceae con una de las familias botánicas más difíciles de evaluar y catalogar (MIDAGRI y SERFOR, 2020).

c. Características botánicas de las orquídeas

Las especies de orquídeas se caracterizan por ser terrestres, como también algunas crecen en rocas, y particularmente son epífitas o que crecen en especies arbóreas (Acuña et al., 1998). Asimismo, existen orquídeas que se desarrollan en el subsuelo, por ejemplo, *Rhizanthella gardneri* que es una orquídea subterránea de Australia que solo ve el sol cuando florece (Sánchez y Calderón, 2010). El tamaño de las orquídeas difiere desde especies menores de 1 cm en época de floración (*Platystele jungermannioides* de la zona sur de Centroamérica, además de Costa Rica) hasta herbáceas de 13,4 m de altura (*Sobralia altissima* en Huachocolpa, Perú) (Moscoso et al., 2003). La característica más resaltante de estas especies son las flores, aunque cuenta con tres pétalos y tres sépalos como todas las monocotiledóneas, usualmente uno de sus pétalos muestra tamaño, color y forma diferente, cuyo pétalo es conocido como "labelo", si bien favorece a incrementar la atracción que el ser humano siente hacia las flores, en realidad tiene el rol de atraer y orientar la población de polinizadores que suelen visitar sus flores buscando polen y néctar como medio de alimento (Acuña et al., 1998). Existen orquídeas con flores tan grandes de hasta 70 cm (*Phragmipedium caudatum*) y con flores tan pequeñas de hasta 2 mm (*Trizeuxis falcata*); no obstante, es posible reconocer modelos estructurales únicos en unas como en otras (Sánchez y Calderón, 2010).

Sistema radicular

Las raíces de las orquídeas se encuentran cubiertas en su totalidad por tejido esponjoso, blanco cremoso, que se conoce como "velamen", lo cual le permite una elevada retención y captación de humedad (MIDAGRI y SERFOR, 2020).

Tallos

Los tallos de las orquídeas pueden ser de tres tipos principales: a) tallos cilíndricos: presentan características erectas y alargadas, similares a los carrizos con entrenudos de donde emergen inflorescencias y flores; b) pseudobulbos: tallos aéreos, abultados, comprimidos y engrosados en forma de papa, las formas varían y pueden ser enormes, las inflorescencias pueden surgir desde la base, parte media o alta del pseudobulbo y las flores desde la parte media o alta de este; c) cormos: se caracterizan por ser tallos subterráneos casi esféricos, gruesos y usualmente con muchos entrenudos, es un órgano que permite el almacenamiento de agua y reservas en forma de almidón, a pesar de que la planta pueda perder de forma completa la zona aérea también puede rebrotar por estas formaciones (Menchaca, 2011).

Hojas

La mayor cantidad de orquídeas tienen hojas con venación paralela y algunas la presentan en forma reticulada, los bordes de las hojas siempre son enteros y hay hojas de tipo plegada, hojas con duplicadas que generalmente presentan venas con la misma dimensión o con una vena principal en el centro y normalmente éstas hojas son coriáceas o gruesas, y la tercera hoja es de tipo terete o cilíndrico que presentan características cilíndricas y alargadas, además presentan apariencias de hojas de cebolla (MINAM, 2015).

Flores

Es de las estructuras más llamativas de las orquídeas y en esta se sustenta su importancia ornamental, el cual se asocia con sus variadas fragancias, tamaños, colores y formas. Además, la totalidad de flores de las orquídeas presentan 4 estructuras que se caracterizan por ser muy notables: sépalos, pétalos, columna y la antera y cavidad estigmática. También, las orquídeas pueden ser multifloras (muchas flores) o unifloras (una sola flor), aunque generalmente todas tienen las mismas estructuras, pero con diferencias en el color y la morfología (MINAM, 2015).

Frutos y semillas

Los frutos se nombran desde el punto botánico como “cápsulas”, fraccionando en tres partes su interior, hay casi redondos u ovalados y también hay largos, además pueden ser muy angulosos o pueden tener verrugas (Menchaca, 2011).

Las semillas se conforman de una sola pieza o cotiledón (monocotiledóneas), pudiendo encontrar miles de semillas en la zona interior de los frutos. Su forma general difiere

desde formas cilíndricas con punta (fusiforme) o forma de hilo (filiforme) y en algunos casos parecen protuberancias o alas. El peso cambia de 1 a 22 microgramos y la dimensión difiere desde pocas micras (muy pequeñas) hasta 5 mm. Además, tiene un embrión y una cubierta, careciendo de endospermo (mientras salen sus hojas permite que el embrión se alimente). El embrión se encuentra formado por células entre cantidades de 8 y 200, y la cáscara o testa se forma por células muertas. La dispersión de las semillas se realiza usualmente con apoyo del viento (Menchaca, 2011).

d. Factores de amenaza de las orquídeas

De acuerdo a sus flores vistosas, las orquídeas se han considerado tradicionalmente como plantas de tipo ornamental, lo que ha conllevado a que gran cantidad de especies y sus poblaciones se hayan extraído de sus ambientes originarios; además de que en la actualidad muchas especies y poblaciones se encuentran amenazadas por la pérdida de hábitats debido a actividades de deforestación en gran escala, particularmente orquídeas epífitas que crecen en la zona de los Andes tropicales catalogado como “el punto caliente de diversidad hot spot más diverso del mundo”; así también, en las pluvisilvas montañas andinas, lugar donde crecen un gran número de especies endémicas, factores como el éxito reproductivo escaso, tiempo de vida corto y pequeño tamaño de las poblaciones ponen en peligro de extinción a especies de orquídeas epífitas (MINAM, 2013).

Las orquídeas dominan las listas de especies amenazadas, cuyos síndromes de amenaza son: (1) orquídeas terrestres en bosques que son endémicas de un país y están amenazadas por la recolección ilegal; (2) orquídeas amenazadas por el cambio climático, la contaminación, el transporte y la perturbación/desarrollo para el turismo y las actividades recreativas, a menudo en Asia Oriental; (3) orquídeas epífitas en el África Subsahariana, incluido Madagascar, con diversas amenazas; y (4) orquídeas del sur y sureste de Asia amenazadas por el desmonte de tierras para la agricultura migratoria (Wraith y Pickering, 2018).

De la totalidad de especies orquídeas que hay en el país, 301 especies se categorizaron como amenazadas, de estos, 220 especies se encuentran en la categoría vulnerable (VU), 62 especies en peligro crítico (CR) y 19 en peligro (EN) (MIDAGRI y SERFOR, 2020).

2.2.2. Género *Cattleya*

El nombre *Cattleya* se atribuyó en honor al horticultor y botánico inglés “William Cattley”, quien en 1818 obtuvo líquenes y musgos desde Brasil que llegaron envueltos en hojas que hoy en día se conocen como *Cattleya labiata*. A partir de ello, Cattley procedió a cultivar las hojas hasta que florezcan, lo cual fue la primera *Cattleya* descubierta (Horich, 1980). El origen de este género de orquídea es en las altitudes medias de Sudamérica y América Central. A nivel mundial hay cerca de 65 especies (Kuan y González, 1993). Estas especies viven en selvas cálidas y húmedas en zonas elevadas de la copa de árboles, de hasta 30 m de altitud (Vargas, 2012).

a. Nombre común, categoría CITES y categorización Nacional de *Cattleya rex*

De acuerdo al MINAM (2015) la especie *Cattleya rex* se le conoce como el nombre común de Golondrina, según la CITES se encuentra categorizado en el Apéndice II y según la categorización nacional se encuentra en peligro crítico (CR) de acuerdo al D.S. N° 043-2006-AG.

b. Descripción de *Cattleya rex*

Es una planta de tipo epífita, cuya longitud de los pseudobulbos cilíndricos puede ser de hasta 35 cm. Presenta inflorescencias en racimos terminales. Cuenta con entre 3 a 8 y grandes (hasta 17 cm) pétalos y sépalos de color blanco crema pálida con la base amarillenta y el labio de color púrpura pálido (Figura 2) (MINAM, 2015).



Figura 2

Cattleya rex. (a) Detalle en flor, (b) Planta cultivada en estado vegetativo, (c) Detalle de la flor. Fuente: Tomado de MINAM (2015).

c. Distribución de *Cattleya rex*

La especie *Cattleya rex* ha sido registrada en departamentos como Puno y San Martín (MINAM, 2015):

Asimismo, Schweinfurth (1960), Dodson y Bennett (1989), Bennett y Christensen (1994) y Brako y Zarucchi (1993), como se citó en Briceño (2004), señalan que *Cattleya rex* se

encuentra en Ceja de Selva, bosque húmedo tropical en Moyobamba, Leguía, km 65 a lo largo carretera a Tarapoto, ambos flancos del Valle del Alto Mayo y la Cordillera Oriental del Río Sisa (San Martín), entre 860 a 2500 m.s.n.m., en Sandia, distrito de San Juan de Oro (Puno) a 1 350 m.s.n.m.

d. Usos de orquídeas *Cattleya*

Schiff (2018) refiere que por el tamaño y colores brillantes las *Cattleyas* se utilizan principalmente para la comercialización, como también para su hibridación con otros géneros que se asocian a este. Asimismo, Hinsley et al. (2018) mencionan que, debido al aroma de estas especies, las flores se pueden utilizar para decoraciones y que las damas lo pueden usar en el cabello.

2.2.3. Micropropagación

La micropropagación es un método en el que el tejido meristemático de material vegetal de reserva se multiplica rápidamente para producir un gran número de plantas progenitoras utilizando métodos de cultivo de tejidos vegetales in vitro. Este método se utiliza para multiplicar nuevas plantas, especialmente aquellas que han sido modificadas genéticamente o que se desean por su resistencia a las enfermedades (Wells, 2009).

Por su parte, Iliiev et al. (2010) refieren que la micropropagación es una técnica del cultivo de tejidos vegetales utilizado para el cultivo de tejidos, células y órganos vegetales aislados en condiciones axénicas (in vitro) para la regeneración y propagación de plantas enteras.

Aunque la micropropagación de orquídeas ha mostrado un desarrollo espectacular en los últimos años, se cree que su uso generalizado aún es limitado debido a problemas como la exudación de fenólicos de los explantes, el trasplante al campo, la variación somaclonal, etc. (Chugh et al., 2009).

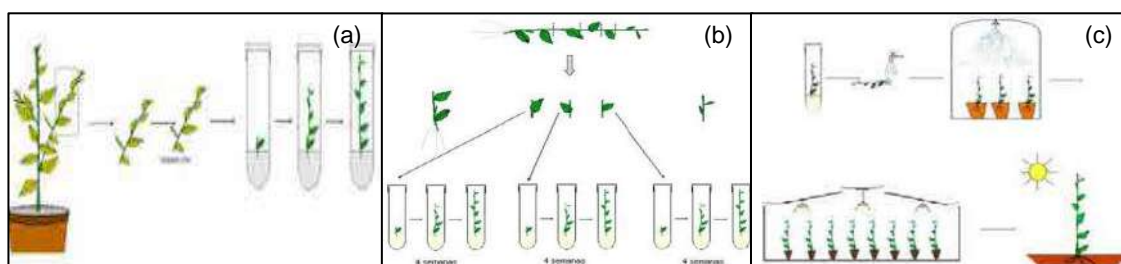
a. Etapas de la micropropagación

De acuerdo a Martínez y Gago (2008) se pueden considerar 5 etapas enumeradas desde la fase 0 hasta la IV y en cada uno de estos los objetivos se definen de forma clara (Tabla 2).

Tabla 2*Etapas de la micropropagación*

Etapas	Descripción
0: Selección de material vegetal	Etapa en la cual se incorporan los tratamientos, se prepara y selecciona a las plantas madres, siendo importante comprobar su estado de salubridad (estrés, deficiencias y libre de patógenos) y la identidad (variedad o especie a cultivar)
I: Inicio del cultivo	Es pertinente desinfectar superficialmente a las plantas seleccionadas con el objetivo de evitar el desarrollo de microorganismos (hongos y bacterias) en el medio de cultivo. Las características del explanto determinan el tiempo de desinfección y la concentración del desinfectante.
II: Multiplicación	En esta etapa se induce la multiplicación de explantos a través de la generación de estructuras nuevas mediante la vía seleccionada (embriogénica, adventicia o axilar, etc.). Se desarrollan propágulos o brotes nuevos que al separarse de los cultivos pueden producir una planta. Etapa que permite la formación de raíces adventicias, cuyo proceso se puede desarrollar <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> . En el <i>in vitro</i> se traspasan los brotes que se obtuvieron hacia medios libres de regulación de crecimiento o que solamente cuenta con auxinas, actividad que se desarrolla en condiciones estériles. En el <i>ex vitro</i> los brotes son sumergidos en concentraciones de auxinas y transferidos a sustratos limpios, que pueden ser mezclas de turba con vermiculita o perlita.
III: Inducción y desarrollo de raíces	Las plantas que se cultivan <i>in vitro</i> habitualmente tienen estomas no funcionales y cutículas de bajo desarrollo por la elevada humedad relativa dentro de los frascos de cultivo y el bajo nivel de desarrollo de fotosíntesis. Antes de transferir los cultivos <i>in vitro</i> a condiciones externas deben padecer procesos de acondicionamiento gradual: control de transpiración cuticular y estomática, y protección a la luz.
IV: Aclimatación	

Fuente: Tomado y adaptado de Martínez y Gago (2008).

**Figura 3**

Etapas de la micropropagación. (a) Etapa I, (b) Etapa II, (c) Etapa IV.

Fuente: Tomado de Martínez y Gago (2008).

b. Factores que influyen en la micropropagación

Plantas donadoras del explanto

El estado fisiológico de las plantas madres inciden significativamente en la morfogenética de los explantos. Además, mientras más joven y menos diferenciado se encuentren los tejidos a sembrar, la respuesta *in vitro* será mejor. También, las yemas

axilares que se obtienen de la parte media de tallos tienen un desarrollo más rápido que los que se obtienen de la porción apical o de la base (Martínez y Gago, 2008).

El explanto

Usualmente, para seleccionar los explantos se debe considerar los sistemas de propagación de las plantas, por ejemplo, si las plantas a micropropagar se reproducen mediante semillas, la fuente más común de los explantos son las zonas embrionarias, pero en el caso de que las especies se propaguen vegetativamente, los ápices meristemáticos y brotes jóvenes, usualmente son considerados fuente de explantos (Martínez y Gago, 2008).

Factores físicos

Los factores ambientales, como la temperatura del cultivo, el ambiente gaseoso, la condición física del medio y los factores químicos, como los medios, los tipos y concentraciones hormonales, las fuentes de carbohidratos, los agentes gelificantes, los aditivos, como las vitaminas, las sales y otros, tienen un impacto. sobre la generación de plántulas in vitro y la eficiencia de los órganos (Ascough et al., 2008).

Medios de cultivo

El medio de cultivo representa a una mezcla de sales inorgánicas micronutrientes como macronutrientes, componentes orgánicos como aminoácidos, vitaminas, carbohidratos y reguladores de crecimiento disueltos en el recurso hídrico. Este medio de cultivo puede ser empleado como líquido o semisólido cuando se incorpora compuesto gelificante, con el fin de actuar como soporte físico. La composición del medio a emplear es dependiente de la etapa de micropropagación y de la especie vegetal (Alcántara et al., 2017). Entre las principales características del medio de cultivo se encuentra el potencial osmótico (PO), cuya estimación se fundamenta en la variación de propiedades químicas y físicas de acuerdo a la existencia de solutos que, al incrementar sus niveles en la solución, la presión osmótica tiende a tomar valores más negativos (Martínez-Villegas et al., 2015).

c. Uso de extractos orgánicos en la micropropagación

Los medios utilizados en el cultivo de tejidos pueden modificarse mediante la adición de materiales orgánicos económicos como alternativa a los costosos aditivos sintéticos. Algunas fuentes orgánicas, como el agua de coco y el jugo de frutas, contienen cantidades significativas de vitaminas, aminoácidos y compuestos orgánicos que pueden actuar como reguladores del crecimiento, lo que convierte a estas fuentes orgánicas en excelentes aditivos para el cultivo in vitro (De Stefano et al., 2022).

Carranza-Alvarez et al. (2021) evaluó el efecto de diversos extractos orgánicos (agua de coco (MCO), piña (MPI), plátano (MPL) y medio control) en la micropropagación in vitro de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, encontrando que la germinación del cultivo in vitro empezó a los 60 días y que la incorporación de extractos orgánicos promovió la diferencia de los brotes, donde el de mayor eficiencia fue MPI, por lo cual refieren que los extractos orgánicos tienen la capacidad de promover la morfogénesis de vainilla, sin ser necesario el uso de reguladores de crecimiento sintético durante las primeras fases de la micropropagación.

2.3. Definición de términos básicos

Ácido nicotínico

El ácido nicotínico es un ácido piridínico carboxílico natural, contenido en la vitamina PP, un nutriente esencial para humanos y animales, y utilizado como agente antipelágico. Las plantas y los animales pueden producir ácido nicotínico a partir del triptófano, pero no suele ser completamente biodisponible (Lisicki et al., 2022).

Conservación

Es el método de uso de recursos naturales o del ambiente en su totalidad para prevenir el abandono, destrucción, polución o explotación y asegurar de esta manera el uso de los recursos (Telles, 2012).

Jugo o zumo

Es el líquido que se obtiene de frutos que se encuentran en condiciones óptimas (características organolépticas, grado de madures, etc.) y luego son sometidos a procesos de estabilización a fin de que permanezca en conservación durante el tiempo (Guevara, 2015).

Medio Murashige y Skoog (MS)

El medio Ms fue descubierto por Murashige y Skoog en 1962, se utiliza ampliamente en los laboratorios de cultivo de tejidos y contiene una mezcla de nutrientes como sales inorgánicas, carbohidratos, aminoácidos y vitaminas (Ghasheem et al., 2023).

Micropropagación

Es la propagación a través de técnicas de cultivo in vitro que proporciona una solución vital para la conservación de especies de orquídeas en peligro de extinción (De Stefano et al., 2022).

Mioinositol

Es una vitamina que tiene la capacidad de estimular la división celular y actúa como estabilizador osmótico para mantener la división de células (Kim et al. 2003; Kiviharju et al. 2005, como se citó en Mazri et al. 2016).

Tiamina

En las plantas, la tiamina desempeña un papel como molécula de respuesta al estrés abiótico y biótico, y los datos publicados sugieren que aumentar el contenido de tiamina podría aumentar la resistencia al estrés (Dong et al., 2016).

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ámbito y condiciones de la investigación

3.1.1 Contexto de la investigación

a. Ubicación geográfica

El estudio se realizó en el “Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la empresa Corporación G y G E.I.R.L.” ubicado en la ciudad de Moyobamba, provincia de Moyobamba, departamento de San Martín. Las coordenadas UTM (WGS 84, 18S) de localización son: X: 281882; Y: 9333049, a una altitud de 878,0 m.s.n.m.

b. Ubicación política

- Área de estudio : “Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la empresa Corporación G y G E.I.R.L.”
- Distrito : Moyobamba
- Provincia : Moyobamba
- Departamento : San Martín

3.1.2 Periodo de ejecución

La investigación se ejecutó de acuerdo a la resolución N° 151-2020-UNSM/CFT/FE, desde el 01-12-2020 al 01-10-2021, con un periodo de ampliación hasta el 01-10-2022.

3.1.3 Control ambiental y protocolos de bioseguridad

Se tomó en cuenta el uso de todos los protocolos de bioseguridad contra el Covid-19, implementando todas las medidas a fin de evitar posibles contagios.

De igual forma se tomó en cuenta todos los protocolos de bioseguridad en el laboratorio, portando siempre los equipos de protección personal (EPP) con el objetivo de evitar afectaciones a la salud debido a malas manipulaciones, derrame de cultivos y otros.

Finalmente, se consideró también protocolos de control ambiental, como la correcta disposición de residuos sólidos y líquidos para evitar la posible contaminación del suelo y del ambiente en general.

3.1.4 Aplicación de principios éticos internacionales

El proyecto de investigación consideró ciertos principios éticos como: respeto a las personas, al ecosistema, a la justicia y beneficencia, además de principios como la integridad, confiabilidad y transparencia.

3.2. Sistema de variables

3.2.1 Variables principales

- Variable independiente : Extractos orgánicos (líquido de piña y líquido de cocona).
- Variable dependiente : Micropropagación de *Cattleya rex*.

Tabla 3

Descripción de variables por objetivo específico

Objetivo específico Nº 1: Determinar un protocolo de desinfección de semillas *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro.

Variable abstracta	Variable concreta	Medio de registro	Unidad de medida
Protocolo de desinfección de semillas <i>Cattleya rex</i>	- Protocolo	Protocolo de desinfección, ficha de recolección de datos,	- Protocolo elaborado
	- Desinfección de semillas	análisis estadístico, figuras, tablas, registro	- %
	- Tratamiento óptimo	fotográfico.	- H ₀ : p valor > 0,05; H _a : p valor < 0,05.

Objetivo específico Nº 2: Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona en cultivo in vitro sobre protocormos de *Cattleya rex*.

Efecto de extracto de piña y cocona en cultivo in vitro sobre protocormos de <i>Cattleya rex</i> .	- Efecto de piña y cocona sobre protocormos - Tratamiento óptimo	Ficha de recolección de datos, análisis estadístico, figuras, tablas, registro fotográfico.	- H ₀ : p valor > 0,05; H _a : p valor < 0,05.
--	---	---	--

Objetivo específico Nº 3: Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona a través del cultivo in vitro de *Cattleya rex*.

Efecto de extracto de piña y cocona a través del cultivo in vitro de <i>Cattleya rex</i>	- Altura de planta - Número de hojas - Número de raíces - Tratamiento óptimo	Propuesta de medidas.	- mm - N° de hojas - N° de raíces - H ₀ : p valor > 0,05; H _a : p valor < 0,05.
--	---	-----------------------	---

3.3 Procedimientos de la investigación

Tipo de investigación:

La investigación fue “aplicada”, ya que se evaluó la desinfección de semillas de *Cattleya rex* con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) (Tabla 4) y la formación de protocormos, altura, número de hojas y número de raíces de plántulas de *Cattleya rex* con diferentes concentraciones de extractos de piña y cocona (Tabla 5). Sánchez y Reyes (2006) refiere que este tipo de investigación tiene como finalidad principal solucionar problemas prácticos inmediatos, cuyo propósito de realizar aportes al conocimiento teórico es secundario.

Nivel de investigación:

El estudio fue de nivel “explicativo – experimental”, debido a que se experimentó el efecto de NaClO en la desinfección de semillas *Cattleya rex*, y el efecto de diferentes concentraciones de extractos de piña y cocona en el desarrollo de protocormos, altura, número de hojas y número de raíces de plantas de *Cattleya rex*, además, se explicó las posibles causas que conllevaron a los resultados. La investigación experimental se realiza luego de saber las características de los hechos o fenómenos a estudiar (variables) y las causas que establecieron cuales y tales características (Caballero, 2009); en tanto, la investigación de nivel explicativo se centra en buscar el porqué de los hechos o fenómenos estableciendo relaciones causa-efecto (Sánchez y Reyes, 2006).

Población:

La población estuvo conformada por 40 frascos de vidrio con semillas de *Cattleya rex* para evaluar la desinfección, 50 frascos de vidrio con contenido de medios de cultivo y semillas para evaluar el desarrollo de protocormos, y 20 frascos con contenido de medios de cultivo y 10 protocormos por frasco para evaluar la altura, número de hojas y número de raíces de plántulas de *Cattleya rex*.

Muestra:

La muestra estuvo conformada por la misma población, es decir, 40 frascos con semillas de *Cattleya rex* para evaluar la desinfección, 50 frascos con contenido de medios de cultivo y semillas para evaluar el desarrollo de protocormos, y 20 frascos con contenido de medios de cultivo y 10 protocormos por frasco para evaluar la altura, número de hojas y número de raíces de plántulas de *Cattleya rex*. El muestreo fue al azar.

Diseño:

a) Diseño experimental o muestral

La investigación fue de tipo experimental y obedeció a un diseño de bloques completamente al azar (DBCA). Se utilizaron 4 tratamientos de NaClO y 10 repeticiones para evaluar la desinfección de semillas; 5 tratamientos con concentraciones de extracto de piña y cocona, y 10 repeticiones para evaluar el desarrollo de protocormos; además, se utilizaron 5 tratamientos con concentraciones de extracto de piña y cocona, y 4 repeticiones con 10 plántulas de *Cattleya rex* por cada repetición para evaluar la altura, número de hojas y número de raíces.

b) Representación de la información

Los resultados obtenidos se representan en figuras y tablas. Se utilizó las hojas de cálculo Excel y el programa estadístico InfoStat.

c) Análisis estadístico

Se utilizó la estadística descriptiva e inferencial previo análisis de supuestos de normalidad y homocedasticidad. Se utilizó el estadístico de análisis de varianza a un 95 % de confianza para determinar diferencia significativa entre los tratamientos y se utilizó el estadístico de Tukey a un 95 % de confianza para estimar el tratamiento óptimo en el desarrollo de las variables estudiadas. Para procesar y analizar los datos se utilizó las hojas de cálculo Excel y el programa estadístico InfoStat.

3.3.1 Determinar un protocolo de desinfección de semillas *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro**a. Actividades y tareas**

- Elaboración del protocolo.
- Estimación de porcentaje de desinfección de semillas.
- Procesamiento y análisis de datos.

b. Descripción de los procedimientos**Elaboración del protocolo**

- La elaboración del protocolo de desinfección de semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro consideró el método de la jeringa. El protocolo consideró los lineamientos para la preparación y lavado de materiales, y sobre todo los procedimientos para desarrollar la desinfección de las semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro.

- La elaboración del protocolo de desinfección consideró el uso de cuatro tratamientos (Tabla 4) a base de hipoclorito de sodio (NaClO), tomando en cuenta que diversos protocolos emplean este compuesto químico para la desinfección de semillas de orquídeas, ya que se considera como un tratamiento económico y simple.

Tabla 4

Tratamientos utilizados para la desinfección de semillas de Cattleya rex

Tratamientos	Hipoclorito de sodio (NaClO) (%)
T0	0,0
T1	0,10
T2	0,25
T3	0,50

Evaluación de la desinfección de semillas

- Para estimar el porcentaje de desinfección de semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro se realizó la siembra de las semillas luego de terminar con el proceso de desinfección según los tratamientos establecidos.

- La siembra de semillas se realizó en el medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 (MS) enriquecido con stok A, B, C, D, E, F y G, además de tiamina, ácido nicotínico, azúcar, mioinositol, carbón activado y agar en 500 ml de agua destilada.

- Se cortó la parte inferior de las jeringas específicamente en 0 ml, para ello se utilizó bisturí calentado con el mechero. Luego se retiró el algodón de las jeringas con la ayuda de pinzas, las semillas obtenidas fueron colocadas en cajas de Petri y separadas utilizando una microespátula. Posteriormente las semillas se colocaron en el medio de cultivo basal contenido en los frascos de vidrio, estos frascos fueron tapados con el mismo papel aluminio que se utilizó en el autoclavado del medio de cultivo basal previo a la desinfección en el mechero y luego se sellaron con cinta de embalaje lo cual permitió mejorar la presión del tapado. La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar con el fin de evitar la contaminación.

- Transcurrido 30 días se evaluó el porcentaje de desinfección tomando en cuenta las porciones de protocormos contaminados en base a 10 frascos por cada tratamiento. Para ello, se subdividió los frascos en cuatro segmentos y mediante la técnica de la observación directa se determinó los segmentos contaminados y no contaminados, representándolo finalmente a través de porcentajes. Esta actividad fue desarrollada con la asistencia técnica de la asesora del proyecto en el “laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la empresa Corporación G y G E.I.R.L.”.

c. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se utilizó la estadística descriptiva y la estadística inferencial como la prueba de análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre dosis de hipoclorito de sodio (NaClO) y la prueba de Tukey para estimar la dosis óptima en la desinfección de semillas de *Cattleya rex*. Para procesar y analizar los datos se utilizó las hojas de cálculo Excel y el programa estadístico InfoStat.

3.3.2 Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona en cultivo in vitro sobre protocormos de *Cattleya rex*

a. Actividades y tareas

- Preparación de medio de cultivo.
- Desinfección de semillas.
- Siembra y establecimiento de semillas en el medio de cultivo.
- Evaluación de protocormos.
- Procesamiento y análisis de datos.

b. Descripción de los procedimientos

Preparación de medio de cultivo

- La preparación de los medios de cultivo fue desarrollado en el “laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la empresa Corporación G y G E.I.R.L.”, para ello se tomó en consideración los insumos y proporciones establecidos en la Tabla 5. Los medios de cultivo fueron preparados tomando en cuenta un volumen de 500 ml.

Tabla 5

Medios de cultivo utilizados para el desarrollo de protocormos de semillas de Cattleya rex

Insumos	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
Stok A (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Stok B (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Stok G (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Stok C (ml)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Stok D (ml)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Stok E (ml)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Stok F (ml)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Tiamina (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ácido nicotínico (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Azúcar (g)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Mioinositol (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Carbón activado (g)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Agar (g)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Piña Golden (g)	0,0	12,5	25,0	0,0	0,0
Cocona (g)	0,0	0,0	0,0	12,5	25,0

- Finalmente los tratamientos, con pH de 5,6 se colocaron en frascos de vidrio y se llevaron al autoclavado durante un tiempo de 20 minutos, este proceso se desarrolló con el objetivo de esterilizar los tratamientos.

Desinfección de semillas

- Se realizó la desinfección de las semillas tomando en consideración el protocolo y demás procedimientos establecidos en el primer objetivo específico. Además, se utilizó como insumo para la desinfección al hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5 %.

Siembra y establecimiento de semillas en el medio de cultivo

- La siembra de semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro se realizó en los medios de cultivo establecidos en la Tabla 5. Luego de culminar el proceso de desinfección de semillas, se cortó la parte inferior de las jeringas específicamente en 0 ml utilizando un bisturí calentado con el mechero. Luego se retiró el algodón de las jeringas con la ayuda de pinzas, las semillas obtenidas fueron coladas en cajas de Petri y separadas utilizando una espátula. Posteriormente las semillas se colocaron en los medios de cultivo contenido en los frascos de vidrio, estos frascos fueron tapados con el mismo papel aluminio que se utilizó en el autoclavado del medio de cultivo basal previo calentamiento en el mechero y luego se sellaron con cinta de embalaje lo cual permitió mejorar la presión del tapado. La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar con el fin de no contaminar las semillas.

Evaluación de protocormos

- Para la evaluación de protocormos se dibujaron cuadrantes de 0,5 x 0,5 cm (Ruiz, 2021a) en una cantidad de 10 unidades dentro de cada uno de los frascos. En cada frasco se realizaron las respectivas observaciones de todos los cuadrantes empleando un estereomicroscopio, cada cuadrante dentro de cada frasco representó un 10 %, sumando los 10 cuadrantes un total de 100 %. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones (1 frasco de vidrio = 1 repetición) obteniendo de esta forma 100 unidades de evaluación por cada tratamiento (100 cuadrantes).

- Se evaluó el día que empezaron a formarse protocormos en por lo menos un cuadrante de cada frasco de vidrio en estudio. Asimismo, se evaluó el porcentaje de protocormos que se formaron al día 30 después de la siembra de las semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro. La actividad se desarrolló en el "laboratorio de cultivo de tejidos

vegetales de la empresa Corporación G y G E.I.R.L.” con la asistencia técnica de la asesora del proyecto.

c. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se utilizó la estadística descriptiva y la estadística inferencial como la prueba de análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre tratamientos y la prueba de Tukey para estimar el tratamiento óptimo de extracto de piña y cocona. Para procesar y analizar los datos se utilizó las hojas de cálculo Excel y el programa estadístico InfoStat.

3.3.3 Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona a través del cultivo in vitro de *Cattleya rex*

a. Actividades y tareas

- Siembra de protocormos.
- Medición de variables.
- Procesamiento y análisis de datos.

b. Descripción de los procedimientos

Siembra de protocormos

- Transcurrido los 50 días después de la siembra de las semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro en los medios de cultivo, se escogieron al azar 4 frascos por tratamiento, de los cuales se extrajeron 10 protocormos, estos fueron sembrados en otros frascos que contenían el mismo medio de cultivo según lo trabajado en el segundo objetivo y establecido en la Tabla 5.

Medición de variables

- Luego de los 120 días de haber sembrado los protocormos, se realizó la medición de las siguientes variables:

1. Altura de plantas: Se extrajeron las plantas de los frascos y se colocaron en papel milimetrado, lo cual favoreció a la medición de la altura empleando una regla milimétrica.
2. Número de hojas: Luego de extraer las plantas de cada uno de los frascos se procedió al conteo del número de hojas empleando la técnica de la observación directa.
3. Número de raíces: De igual forma, luego de extraer las plantas de cada uno de los frascos se procedió al conteo del número de raíces empleando también la técnica de la observación directa.

c. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se utilizó la estadística descriptiva y la estadística inferencial como la prueba de análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre tratamientos y la prueba de Tukey para estimar el tratamiento óptimo de extracto de piña y cocona. Para procesar y analizar los datos se utilizó las hojas de cálculo Excel y el programa estadístico InfoStat.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Protocolo de desinfección de semillas *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro

4.1.1 Protocolo de desinfección de semillas de la especie *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro

El protocolo de desinfección de semillas *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro consideró el método de la jeringa, cuyos procesos se describen a continuación:

a. Preparación y lavado de materiales

- Lavar todos los materiales con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5 % y luego proceder a esterilizarlos en la autoclave durante un tiempo aproximado de 20 minutos.
- Los materiales como frascos de vidrio y cajas de Petri deben ser envueltos con papel bond A4 reciclado, amarrados con hilo pabilo y colocados en bolsas de polipropileno para ser ubicados finalmente en la autoclave.

b. Desinfección de semillas

- La desinfección de semillas se realiza en base a cuatro tratamientos con NaClO, los cuales son: T0 = 0 % de NaClO; T1: 0,1 % de NaClO; T2: 0,25 % de NaClO; y, T3: 0,5 % de NaClO.
- Desarrollar el método de la jeringuilla utilizando como materiales jeringas de 20 ml. Este método consiste en introducir el algodón hasta los 5 ml ejerciendo una adecuada presión y luego colocar las semillas de *Cattleya rex* dentro de las jeringas.
- Preparar los tratamientos (T1, T2 y T3) en vasos de precipitación de 500 ml. Luego se calienta las agujas de las jeringas en el mechero durante un tiempo aproximado de 10 segundos y después se procede a desinfectar las semillas jalando el embolo de las jeringas hasta los 20 ml con el objetivo de succionar el NaClO según las dosis de tratamiento establecidos. Sacudir las jeringas durante un tiempo aproximado de 10 minutos con el fin de desinfectar la totalidad de semillas contenidas en las jeringas. Es recomendable repetir cuatro veces toda la acción mencionada para una desinfección óptima de las semillas de *Cattleya rex*, la cual se debe desarrollar dentro de la cámara de flujo laminar.

- Para el caso de T0 o el tratamiento donde no se utilice dosis de NaClO, se recomienda enjuagar las semillas con agua esterilizada. Realizar la misma acción y el mismo número de repeticiones de acuerdo a lo que se desarrolle con los tratamientos con dosis de NaClO.



Figura 4

Desinfección de semillas *Cattleya rex*. (a) Preparación de tratamientos de NaClO, (b) Preparación de semillas para la desinfección, (c) Desinfección de semillas con tratamientos de NaClO.

4.1.2 Tratamiento óptimo para la desinfección de semillas de la especie *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro

En la Figura 5 se muestra que T0 registró el mayor porcentaje de contaminación de semillas *Cattleya rex* (100,0 %), seguido de T1 (70,0 %) y T2 (50,0 %), en cambio T3 permitió obtener el menor porcentaje de contaminación de *Cattleya rex* (10,0 %) en relación a los demás tratamientos utilizados en el estudio.

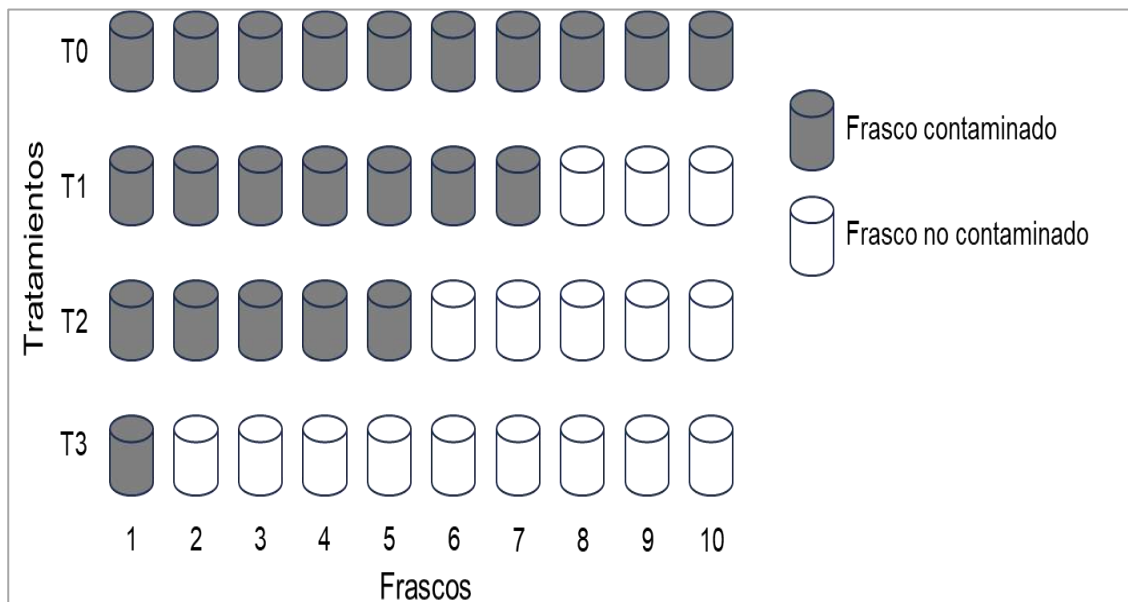


Figura 5

Porcentaje de contaminación de frascos con semillas de *Cattleya rex* obtenidos del proceso de desinfección.

Nota: T0: 0 % de NaClO; T1: 0,1 % de NaClO; T2: 0,25 % de NaClO; T3: 0,5 % de NaClO.

La Figura 5 también demuestra que T3 fue el tratamiento que permitió obtener un mayor porcentaje de semillas desinfectadas (90,0 %) de manera eficiente y óptimas para la producción de protocormos, los demás tratamientos con dosis menores a 0,5 % de NaClO permitieron obtener menores porcentajes de semillas desinfectadas eficientemente, además, se observa que es recomendable utilizar por lo menos una de las dosis y de forma eficiente 0,5 % de NaClO, debido a que con T0 el total de semillas de *Cattleya rex* en todos los frascos utilizados no fueron desinfectados de manera eficiente y óptima.

Tabla 6

Análisis de varianza para el efecto de tratamientos de NaClO en la desinfección de semillas de Cattleya rex

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F-Valor	p-valor
Tratamientos	42 750,00	3	14 250,00	9,33	0,0001*
Error	55 000,00	36	1 527,78		
Total	97 750,00	39			

Nota: *Significativo al 0,05. $R^2 = 44,0\%$; CV = 91,97.

En la Tabla 6 se evidencia que a un nivel de confianza del 95 % se determinó un p-valor < 0,05, lo cual permitió rechazar la hipótesis nula (H_0) que indicó que el porcentaje de desinfección de semillas de *Cattleya rex* fue la misma entre los tratamientos y por ende se aceptó la hipótesis alterna (H_a), con ello se concluyó que hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de desinfección de semillas según los

tratamientos de NaClO; es decir, las diferentes dosis de NaClO incidieron en los porcentajes de desinfección de semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro.

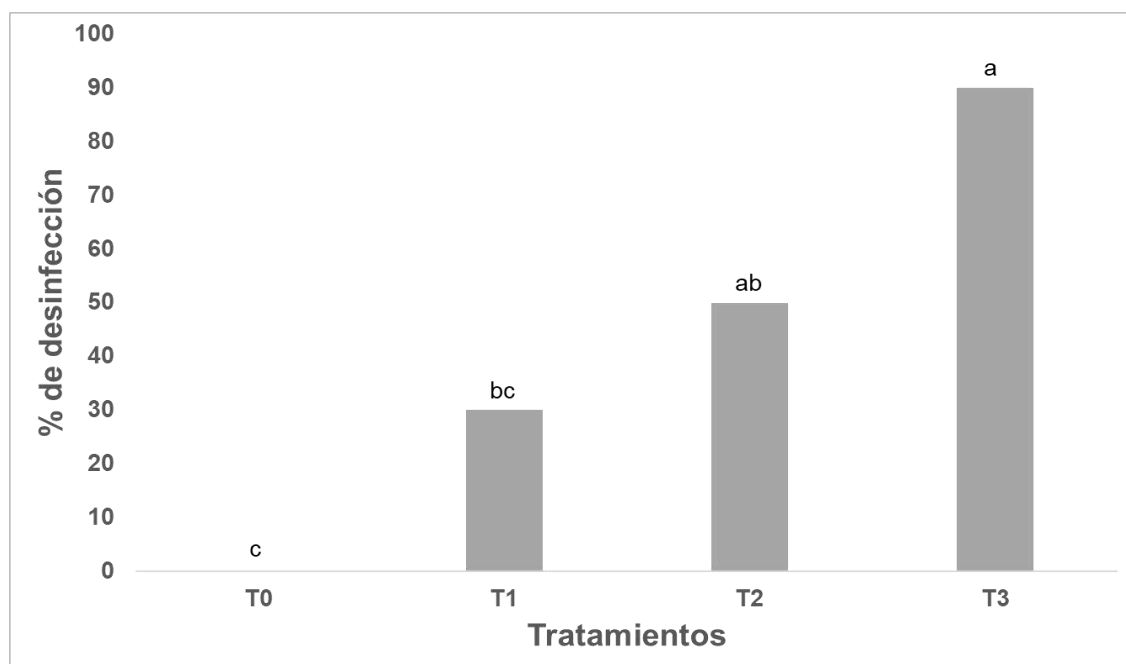


Figura 6

*Evaluación de Tukey ($p < 0,05$) para el efecto de NaClO para la desinfección de semillas de *Cattleya rex*.*

Nota: Medias con letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

T0: 0 % de NaClO; T1: 0,1 % de NaClO; T2: 0,25 % de NaClO; T3: 0,5 % de NaClO.

En la Figura 6 se observa que los porcentajes de desinfección de semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro obtenidos con T3 difirieron estadísticamente de los porcentajes de desinfección de semillas obtenidos con T0 y T1, en cambio no hubo diferencias estadísticamente significativas con T2, aunque debido a una media mayor para T3 (90,0 %) en relación a T2 (50,0 %), es posible afirmar que 0,5 % de NaClO es el tratamiento óptimo para desinfectar semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro.

La dosis óptima para desinfectar de manera eficiente y óptima semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro fue 0,5 % de NaClO en comparación a 0,25 y 0,1 % de NaClO, este resultado guarda relación con lo encontrado por Billard et al. (2014) quienes al desinfectar semillas de dos especies y una variedad de orquídeas pertenecientes al género *oncidium* empleando dosis de NaClO 0,5 % (T1), 1,0 % (T2) y 2,0 % (T3), encontraron que T1 fue la dosis óptima al no afectar la germinación in vitro de las especies. Estos resultados permiten demostrar que concentraciones bajas de NaClO favorecen a la contaminación de las semillas de orquídeas y que concentraciones

mayores podrían quemar a las semillas disminuyendo de esta forma la germinación y por ende la producción de especies de orquídeas.

Arenas (2019) al desinfectar especies de *V. planifolia* G. Jackson in Andrews con diversas concentraciones y tiempos de exposición encontró diferencias significativas al reducir NaClO al 0,25 % por 5 segundos, bicloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,025 % por 10 segundos y alcohol al 50 % por 5 segundos de inmersión. En el estudio solo se utilizó NaClO en diferentes concentraciones y no se evaluaron tiempos de exposición al desinfectar semillas de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro, ante ello, se recomienda añadir concentraciones de alcohol y HgCl₂, como también evaluar tiempos de exposición para mejorar los porcentajes de desinfección de semillas de *C. rex*.

4.2 Efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona en cultivo in vitro sobre protocormos de *Cattleya rex*

Luego de sembrar las semillas de *Cattleya rex* se realizó la evaluación del día en que comenzaron a formarse los protocormos y de los porcentajes formados al día 30 en cada uno de los frascos con medios de cultivo de extracto de piña y cocona, los resultados se presentan a continuación:

Tabla 7

Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el día de inicio de formación de protocormos de Cattleya rex

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F-Valor	p-valor
Tratamientos	418,52	4	104,63	37,91	<0,0001*
Error	124,20	45	2,76		
Total	542,72	49			

Nota: *Significativo al 0,05. R² = 77,0 %; CV = 6,35.

En la Tabla 7 se evidencia que a un nivel de confianza del 95 % se determinó un p-valor < 0,05, esto permitió rechazar H₀ y se concluyó que hubo diferencias estadísticamente significativas en el comienzo de la formación de protocormos de *Cattleya rex* según extractos de piña y cocona utilizados como medios de cultivo; es decir, los diversos tratamientos utilizados influyeron en el día de comienzo de formación de protocormos.

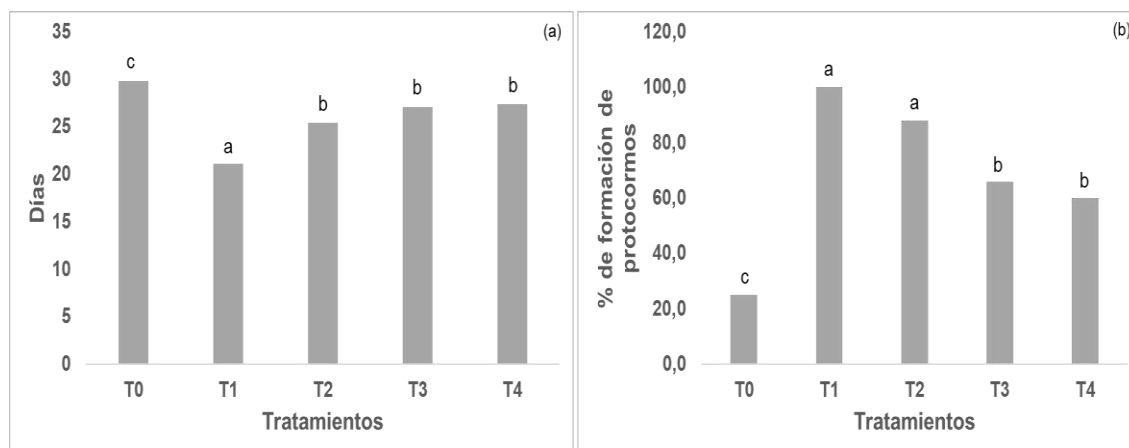
Tabla 8

*Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el porcentaje de formación de protocormos de *Cattleya Rex* al día 30*

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F-Valor	p-valor
Tratamientos	33 408,00	4	8 352,00	32,26	<0,0001*
Error	11 650,00	45	258,89		
Total	45 058,00	49			

Nota: *Significativo al 0,05. $R^2 = 74,0\%$; $CV = 23,73$.

En la Tabla 8 se evidencia que a un nivel de confianza del 95 % se determinó un p-valor < 0,05, esto permitió rechazar H_0 y se concluyó que hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de formación de protocormos de *Cattleya rex* al día 30 según extractos de piña y cocona utilizados como medios de cultivo; es decir, los diversos tratamientos utilizados influyeron en los porcentajes de formación de protocormos al finalizar el primer mes de siembra.

**Figura 7**

Evaluación de Tukey ($p < 0,05$) para el efecto de extractos de piña y cocona. (a) Día de comienzo de formación de protocormos; (b) Porcentaje de formación de protocormos al día 30.

Nota: Medias con letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

El estadístico de comparación de medias de Tukey a un 95 % de confianza permitió determinar que en promedio el día de comienzo de formación de protocormos fue menor con T1 (21,1 días), seguido de T2 (25,4 días) y T0 comenzó a formar protocormos en un mayor número promedio de días (29,8 días) (Figura 7a); asimismo, se determinó que el porcentaje de formación de protocormos al día 30 fue mayor con T1 (100,0 %), seguido de T2 (88,0 %) y fue menor con T0 (25,0 %) (Figura 7b); en líneas los resultados demostraron que los medios de cultivo de piña y cocona favorecieron significativamente

el día de comienzo y porcentaje de formación de protocormos al día 30 con respecto al tratamiento testigo y donde el medio de cultivo con 12,5 g de piña tuvo mayor influencia.

En relación al medio de cultivo control los extractos orgánicos de piña Golden y cocona favorecen la formación de protocormos de *Cattleya rex*, aunque el primero fue más significativo al promover la formación en menores días y al generar el mayor porcentaje de protocormos, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Chacón - Campana et al. (2021) quienes determinaron que el MS más piña favorece la germinación de *Bletia catenulata*, *Rodriguezia longifolia* y *Epidendrum spilatum*, probablemente esto se puede deber a que la piña presenta concentraciones de calcio, potasio, hierro, proteínas, azúcares y otros compuestos antioxidantes (Ramírez & Pacheco, 2011), en cambio la cocona presenta elevados niveles de fibra, proteínas, carbohidratos, materia seca y acidez titulable que favorece la formulación de subproductos (Obregón-La Rosa et al., 2021).

Los resultados de porcentaje de formación de protocormos obtenido con el medio de T1 compuesto por tiamina, ácido nicotínico, azúcar, mioinositol, carbón activado, agar y 12,5 g de piña Golden, además, de stok A, B, G, C, D, E y F superó a lo encontrado por Ruiz (2021a) y Ruiz (2021b) que fueron 16,09 % y 60,48 %, respectivamente; particularmente la diferencia en los resultados se puede deber al estado de madurez de los frutos o capsulas de las orquídeas de donde se recolectaron las semillas (Chacón et al., 2018) y también ambos investigadores no agregaron carbón activado a sus medios de cultivo y se ha demostrado que este compuesto favorece la germinación de semillas (Chacón et al., 2018; Rodríguez et al., 2001), además, se puede asumir que la diferencia en los resultados se puede deber a otros factores como el pH de los medios de cultivo y condiciones ambientales, que diversos factores manifiestan que estos factores influyen en la germinación de semillas de orquídeas.

4.3 Efecto de diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona a través del cultivo in vitro de *Cattleya rex*

En base a 4 repeticiones y 10 plántulas por cada repetición según tratamiento estudiado, se evaluó luego a los 120 días después de sembrar los protocormos de *Cattleya rex* variables como altura de planta, número de hojas y número de raíces. Los resultados se presentan a continuación:

4.3.1 Altura, número de hojas y número de raíces del desarrollo de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro

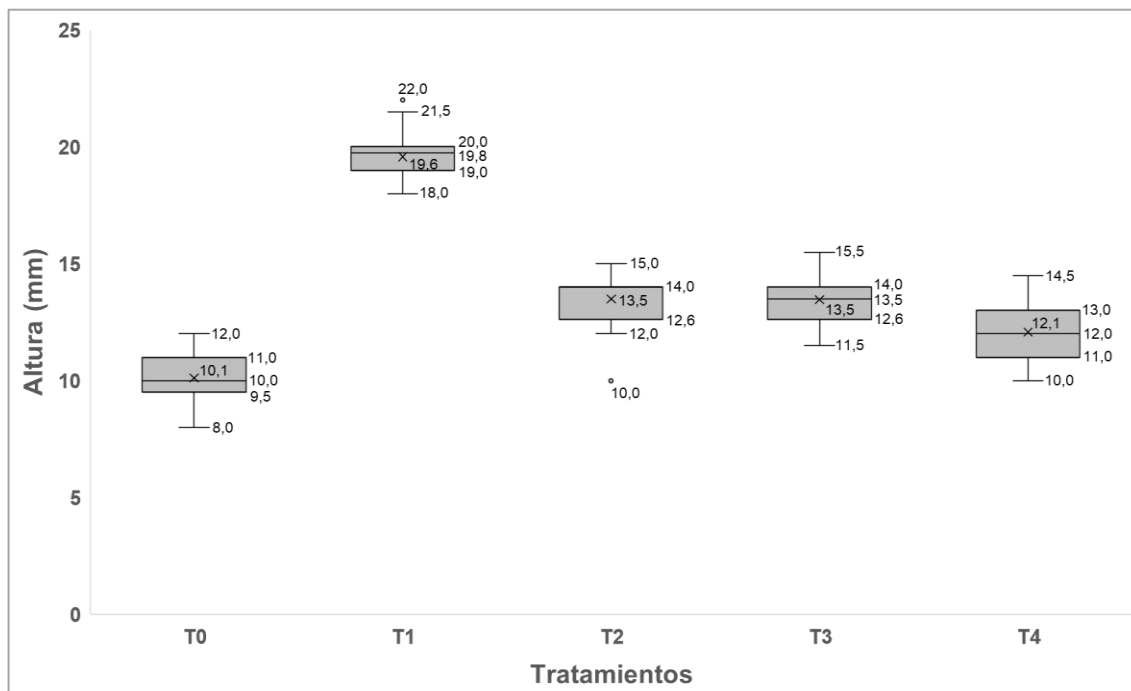


Figura 8

Altura (mm) de explantes de *Cattleya rex* obtenidos con extractos de piña y cocona.

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

En la Figura 8 se evidencia que T1 permitió obtener plantas de *C. rex* de mayor altura, donde la mayor cantidad tuvieron longitudes entre 19,0 y 20,0 mm, existiendo plantas que llegaron a medir altitudes tan altas de hasta 21,5 y 22,0 mm, en tanto, la aplicación de T0 permitió obtener plantas de menor altura, donde el mayor número presentaron longitudes entre 9,5 y 11,0 mm, habiendo plantas que llegaron a registrar alturas tan bajas de hasta 8,0 mm; por su parte, T2, T3 y T4 registraron alturas relativamente iguales.

Asimismo, en la Figura 8 se evidencia que tanto la media (M) y mediana (Me) de altura de plantas de *C. rex* obtenido con T1 (M = 19,6 mm y Me = 19,8 mm) fueron relativamente superiores a lo obtenido con los demás tratamientos como T2 (M = 13,5 mm y Me = 14,0 mm), T3 (M = 13,5 mm y Me = 13,5 mm), T4 (M = 12,1 mm y Me = 12,0 mm) y T0 (M = 10,1 mm y Me = 10,0 mm); es decir, 12,5 g de piña Golden permitió obtener plantas de *C. rex* de mayor altura.

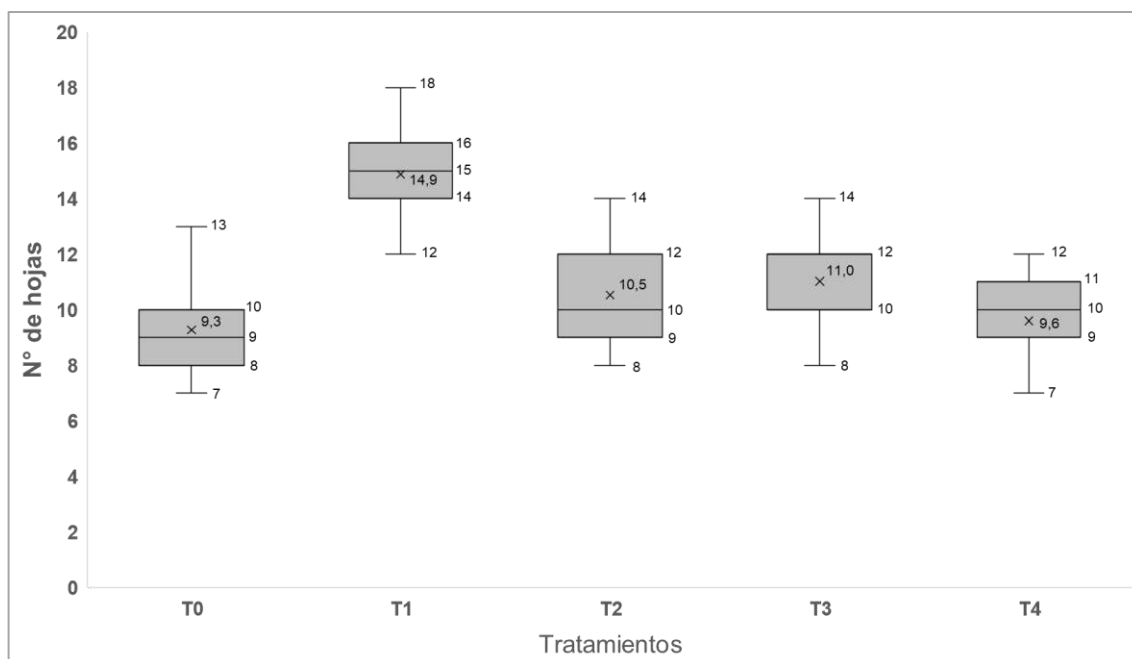


Figura 9

Número de hojas de explantes de *Cattleya rex* obtenidos con extractos de piña y cocona.

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

En la Figura 9 se evidencia que con T1 un mayor número de plantas de *C. rex* produjeron una mayor cantidad de hojas que varían entre 14 y 16, existiendo plántulas que llegaron a producir cantidades tan altas de hasta 18 hojas, en cambio, con la aplicación de T0 un mayor número de individuos produjeron menores cantidades de hojas que varían entre 8 y 10, habiendo plantas que llegaron a producir cantidades tan bajas de hasta 7 hojas; por su parte, con la aplicación de T2, T3 y T4 las plantas produjeron número de hojas relativamente iguales.

Asimismo, en la Figura 9 se evidencia que tanto la media (M) y mediana (Me) de número de hojas de plantas de *C. rex* obtenido con T1 (M = 14,9 hojas y Me = 15 hojas) fueron relativamente mayores a lo obtenido con la aplicación de T2 (M = 10,5 hojas y Me = 10 hojas), T3 (M = 11,0 hojas y Me = 12 hojas), T4 (M = 9,6 hojas y Me = 10 hojas) y T0 (M = 9,3 hojas y Me = 9 hojas); es decir, con 12,5 g de piña Golden las plantas de *C. rex* produjeron un mayor número de hojas.

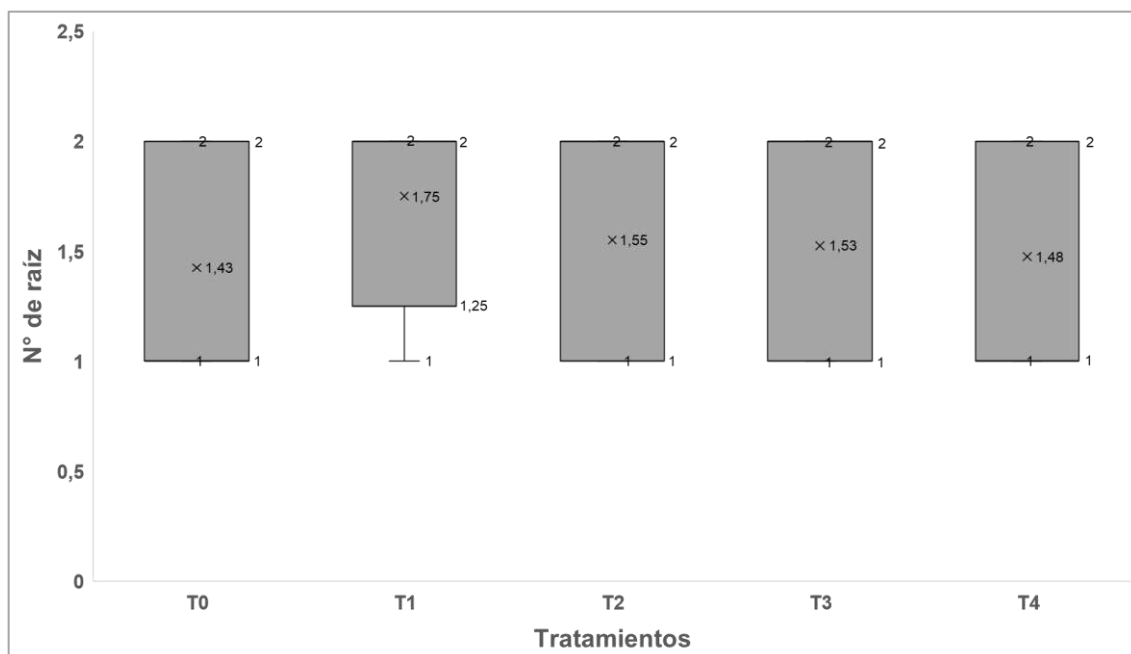


Figura 10

Número de raíz de explantes de *Cattleya rex* obtenidos con extractos de piña y cocona.

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

En la Figura 10 se evidencia que con T1 un mayor número de plantas de *C. rex* produjeron una mayor cantidad de raíces que varían entre 1,25 y 2, siendo este último el mayor número de raíces producido con los cuatro tratamientos, en tanto, con la aplicación de T0, T2, T3 y T4 el número de raíces de las plantas varió entre 1 y 2.

Asimismo, en la Figura 10 se evidencia que tanto la media (M) y mediana (Me) de número de raíces de plantas de *C. rex* obtenido con T1 (M = 1,75 raíces y Me = 2 raíces) fueron relativamente mayores a lo obtenido con la aplicación de T2 (M = 1,55 raíces y Me = 2 raíces), T3 (M = 1,53 raíces y Me = 2 raíces), T4 (M = 1,48 raíces y Me = 1 raíz) y T0 (M = 1,43 raíces y Me = 1 raíz); es decir, con 12,5 g de piña Golden las plantas de *C. Rex* produjeron relativamente un mayor número de raíces.

4.3.2 Efecto de las concentraciones de extracto de piña y cocona en la altura, número de hojas y número de raíces de *Cattleya rex* bajo condiciones in vitro

Tabla 9

Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre la altura de plantas de Cattleya rex

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F-Valor	p-valor
Tratamientos	2 004,76	4	501,19	478,27	<0,0001*
Repeticiones	16,72	3	5,57	5,32	0,0016*
Tratamientos*repeticiones	19,88	12	1,66	1,58	0,1005
Error	188,63	180	1,05		
Total	2 229,99	199			

Nota: *Significativo al 0,05. $R^2 = 92,0\%$; $CV = 7,45$.

En la Tabla 9 se observa que a un 95 % de confianza el análisis de varianza permitió determinar que hubo diferencias estadísticamente significativas en el factor tratamiento ($p = < 0,0001$) y repeticiones ($p = 0,0016$), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en la interacción tratamientos por repeticiones ($p = 0,1005$); es decir, la altura de las plantas de *Cattleya rex* cultivado bajo condiciones in vitro estuvo influenciado independientemente por los tratamientos y repeticiones; además, el coeficiente de determinación (R^2) de 92,0 % y coeficiente de variabilidad (CV) de 7,45 % indicaron un elevado nivel de confiabilidad del registro de datos y asociación de la altura de las plantas con los tratamientos de extracto de piña y cocona estudiados.

Tabla 10

Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el número de hojas de plantas de Cattleya rex

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F-Valor	p-valor
Tratamientos	806,38	4	201,60	113,18	<0,0001*
Repeticiones	11,08	3	3,69	2,07	0,1053
Tratamientos*repeticiones	107,22	12	8,93	5,02	<0,0001*
Error	320,60	180	1,78		
Total	1 245,28	199			

Nota: *Significativo al 0,05. $R^2 = 74,0\%$; $CV = 12,7$.

En la Tabla 10 se observa que a un 95 % de confianza el análisis de varianza permitió determinar que hubo diferencias estadísticamente significativas en el factor tratamiento ($p = < 0,0001$) y la interacción tratamientos por repeticiones ($p = < 0,0001$), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en el factor repeticiones ($p = 0,1053$); es decir, el número de hojas de las plantas de *Cattleya rex* cultivado bajo condiciones in vitro estuvo influenciado independientemente por los tratamientos y la interacción tratamientos y repeticiones; además, el R^2 de 74,0 % y CV de 12,7 % indicaron un elevado nivel de confiabilidad del registro de datos y asociación del número de hojas de las plantas con los tratamientos de extracto de piña y cocona estudiados.

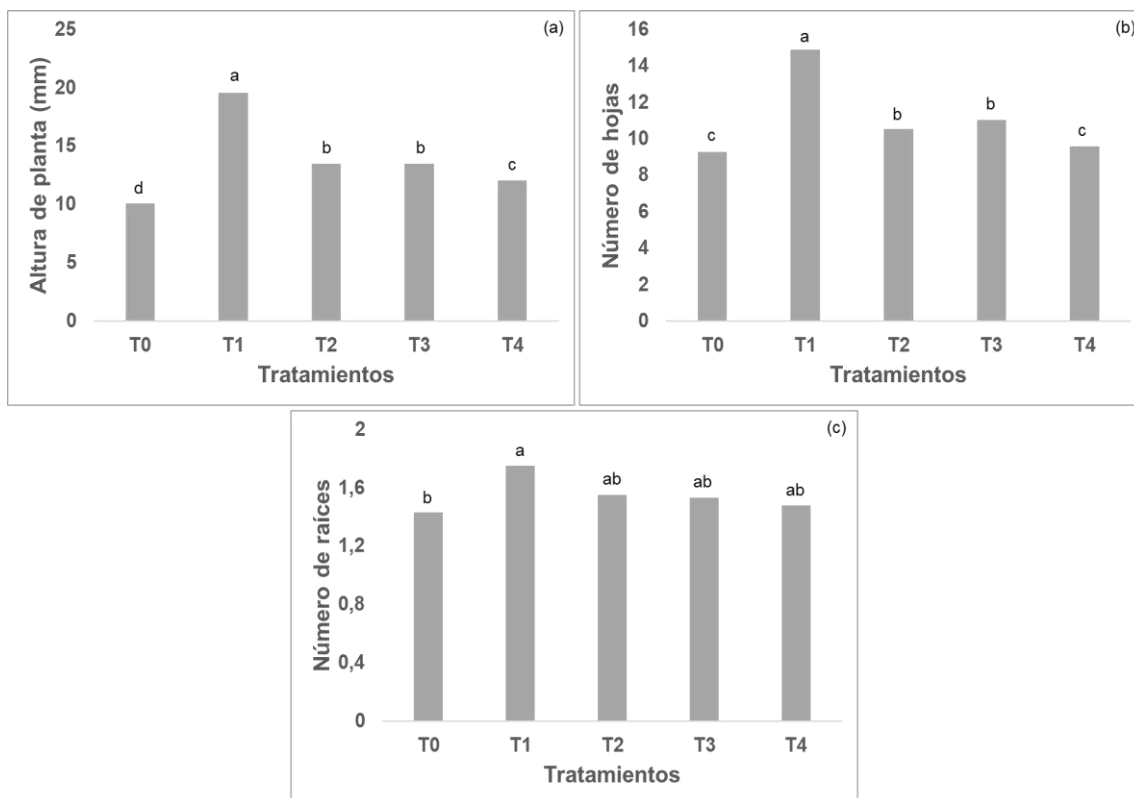
Tabla 11

Análisis de varianza para el efecto de extractos de piña y cocona sobre el número de raíces de plantas de Cattleya rex

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F-Valor	p-valor
Tratamientos	2,47	4	0,62	2,41	0,0509
Repeticiones	0,05	3	0,02	0,07	0,9751
Tratamientos*repeticiones	0,97	12	0,08	0,32	0,9860
Error	46,10	180	0,26		
Total	49,60	199			

Nota: *Significativo al 0,05. $R^2 = 7,0\%$; $CV = 32,76\%$.

En la Tabla 11 se observa que a un 95 % de confianza el análisis de varianza permitió determinar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el factor tratamiento ($p = 0,0509$), repeticiones ($p = 0,9751$) y la interacción tratamientos por repeticiones ($p = 0,9860$); es decir, el número de raíces de *Cattleya rex* cultivado bajo condiciones in vitro no se vio influenciado por los tratamientos y repeticiones; además, el R^2 de 7,0 % y CV de 32,76 % indicaron una muy baja asociación del número de raíces de las plantas con los tratamientos de extracto de piña y cocona estudiados.

**Figura 11**

Evaluación de Tukey ($p < 0,05$) para el efecto de extractos de piña y cocona. (a) Altura; (b) Número de hojas; (c) Número de raíces.

Nota: Medias con letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

El estadístico de comparación de medias de Tukey a un 95 % de confianza permitió determinar que para la variable altura de planta, T1 con una media de 19,58 mm fue el tratamiento óptimo al mostrar diferencias estadísticamente significativas con los demás tratamientos, los cuales también fueron significativamente diferentes con el tratamiento testigo (T0) (Figura 11a); en el caso del número de hojas, T1 con una media de 14,88 hojas/planta fue también el tratamiento óptimo al mostrar diferencias estadísticas significativas con los demás tratamientos (Figura 11b); para la variable número de raíces no hubo un tratamiento óptimo en específico que difiera estadísticamente de los demás, T1 solo difirió con T0 y no con los demás tratamientos de extracto de piña y cocona, aunque la media obtenida con T1 (1,75 raíces/planta) fue mayor que los demás tratamientos (Figura 11c).

En líneas generales las Figuras 11a y 11b muestran que todos los tratamientos con extractos orgánicos de piña y cocona mejoraron el desarrollo de la altura y número de hojas de las plantas de *Cattleya rex* en relación al tratamiento control, siendo el medio de cultivo más óptimo y significativo 12,5 g de piña Golden; por otro lado, la Figura 11c muestra que, aunque no hubo diferencias significativas entre las parejas de tratamientos, 12,5 g de piña Golden también favoreció un mejor promedio de número raíces por planta, particularmente en comparación al tratamiento testigo.

Se determinó que 12,5 g de piña Golden junto a los demás compuestos utilizados en el medio de cultivo T1 (Tabla 5) promovió un mayor desarrollo de la altura de plantas (19,58 mm = 1,96 cm) de *Cattleya rex*; al respecto, Vilcherrez-Atoche et al. (2020) determinaron a los 90 días una mayor altura de planta de *C. maxima* (1,84 cm) con reguladores de crecimiento 0,5 mg/l de ácido naftalénico acético (NAA) y 0,1 mg/l de 6-Bencilaminopurina (BAP) seguido de 30 g/l de harina de plátano (1,17 cm) y 20 % de agua de coco (1,09 cm); Saravia-Castillo et al. (2022) determinaron que a los 90 días MS más harina de plátano (50 g/l) aumentó la altura de plantas de *C. maxima* (11,50 mm) en el experimento de multiplicación y de *Phalaenopsis amabilis* (14,80 mm) en el experimento de enraizamiento. Se puede observar que los resultados encontrados superan a lo determinado por los autores mencionados, particularmente estos resultados se pueden deber a la diferencia genética de las especies estudiadas, además, de factores como los compuestos empleados en los medios de cultivo y las condiciones ambientales donde se desarrolla el cultivo.

Asimismo, se determinó estadísticamente que el tratamiento óptimo en el desarrollo de número de hojas de *Cattleya rex* fue T1 con 12,5 g de piña Golden junto a otros compuestos utilizados en el medio de cultivo (Tabla 5), lo cual permitió obtener en

promedio 14,88 hojas/planta; Vilcherrez-Atoche et al. (2020) obtuvo con el tratamiento de reguladores de crecimiento (NAA-BAP) un mayor número de hojas (5,28) y en todos los medios de cultivo con harina de plátano y agua de coco la cantidad de hojas fue superior a 3; asimismo, Saravia-Castillo et al. (2022) determinaron que a los 90 días el número de hojas en *C. maxima* superó a la de *Phalaenopsis amabilis*, en el experimento de multiplicación favoreció la presencia de kinetin (9,71 hojas) y BAP (9,75 hojas) y en el enraizamiento promovió el NAA (21,70 hojas) y el ácido indol-3-butírico (IBA) (17,70 hojas). Al igual que para la altura de plantas, la diferencia en los resultados de número de hojas se asocia con la diferencia genética de las especies, compuestos de los medios de cultivo y las condiciones ambientales del desarrollo de los cultivos.

En el caso del número de raíces las diferentes concentraciones de extracto de piña y cocona utilizados no mostraron diferencia estadísticamente significativa, aunque T1 con 12,5 g de piña permitió obtener en promedio un mayor número de raíces (1,75 raíces/planta), particularmente esto se puede deber a las características propias de la composición química de la piña, ya que cuenta con concentraciones de calcio, potasio, hierro, proteínas, azúcares y otros compuestos antioxidantes (Ramírez y Pacheco, 2011).

Se ha demostrado que el uso de extractos orgánicos de piña y cocona favorecen el desarrollo de variables como altura y número de hojas de plantas de *Cattleya rex*, con ello se respalda la teoría que el extracto de las frutas tiene la capacidad de actuar como reguladores de crecimiento, convirtiéndose en excelentes fuentes orgánicas para el cultivo in vitro (De Stefano et al., 2022), además, los compuestos naturales promueven la organogénesis contribuyendo a minimizar costos en la propagación in vitro (Velázquez et al., 2016) y aquellos como el plátano, piña y agua de coco favorecen la morfogénesis y rizogénesis ya que actúan casi igual como las citocinas y auxinas (De Menezes et al., 2016).

CONCLUSIONES

El protocolo de desinfección de semillas de *Cattleya rex* considera ciertos criterios, lineamientos y procedimientos necesarios para la preparación y lavado de materiales, y para la desinfección de semillas. Asimismo, la dosis óptima para una desinfección eficiente de semillas de *Cattleya rex* es 0,5 % de hipoclorito de sodio (NaClO).

El uso de concentraciones de extractos orgánicos de piña y cocona favorecen el día de comienzo y porcentaje de formación de protocormos a partir de semillas de *Cattleya rex* en comparación al medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) sin concentraciones de compuestos orgánicos, siendo el tratamiento más significativo 12,5 g de piña Golden que promueve la formación de protocormos en promedio a partir del día 21 y llegando al día 30 a formar el 100 % de protocormos.

El uso de medios de cultivo de extractos de piña y cocona difieren estadísticamente en el desarrollo de altura y número de hojas, más no en el número de raíces de *Cattleya rex*, además, los diversos tratamientos de piña y cocona difieren estadísticamente del tratamiento testigo en la altura y número de hojas, donde 12,5 g de piña Golden es tratamiento más óptimo para mejorar significativamente el desarrollo de la altura y número de hojas de *Cattleya rex*.

Se concluye que el uso de extractos orgánicos de piña y cocona si favorece la micropropagación de la orquídea *Cattleya rex* con fines de conservación, promoviendo particularmente el desarrollo de la altura y número de hojas.

RECOMENDACIONES

A responsables de laboratorios de cultivos de tejidos vegetales y reproductores in vitro de orquídeas, recomendarles usar extractos orgánicos de piña y cocona en la micropropagación de otras especies de orquídeas del departamento, con el fin de salvaguardar la biodiversidad y promover la conservación.

A estudiantes de la facultad de Ecología y otros profesionales investigadores, recomendarles evaluar el uso de otros extractos orgánicos como harina de plátano, agua de coco y otros, de manera independiente o en combinación con reguladores de crecimiento u otros compuestos (tiamina, azúcar, agar, carbón activado), y evaluar el efecto en otras especies de orquídeas, con el objetivo de incrementar el conocimiento científico y tener alternativas para mejorar el desarrollo y crecimiento de orquídeas.

Asimismo, a estudiantes de la facultad de Ecología y otros profesionales investigadores, recomendarles desarrollar estudios referidos al tema abordado para proponer protocolos para la desinfección de semillas y evaluar otras variables como longitud de hojas y raíces, número de brotes y otros de la especie *C. rex* u otra especie. Además, estudiar los ambientes a los cuales mejor se adaptan las orquídeas y la perspectiva de productores u organizaciones del departamento, cuyas experiencias mejoren el interés y objeto de la investigación, con el fin de complementar y mejorar la información encontrada.

A gobernadores regionales y locales se recomienda promover proyectos con fines de conservación, reproducción y propagación de *C. rex*, dado a la importancia económica de la orquídea como fuente de ingreso, uso y comercialización en el mercado local, nacional e internacional, y la promoción de desarrollo turístico, su importancia en el aspecto social por los beneficios para curar enfermedades y mejorar niveles económicos de las familias, y por su importancia ambiental ya que su pérdida genera desequilibrios ecológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, R. A., Jaen, A., Monje-Nájera, J., Warner, J., Mendez-Estrada, V. H., y Rivas, M. (1998). *El mundo de la naturaleza tropical* (J. Monje-Nájera, Ed.; 1st ed.). Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Alcántara, J. S., Castilla, M. G., y Sánchez, R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *Invitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación | *Biociencias* (UNAD). *BIOCIENCIAS*, 1(1), 71-83. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Arenas, M. T. (2019). *Optimización de un medio de cultivo para la vitropogación de Vanilla planifolia G. Jackson* [Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio institucional. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/11348>
- Ascough, G. D., Erwin, J. E., y Van Staden, J. (2008). Reduced temperature, elevated sucrose, continuous light and gibberellic acid promote corm formation in *Watsonia vanderspuyiae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(3), 275-283. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9441-6>
- Besi, E. E., Mustafa, M., Yong, C. S. Y., y Go, R. (2023). Deforestation impacts on diversity of orchids with inference on the conservation initiatives: Malaysia case study. *The Botanical Review*. <https://doi.org/10.1007/s12229-023-09292-y>
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A., y Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *oncidium*. *Polibotánica*, 38(38), 145-157. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200008
- Brako, L., y Zarucchi, J. L. (1993). Catálogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Garden*, 45, 1-1286.
- Briceño, I. I. (2004). *Propagación vegetativa, fenología y comercio de seis especies del género Cattleya Lindl (Orchidaceae)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio institucional. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNMS_8fbf148f0ec2d71986bee212dd98f486

- Cardoso, J. C., Martinelli, A. P., y Teixeira da Silva, J. A. (2016). A novel approach for the selection of *Cattleya* hybrids for precocious and season-independent flowering. *Euphytica*, 210(1), 143-150. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1714-2>
- Carhuamaca, G. C. (2019). *Estado de conservación de la cattleya mooreana en los bosques montanos de la cordillera la divisoria Huánuco - Perú* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/20.500.14292/1432>
- Carranza-Alvarez, C., Trinidad-García, K. L., Reyes-Hernández, H., Castillo-Pérez, L. J., y Fortanelli-Martínez, J. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación in vitro de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (*Orchidaceae*). *Biotecnia*, 23(1), 5-12. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.805>
- Cetzal, W., Basu, S., y Noguera-Savelli, E. (2014). *Orchidaceae: The Largest Family of Flowering Plants*. The Encyclopedia of Earth. https://www.researchgate.net/publication/263424947_Orchidaceae_The_Largest_Family_of_Flowering_Plants
- Chacón-Campana, M. A., Ponce-Aranibar, L. M., Muñiz-Luna, S. B., Huaracha-Quispe, D. P., y Flores-Huisa, K. (2021). Propagación in-vitro de cuatro especies de orquídeas nativas de la región Cusco. *Cantua*, 16, 26-43. <https://doi.org/10.51343/cantu.v16i0.630>
- Chacón, M. R., Contreras, O. M., y Cáceres, H. E. (2018). Contribución a la conservación de *Orchidiaceas* de Santander mediante cultivo in vitro de semillas. En *Luna Azul*. Universidad de Santander. <https://doi.org/10.17151/LUAZ.2016.43.7>
- Chakraborty, A., Pal, N., Ashish, H., Debi, C., Mishra, S., Kumar, S., y Dhal, A. (2022). Medicinally important common orchids of India. En S. Kumar (Ed.), *Medico Biowealth of India* (Vol. 5, pp. 25-29). https://www.researchgate.net/publication/359398351_MEDICO-BIOWEALTH_OF_INDIA_Volume_5
- Chase, M., y Christenhusz, M. (2017). *The book of orchids*. <https://doi.org/10.7280/chicago/9780226224664>
- Chugh, S., Guha, S., y Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507-520. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>

- De Menezes, L., Machado, M. de F., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M. A., y Mangolin, C. A. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo in vitro del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia (Arica)*, 34(1), 47-54. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>
- De Stefano, D., Costa, B. N. S., Downing, J., Fallahi, E., y Khoddamzadeh, A. A. (2022). In-vitro micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements. *American Journal of Plant Sciences*, 13(03), 380-393. <https://doi.org/10.4236/ajps.2022.133023>
- Dolce, N. R., Medina, R. D., Terada, G., González-Arno, M. T., y Flachsland, E. A. (2020). In vitro propagation and germplasm conservation of wild orchids from South America. En *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges* (pp. 37-94). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_4
- Dong, W., Thomas, N., Ronald, P. C., y Goyer, A. (2016). Overexpression of thiamin biosynthesis genes in rice increases leaf and unpolished grain thiamin content but not resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00616>
- Fattorini, S. (2017). Endemism in historical biogeography and conservation biology: concepts and implications. *Biogeographia – The Journal of Integrative Biogeography*, 32(1), 47-75. <https://doi.org/10.21426/B632136433>
- Ghasheem, N. AL, Al-saeed, R. A., y Fadala, L. T. (2023). In vitro, effect of sucrose concentration and type of culture medium on fungal colonies infections on Murashige and Skoog medium. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(3S), 2667-2678. <https://doi.org/10.17762/SFS.V10I3S.977>
- Guevara, A. (2015). *Elaboración de pulpas, zumos, néctares, deshidratados, osmodeshidratados y frutas confitadas*. <http://www.lamolina.edu.pe/postgrado/pmdas/cursos/dpactl/lecturas/Separata%20Pulpas%20n%C3%A8ctares,%20merm%20desh,%20osmodes%20y%20fruta%20confitada.pdf>
- Hariyadi, I., Harahap, F., y Silitonga, M. (2023). Response formation of *Cattleya* orchid leaf callus (*Cattleya* Sp.) with the addition of 2.4 Dichlorophenoxy Acetic Acid and 6-Benzyl Amino Purine in vitro. *Advances in Science and Technology*, 126, 219-225. <https://doi.org/10.4028/p-6rj5x0>

- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación* (6ta ed.). McGRAW-HILL / INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.
- Hinsley, A., De Boer, H. J., Fay, M. F., Gale, S. W., Gardiner, L. M., Gunasekara, R. S., Kumar, P., Masters, S., Metusala, D., Roberts, D. L., Veldman, S., Wong, S., y Phelps, J. (2018). A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Indonesia Botanical Journal of the Linnean Society*, 186, 435-455. <https://academic.oup.com/botlinnean/article/186/4/435/4736317>
- Horich, C. K. (1980). Las Clatteyas de Costa Rica. En Asociación Costarricense de Orquideología (Ed.), *Orquídeas: su cultivo en Costa Rica*.
- Iliev, I., Gajdošová, A., Libiaková, G., y Jain, S. M. (2010). Plant micropropagation. En *Plant Cell Culture* (pp. 1-23). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch1>
- Kuan, C., y González, L. (1993). *Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas*. Instituto Nacional de Aprendizaje.
- Lisicki, D., Nowak, K., y Orlińska, B. (2022). Methods to produce nicotinic acid with potential industrial applications. *Materials*, 15(3), 765. <https://doi.org/10.3390/ma15030765>
- Martínez, L., y Gago, J. (2008). Micropropagación vegetal. *Rebigo*, 3, 59-65. http://revbigo.webs.uvigo.es/images/revbigo/2008/Rebigo_2008_07.pdf
- Martínez-Villegas, Y. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Villegas-Torres, Ó. G., Castillo-Gutiérrez, A., y Alia-Tejacal, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(4), 369-374. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61043041004>
- Mazri, M. A., Meziani, R., El Fadile, J., y Ezzinbi, A. eddine. (2016). Optimization of medium composition for in vitro shoot proliferation and growth of date palm cv. Mejhoul. *3 Biotech*, 6(1). <https://doi.org/10.1007/S13205-016-0430-X>
- Menchaca, R. A. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas*. https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF
- Menezes-Sá, T. S. A., Costa, A. S. da, Arrigoni-Blank, M. de F., Blank, A. F., Moura, G. M. S., y Soares, C. A. (2022). In vitro propagation and conservation of *Cattleya*

- tigrina* A. Rich. *Ciência Rural*, 52(5), 1-11. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200517>
- Mercado, S. A., y Jaimes, Y. M. (2022). Inclusion of organic components in culture medium to improve the in vitro propagation of *Cattleya warscewiczii* and *Cattleya gaskelliana*. *South African Journal of Botany*, 148, 352-359. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.002>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI), y Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). (2020). *Plan nacional de conservación de las orquídeas amenazadas del Perú, periodo 2020-2029*. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1559497/Plan%20Nacional%20de%20Conservaci%C3%B3n%20de%20las%20Orqu%C3%ADdeas%20Amenazadas%20de%20Per%C3%BA.pdf.pdf>
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2013). *Manual de orquídeas: Identificación y origen*. <https://www.gob.pe/institucion/minam/informes-publicaciones/2566-manual-de-orquideas-identificacion-y-origen>
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2015). *Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial*. <https://www.serfor.gob.pe/portal/wp-content/uploads/2019/10/GU%C3%8DA-DE-IDENTIFICACI%C3%93N-DE-ORQUIDEAS-CON-MAYOR-DEMANDA-COMERCIAL.pdf>
- Moscoso, D., Salinas, N., y Nauray, W. (2003). La familia *Orchidaceae* L. en Wiñay-Wayna, Santuario Histórico de Machu Picchu. *Lyonia*, 3(2), 273-282. [https://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%203\(2\)%202003\(145-308\)/Moscoso%20Zambrano,%20D.,%20%20N.%20Salinas%20Revilla%20%26%20W.%20Nauray%20Huari%201%3B%20Lyonia%203\(2\)%202003\(273-282\).pdf](https://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%203(2)%202003(145-308)/Moscoso%20Zambrano,%20D.,%20%20N.%20Salinas%20Revilla%20%26%20W.%20Nauray%20Huari%201%3B%20Lyonia%203(2)%202003(273-282).pdf)
- Obregón-La Rosa, A. J., Augusto-Elías-Peñafiel, C. C., Contreras-López, E., Arias-Arroyo, G. C., y Bracamonte-Romero, M. (2021). Características fisicoquímicas, nutricionales y morfológicas de frutas nativas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 23(1), 17-25. <https://doi.org/10.18271/ria.2021.202>
- Pant, M., Negi, A., Singh, A., Gautam, A., y Rawat, M. (2020). *Cattely orchids: A mini review*. *Journal of Critical Reviews*, 7(12), 4592-4599. https://www.researchgate.net/publication/348870374_CATTELYA_ORCHIDS_A_MINI_REVIEW

- Ramírez, A., y Pacheco, E. (2011). Composición química y compuestos bioactivos presentes en pulpas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 36(1), 71-75. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33917727011.pdf>
- Rodríguez, L., Valles, J. R., González, R., Alvarado, K., Telles, E., Díaz, A., y Sánchez, E. (2001). Germinación asimbiótica in vitro de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. *Biotecnología vegetal*, 1(2), 115-116. <https://core.ac.uk/download/pdf/233095867.pdf>
- Ruiz, M. E. (2021a). *Efecto de cuatro medios de cultivo en la formación de protocormos in vitro de Phragmipedium kovachii J.T. Atwood, Dalstrom & Ric. Fernández y Phragmipedium besseae Dodson & J.A. Kuhn. en la región San Martín* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/20.500.14292/1990>
- Ruiz, M. E. (2021b). Micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61. <https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.99>
- Ruiz-Rios, A. (2023). *Evaluación del comportamiento en la micropropagación de las especies Cattleya rex y Cattleya violacea mediante el sistema de inmersión temporal* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de San Martín]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/5174>
- Sánchez, C., y Reyes, C. (2006). *Metodología y diseño en la investigación científica* (E. V. Universitaria, Ed.).
- Sánchez, M., y Calderón, A. (2010). Evaluación preliminar de orquídeas en el Parque Nacional Cutervo, Cajamarca-Perú. *Ecología Aplicada*, 9(1), 1-7. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Saravia-Castillo, G., Tapia., Figueroa, L., y Borjas-Ventura, R. (2022). Auxins and cytokinins elicit a differentiated response in the formation of shoots and roots in *Cattleya maxima* Lindl and *Phalaenopsis amabilis* (L) Blume. *Scientia Agropecuaria*, 13(1), 63-69. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.006>
- Schiff, J. L. (2018). History of orchids. En *Rare and Exotic Orchids* (pp. 1-27). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70034-2_1
- Telles, M. Á. (2012). *Conservación de orquídeas en México*.

- Teo, Z. W. N., Zhou, W., y Shen, L. (2019). Dissecting the function of MADS-Box transcription factors in orchid reproductive development. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01474>
- Ulloa, C., Zarucchi, J. L., y León, B. (2004). MBG: Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993-2003. *Arnaldoa*, 1-242. http://www.mobot.org/MOBOT/research/peru/diez_a%C3%B1os_per%C3%BA.shtml
- Vargas, D. A. (2012). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de Cattleya violacea* [Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil]. Repositorio institucional. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/1671>
- Velázquez, V. N., Quijano-Avila, J., y Rodríguez-Ávila, N. L. (2016). Análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación in vitro de orquídeas silvestres del estado de Campeche. *Revista del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida*, 31(63), 27-31. https://www.researchgate.net/publication/312054411_ANALISIS_DE_DIFERENTES_SUSTRATOS_EN_LA_GERMINACION_Y_MULTIPPLICACION_in_vitro_DE_ORQUIDEAS_SILVESTRES_DEL_ESTADO_DE_CAMPECHE
- Vilcherrez-Atoche, J. A., Rojas-Idrogo, C., y Delgado-Paredes, G. E. (2020). Micropropagation of *Cattleya maxima* J. Lindley in culture medium with banana flour and coconut water. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 10(4), 179-193. <http://www.fotunejournals.com/micropropagation-of-cattleya-maxima-j-lindley-in-culture-medium-with-banana-flour-and-coconut-water.html>
- Wells, K. E. (2009). *Development of a laboratory protocol for the micropropagation of Monterey Pines (Pinus radiata), año nuevo stand* [Tesis de maestría, California Polytechnic State University, San Luis Obispo]. <https://core.ac.uk/download/pdf/19136016.pdf>
- Wong, D. C. J., Pichersky, E., y Peakall, R. (2017). The biosynthesis of unusual floral volatiles and blends involved in orchid pollination by deception: Current progress and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01955>
- Wraith, J., Norman, P., y Pickering, C. (2020). Orchid conservation and research: An analysis of gaps and priorities for globally red listed species. *Ambio*, 49(10), 1601-1611. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01306-7>

- Wraith, J., y Pickering, C. (2018). Quantifying anthropogenic threats to orchids using the IUCN Red List. *Ambio*, 47(3), 307-317. <https://doi.org/10.1007/s13280-017-0964-0>
- Zhan, Q., Liang, Y., Zhang, Z., Liu, F., Li, L., Tang, X., Liang, Z., Chen, W., Hu, M., Tan, S., Luo, H., Zhou, Y., y Yang, B. (2022). Geographic patterns of the richness and density of wild orchids in Nature Reserves of Jiangxi, China. *Diversity*, 14(10), 855. <https://doi.org/10.3390/d14100855>

ANEXOS

**Anexo 1. Datos de protocormos, altura, número de hojas y número de raíces
para evaluar el efecto de los extractos orgánicos de piña y cocona**

Tabla 12*Datos de inicio de formación de protocormos de Cattleya rex*

Repeticiones	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
R1	30	24	25	26	27
R2	29	20	24	26	26
R3	29	22	24	28	28
R4	28	21	28	25	27
R5	31	20	26	30	26
R6	32	23	25	29	29
R7	30	20	25	27	28
R8	34	20	26	28	25
R9	28	22	27	25	30
R10	27	19	24	27	28
Promedio	29,8	21,1	25,4	27,1	27,4
Máximo	34	24	28	30	30
Mínimo	27	19	24	25	25

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

Tabla 13*Datos de formación de protocormos de Cattleya rex al día 30*

Repeticiones	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
R1	20,0 %	100,0 %	90,0 %	70,0 %	60,0 %
R2	40,0 %	100,0 %	100,0 %	80,0 %	70,0 %
R3	30,0 %	100,0 %	90,0 %	60,0 %	50,0 %
R4	40,0 %	100,0 %	70,0 %	90,0 %	60,0 %
R5	0,0 %	100,0 %	80,0 %	30,0 %	70,0 %
R6	0,0 %	100,0 %	90,0 %	40,0 %	50,0 %
R7	20,0 %	100,0 %	100,0 %	70,0 %	50,0 %
R8	0,0 %	100,0 %	80,0 %	60,0 %	100,0 %
R9	50,0 %	100,0 %	80,0 %	100,0 %	30,0 %
R10	50,0 %	100,0 %	100,0 %	60,0 %	60,0 %
Promedio	25,0 %	100,0 %	88,0 %	66,0 %	60,0 %

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

Tabla 14*Datos de altura de plantas de Cattleya rex al día 120*

Repeticiones	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
R1	10,5	18,0	12,5	13,0	12,0
	10,0	19,0	14,0	13,5	12,5
	9,0	20,0	12,0	14,0	10,5
	11,0	18,5	14,0	12,0	11,0
	11,0	19,0	14,5	12,0	12,0
	10,0	20,0	15,0	13,0	13,0
	11,5	20,5	14,0	12,0	12,0
	10,5	19,0	12,0	12,0	11,5
	10,0	18,5	13,0	14,0	12,0
	9,5	20,0	15,0	12,5	10,0
R2	11,0	20,0	13,0	14,0	11,0
	10,5	21,0	13,5	13,0	10,0
	11,5	18,5	14,0	13,0	13,0
	9,0	21,0	10,0	14,5	10,5
	8,0	19,0	14,0	13,5	12,0
	9,0	19,5	14,0	12,0	11,0
	9,0	18,0	15,0	12,0	12,0
	10,0	20,0	13,5	13,0	12,0
	12,0	20,0	14,0	14,0	11,5
	11,0	19,0	12,0	11,5	10,0
R3	10,0	18,0	13,0	14,0	11,0
	11,0	19,5	14,5	15,0	12,0
	10,5	20,0	12,0	14,0	10,0
	10,0	20,5	14,0	14,5	12,5
	9,5	19,0	15,0	13,5	11,0
	8,5	18,0	14,0	14,0	14,0
	9,0	21,0	15,0	12,5	13,5
	10,0	20,0	13,0	14,0	12,0
	9,5	19,0	13,0	13,0	14,0
	11,0	18,0	12,0	14,0	13,0
R4	10,0	20,0	12,5	15,0	12,5
	11,5	19,5	14,0	12,0	13,5
	10,0	20,0	13,0	15,0	12,0
	9,5	22,0	12,5	14,5	14,0
	10,0	21,5	14,5	14,0	13,0
	10,5	19,0	15,0	15,0	14,0
	10,0	20,0	14,0	14,0	12,0
	11,0	21,0	13,5	15,5	14,5
	9,0	20,5	14,0	13,5	13,0
	10,0	18,0	12,0	13,0	12,0

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

Tabla 15*Datos de número de hojas de plantas de Cattleya rex al día 120*

Repeticiones	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
R1	10	14	12	8	7
	13	13	12	11	8
	7	16	14	12	7
	10	15	13	10	10
	9	15	14	8	9
	8	14	10	9	10
	11	13	11	10	9
	10	15	9	10	8
	12	16	12	9	11
R2	8	17	10	10	11
	11	14	10	9	9
	7	16	12	12	10
	7	18	9	12	11
	8	14	8	10	8
	8	15	9	11	9
	10	16	12	12	11
	8	14	10	8	11
	7	14	11	9	10
R3	9	14	9	12	8
	12	16	8	13	9
	10	14	10	14	7
	11	16	9	11	11
	11	14	12	12	10
	8	15	10	13	9
	10	16	12	12	10
	11	14	11	12	12
	10	14	8	11	9
R4	8	16	8	13	10
	7	17	13	12	9
	8	15	13	11	11
	8	12	10	12	12
	11	15	9	12	11
	8	13	11	12	12
	9	14	10	13	10
	10	16	11	12	10
	10	15	10	12	11

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

Tabla 16*Datos de número de raíces de plantas de Cattleya rex al día 120*

Repeticiones	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
R1	10	2	2	2	1
	13	1	1	2	1
	7	2	2	1	2
	10	2	1	1	1
	9	2	2	2	2
	8	2	1	1	1
	11	1	2	2	2
	10	2	1	1	1
	12	2	1	1	2
	9	2	2	2	1
R2	8	2	1	2	2
	11	1	2	1	1
	7	2	2	2	2
	7	1	1	1	1
	8	2	1	1	1
	8	1	2	2	2
	10	2	2	2	1
	8	1	2	1	1
	7	2	1	2	2
	9	2	2	1	1
R3	9	1	2	1	2
	12	2	1	1	2
	10	1	2	2	2
	11	2	1	1	1
	11	2	2	2	1
	8	2	2	2	1
	10	2	1	2	2
	11	2	1	1	2
	10	2	2	1	1
	9	2	2	2	1
R4	8	2	2	2	1
	7	2	1	1	2
	8	1	2	2	1
	8	2	1	2	1
	11	2	2	1	2
	8	2	2	1	2
	9	2	1	2	2
	10	1	2	2	2
	10	2	1	1	2
	9	2	1	2	1

Nota: T0: 0,2 ml/500 ml de tiamina, 0,25 ml/500 ml de ácido nicotínico, 10 g/500 ml de azúcar, 0,05 g/500 ml de mioinositol, 1,0 g/500 ml de carbón activado, 6,0 g/500 ml de agar; T1: T0 + 12,5 g de piña Golden; T2: T0 + 25,0 g de piña Golden; T3: T0 + 12,5 g de cocona; T4: T0 + 25,0 g de cocona.

Anexo 2. Constancia de laboratorio que certifica la ejecución de tesis



Moyobamba, 24 de mayo de 2024

CONSTANCIA

CORPORACIÓN GyG E.I.R.L., identificada con número de RUC: 20494063558, otorga la presente constancia de ejecución de tesis de pre grado a favor de:

Bachiller. JUAN LUIS SANTA CRUZ PADILLA

Identificado con DNI: 732123359, quien realizó la tesis titulada "Uso de extractos orgánicos para la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación" en las instalaciones del laboratorio de cultivo in vitro de nuestra empresa situada en la ciudad de Moyobamba, bajo el asesoramiento de la Dra. Astrid Ruíz Ríos, durante el periodo de diciembre de 2021 a octubre de 2022, demostrando responsabilidad y ser una persona proactiva.

Se expide el presente documento a solicitud del interesado para los fines que estime pertinente.

Atentamente,



Ing. Astrid Damián Gutiérrez Ruiz
CORPORACIÓN GyG E.I.R.L.
TITULAR



Anexo 3. Panel fotográfico



Fotografía 1. Desinfección de semillas de *Cattleya rex* con tratamientos de hipoclorito de sodio (NaClO).



Fotografía 2. Jeringas con tratamientos de NaClO para aplicación del método de la jeringuilla para la desinfección de semillas de *Cattleya rex*.



Fotografía 3. Corte de jeringas para la extracción de semillas de *Cattleya rex* desinfectadas.



Fotografía 4. Cámara de flujo laminar debidamente preparada para el desarrollo adecuado de procesos.



Fotografía 5. Preparación de los medios de cultivo con extractos orgánicos de piña y cocona.



Fotografía 6. Medición de los niveles de pH en los medios de cultivo.



Fotografía 7. Autoclave para la esterilización de los medios de cultivo.



Fotografía 8. Proceso de esterilización de los medios de cultivo.



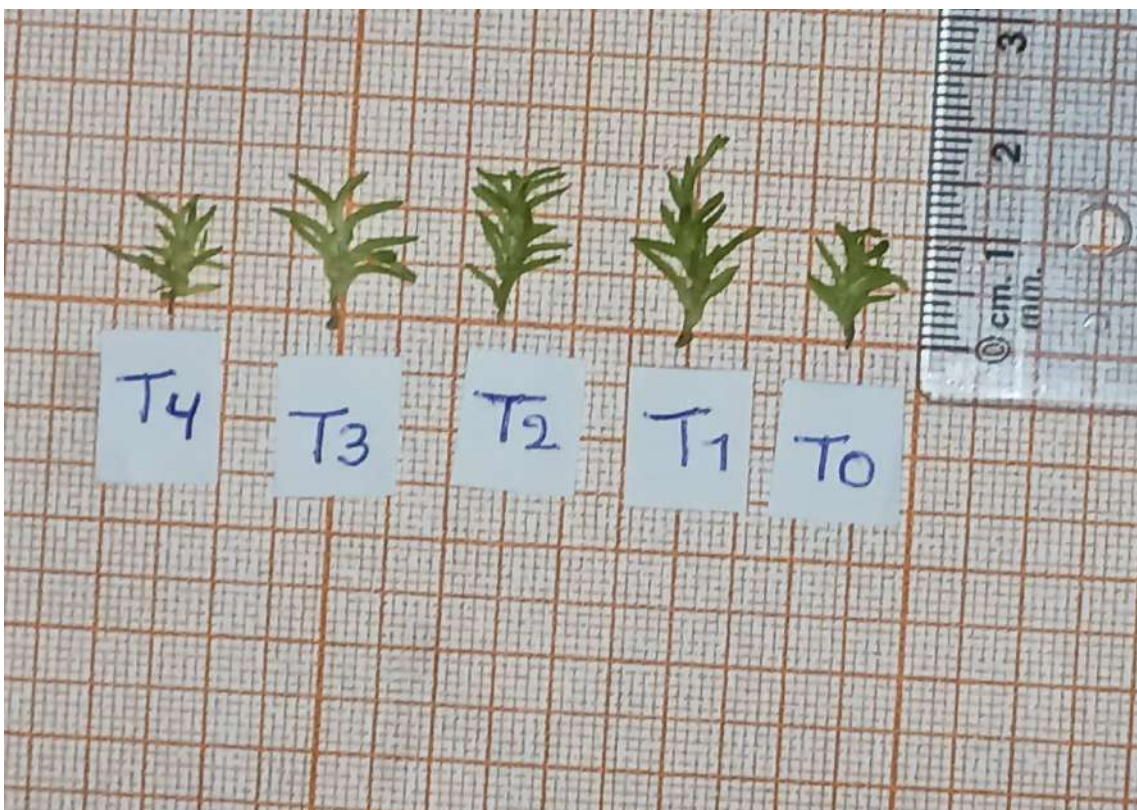
Fotografía 9. Siembra de semillas de semillas de *Cattleya rex* en los medios de cultivo con extractos de piña y cocona.



Fotografía 10. Siembra de protocormos de *Cattleya rex* en los medios de cultivo.



Fotografía 11. Frascos de vidrio con protocormos sembrados en medios de cultivo para evaluar el desarrollo de *Cattleya rex*.



Fotografía 12. Medición de la altura de plantas de *Cattleya rex* con medios de cultivo con extractos de piña y cocona.

Uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación

por Juan Luis Santa Cruz Padilla

Fecha de entrega: 11-sep-2024 09:45a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2306137098

Nombre del archivo: TESIS_-_Juan_Luis_Santa_Cruz-Empastar.docx (6.26M)

Total de palabras: 18506

Total de caracteres: 96669

Uso de extractos orgánicos en la micropropagación de la orquídea (*Cattleya rex*) con fines de conservación

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsm.edu.pe Fuente de Internet	5%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	revistas.unsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	tesis.unsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	Submitted to University of Glasgow Trabajo del estudiante	1%
7	repositorio.una.edu.ni Fuente de Internet	1%
8	rincondelaperza.blogspot.com Fuente de Internet	<1%
9	www.coursehero.com Fuente de Internet	