

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
PROPAGACIÓN DE LA ESPECIE *Cattleya rex* O'Brien
BAJO EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRONOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
GEYDEN DÍAZ MONTES**

**TARAPOTO – PERÚ
2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**

ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
PROPAGACIÓN DE LA ESPECIE *Cattleya rex* O'Brien
BAJO EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRONOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
GEYDEN DÍAZ MONTES**

Comité de Tesis

Dr. Winston Franz Ríos Ruíz
Presidente

Ing. Eybis José Flores García
Secretario

Ing. Jorge Luis Peláez Rivera
Miembro

Ing. M.Sc. Segundo D. Maldonado Vásquez
Asesor

DEDICATORIA

A mis padres TOMAS Y MILDEMI, por el apoyo y motivación incondicional en mi formación como persona y profesional.

ALBER, LLERAL, ARNOLD y MIREY, mis hermanos, por ser mis grandes amigos y compartir momentos juntos.

A mis queridos abuelos, LUSDINA y GENARO, TIOS, PRIMOS, que siempre me brindan su apoyo en todo momento.

Mis amigos, por su amistad sincera y que siempre estará presente.

AGRADECIMIENTO

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) por el financiamiento otorgado durante ejecución del proyecto de tesis.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSM – T, quienes contribuyeron en mi formación profesional.

Mi agradecimiento especial al equipo de trabajo de la empresa Corporación G y G E.I.R.L. por permitirme realizar el trabajo de tesis, generando conocimiento y experiencia profesional.

Edgar, Astriht, Antonio, Astrid Domy, Facundo Gabriel, por la amistad, confianza y apoyo generada durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A todas las personas que me brindaron sus conocimientos amistad, durante el tiempo de desarrollo de la tesis.

A todos ustedes, GRACIAS.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRAC	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVO.....	2
2.1 General.....	2
2.2 Específico	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1 Característica de la orquídea	3
3.1.1 Clasificación taxonómica	3
3.1.2 Género <i>Cattleya</i>	3
3.2 Cultivo <i>in vitro</i>	4
3.3 Agua de Coco.....	13
3.4 Fertilizante foliar	15
3.5 Sistema de Inmersión Temporal	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Ubicación del experimento	28
4.2 Metodología.....	28
4.2.1 Material Vegetal	28
4.2.2 Sistema de inmersión temporal (SIT).....	28
4.2.3 Descripción de los tratamientos.....	31
4.2.4 Preparación del medio de cultivo de los tratamientos	34
4.2.5 Diseño estadístico.....	36
4.2.6 Tamaño y características de los tratamientos.....	37

4.2.7	Variables evaluadas	37
V.	RESULTADOS	39
5.1	Coeficiente de multiplicación	39
5.1.1	Análisis de varianza del coeficiente de multiplicación.....	39
5.2	Número de raíces.....	41
5.2.1	Análisis de varianza del número de raíces	41
5.3	Porcentaje de mortandad.....	43
5.2.1	Análisis de varianza del porcentaje de mortandad	43
VI.	DISCUSIÓN	44
6.1	Coeficiente de multiplicación.....	44
6.2	Número de raíces.....	45
6.3	Porcentaje de mortandad.....	46
VII.	CONCLUSIÓN.....	49
VIII.	RECOMENDACIÓN	50
IX.	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar el medio de cultivo para la multiplicación de *Cattleya rex* O' Brien como alternativa para su propagación bajo en sistema de inmersión temporal. Se utilizaron plántulas establecidas previamente en medio M y S (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tiamina $0,1 \text{ mL}^{-1}$, ácido nicotínico $0,5 \text{ mL}^{-1}$, sacarosa 20 gL^{-1} y endospermo líquido de coco 200 mL^{-1} . El sistema de inmersión temporal estuvo compuesto por dos frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad, uno para el crecimiento de la plántula, y el otro como reservorio del medio de cultivo; estos frascos fueron conectados por una manguera de silicona y se colocaron filtros hidrófobos de $0,22 \mu\text{M}$. El medio de cultivo circulo de un frasco a otro por la apertura y cierre de dos electroválvulas de tres vías que estaban conectados a un temporizador. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. El T1, fue compuesto por M y S, y los tratamientos T2, T3 y T4, con diferentes concentraciones de fertilizante foliar 11- 8 - 6 ($6,8, 7,1$ y $7,4 \text{ mL}^{-1}$), complejo B ($2,5, 3,0$ y $3,5 \text{ mL}^{-1}$) y plátano seda ($35, 20$ y 45 gL^{-1}). Con un tiempo de inmersión de 14 minutos cada 4 horas, se logró como mejor tratamiento al T1 (MyS) en la multiplicación y calidad de brotes, con coeficiente de multiplicación de 1.27, promedio de raíces de 2,20 y un porcentaje de mortandad de 2%, siendo el medio más adecuado para la propagación in vitro de *Cattleya rex* O' Brien, bajo el Sistema de Inmersión Temporal.

Descriptores: Sistema de inmersión temporal, *Cattleya rex* O' Brien, Murashige y Skoog, 1962

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of determining the crop medium for the multiplication of *Cattleya rex* O'Brien as an alternative for low propagation in a temporary immersion system. Seedlings previously established in M and S medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with thiamine 0.1 mL^{-1} , 0.5 mL^{-1} nicotinic acid, 20 gL^{-1} sucrose and coconut liquid endosperm 200 mL^{-1} were used. The temporary immersion system consisted of two glass flasks of 1000 ml capacity, one for the growth of the seedling, and the other as a reservoir of the crop medium; these vials were connected by a silicone hose and hydrophobic filters of $0.22 \text{ }\mu\text{M}$ were placed. The crop medium circulated from one bottle to another by the opening and closing of two solenoid valves of three-way that were connected to a timer. A completely randomized design (DCA) was used, with four treatments and four replicates. The T1, was composed of M and S, and the treatments T2, T3 and T4, with different concentrations of foliar fertilizer 11-8-6 (6.8 , 7.1 and 7.4 mL^{-1}), complex B (2.5 , 3.0 and 3.5 mL^{-1}) and banana silk (35 , 20 and 45 gL^{-1}). With a time of immersion of 14 minutes every 4 hours, it was obtained as better treatment to T1 (MyS) in the multiplication and quality of shoots, with coefficient of multiplication of 1.27, average of roots of 2.20 and a percentage of mortality of 2%, Being the most appropriate medium for the in vitro propagation of *Cattleya rex* O'Brien, under the Temporary Immersion System.

Descriptors: Temporary immersion system, *Cattleya rex* O'Brien, Murashige and Skoog, 1962.

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURA

SIT : Sistema de Inmersión Temporal

M y S : Murashige and Skoog

DNA : Ácido desoxirribonucleico

ANA : Ácido 1-Naftalenacético

AC : Agua de Coco

FAO : Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura

IAEA : International Atomic Energy Agency

RITA : Recipiente de inmersión temporal automatizado

DC : *Cymbopogon citratus*

C.V. : Coeficiente de Variación

R^2 : Coeficiente de determinación

\bar{x} : Media

I. INTRODUCCIÓN

La micropropagación *in vitro* de las orquídeas en medios de cultivo semisólidos han contribuido a mejorar el porcentaje de germinación y el mejoramiento de las especies, adquiriendo características que les permitirían obtener una importancia hortícola y comercial (Castro *et al.*, 2002). Sin embargo, existen problemas de contaminación microbiana y el índice de multiplicación es bajo (Hamidah *et al.*, 1997).

La automatización de una o más etapas de los procesos de micropropagación es una opción para incrementar los volúmenes de producción (Aharoni, 2002). La técnica viable para la propagación de plantas ornamentales es la utilización del Sistema de Inmersión Temporal (SIT), por los efectos positivos en la multiplicación y calidad de la planta al aumentar el vigor del brote producido (Hamidah *et al.*, 1996).

Es posible hacer modificaciones en cada una de las etapas de un procedimiento de propagación *in vitro* para incrementar la eficiencia de este y la calidad de plantas, por lo que es conveniente evaluar el efecto de variar la concentración de los componentes de un medio de cultivo como las sales de Murashige y Skoog (1962), y otros medios de cultivos (Soto. *et al.*, 2006).

Es por esto importante determinar el medio de cultivo óptimo para la propagación de *Cattleya rex* O'Brien bajo el Sistema de Inmersión Temporal, permitiendo obtener plantas de mejor calidad y tasas de producción más elevadas.

II. OBJETIVO

2.1 General

- Determinar el medio de cultivo para la propagación de *Cattleya rex* O'Brien bajo el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) como alternativa para su propagación.

2.2 Especifico

- Determinar el coeficiente de multiplicación de *Cattleya rex* O'Brien propagadas a través del Sistema de Inmersión Temporal (SIT).
- Evaluar el número de raíces obtenidas a través de sistema de inmersión temporal (SIT).
- Determinar el porcentaje de mortandad de las plántulas de *Cattleya rex* O'Brien en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Característica de la orquídea

3.1.1 Clasificación taxonómica

Dresler (1993), clasifica a las orquídeas de la siguiente manera:

Reyno	: Plantae
Sub reino	: Embriófitos
Phylum	: Traqueofitas
Sub phylum	: Pterosidos
Clase	: Angiospermas
Sub clase	: Monocotiledoneas
Orden	: Microsperma
Sub orden	: Ginandras
Familia	: Orquídeas
Género	: <i>Cattleya</i>
Especie	: <i>rex</i>

3.1.2 Género *Cattleya*

Gutiérrez *et al.*, menciona que las *Cattleyas*, son las orquídeas más ampliamente comercializadas. Miles de híbridos han sido producidos cruzando *Cattleyas* con géneros aliados o próximos.

El género *Cattleya* requiere de una cantidad de luz de 70 a 80 %, y en algunos casos de luz solar directa, mientras otras orquídeas requieren menor intensidad luminosa generando quemaduras por exceso de luz causando

daños irreversibles en las hojas y estas pueden llegar a secarse. Las orquídeas de climas cálidos prefieren temperaturas mayores a 21 °C y los de clima intermedio toleran tanto temperaturas altas como bajas. El riego de las orquídeas debe hacerse por las mañanas para que las plantas tengan tiempo para secarse en el transcurso del día. Regar en las tardes o en las noches favorece la aparición de pudriciones y enfermedades causadas por hongos y bacterias (Gutiérrez *et al.*, 1996).

3.2 Cultivo *in vitro*

Después de Haberlandt, no fue sino hasta los años 30 que White en Estados Unidos y Gautheret en Francia, demostraron de forma definitiva la posibilidad de cultivar células vegetales *in vitro*. En ese tiempo hubo dos grandes descubrimientos que repercutieron de manera fundamental sobre el desarrollo de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales: primero, la identificación de las auxinas como reguladoras naturales del crecimiento vegetal, y segundo, el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas (Martín, 1980).

Es importante encontrar condiciones de cultivo no sólo para que las células crezcan y se dividan rápidamente sino también para que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés. En varios de los estudios sobre cultivos de células y tejidos vegetales esto se ha tratado de resolver variando los componentes de los medios de cultivo y las condiciones físicas y fisicoquímicas de los procesos, aprovechando las ventajas que ofrece la

rápida respuesta de las células *in vitro* ante pequeños cambios en su medio ambiente con respecto a las plantas crecidas por métodos tradicionales (Rhodes *et al.*, 1987).

Si los cultivos *in vitro* se incuban o someten a condiciones de estrés fisiológico, pueden expresar características de adaptación y resistencia que en condiciones naturales nunca manifestaron, creciendo selectivamente solo aquellas células capaces de adaptarse a sus nuevas condiciones. Esta variación genética también se puede inducir por técnicas de mutación, ingeniería genética, fusión de protoplastos y transformación genética por inclusión de DNA foráneo de manera similar a las aplicadas comúnmente en microorganismos. En este último caso se obtienen cultivos o plantas transgénicas en donde el DNA foráneo debe integrarse al genoma vegetal para garantizar una expresión estable en su progenie (Crozier *et al.*, 2000).

La micropropagación es el proceso que utiliza técnicas de cultivo *in vitro*, en las que se selecciona un explante, se desinfecta, se aísla en un recipiente estéril y, artificialmente, se le otorga condiciones para que las células manifiesten su totipotencialidad (capacidad de regenerar una planta completa a partir de una parte de la planta madre, que conserva todas sus características genéticas) (Yeoma *et al.*, 1980).

La técnica de micropropagación se usa como mecanismo para multiplicar plantas desde partes de ellas, que otros sistemas de propagación no son capaces de utilizar. Además proporciona beneficios adicionales como en el

aspecto sanitario (plantas libres de virus u otros agentes) (Rhodes *et al.*, 1987).

Medio de cultivo

a) Azúcar

El azúcar es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo, y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis e incluso en oscuridad. Los tejidos verdes no son suficientemente autótrofos *in vitro* (Pierick, 1990).

La concentración del azúcar depende mucho del tipo y edad del material vegetal. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumenta con la concentración de azúcar, hasta que alcanza el óptimo, disminuyendo después para altas concentraciones. El crecimiento de plantas completas, como es el caso de las plántulas de orquídeas, es también influenciado por la concentración de azúcar (Pierick, 1990).

La sacarosa que se venden en los supermercados resulta por lo generalmente muy adecuada. Se trata de un producto purificado, y de acuerdo con los análisis de los fabricantes se compone de 99.94 % de sacarosa, 0,02 % de agua y 0,04 % de otras sustancias (elementos inorgánicos, rafinosa, fructuosa y glucosa). No existe ninguna indicación de que estos últimos constituyentes pueden causar toxicidad *in vitro* (Pierick, 1990).

b) Nutrición mineral

Pierick, (1990) menciona que los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas en el cultivo *in vitro*.

Cuando se elige una mezcla de macro y micro sales, se debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- La concentración total puede ser un factor importante, como por ejemplo la solución Knop, es pobre en sales, mientras el Murashige y Skoog (1962), constituye un medio alto en sales.
- Aunque el nitrógeno se suministra a veces en forma orgánica, lo normal es añadirlo en forma de iones de nitrato y amonio. Es necesario encontrar la mejor proporción de nitrato y amonio, para conseguir un crecimiento de desarrollo óptimo *in vitro*.
- Si la planta absorbe iones de amonio, el pH disminuye, y el agar puede licuarse. Como resultado el pH más bajo disminuye la absorción de iones de amonio absorbiéndose entonces iones de nitrato.

c) pH

Es una medición de la actividad del ion de hidrogeno en solución y estableciendo la acidez o alcalinidad de la misma y se define como el logaritmo negativo de la actividad del ion hidrogeno. Valores entre 0 y 7

señalan soluciones ácidas y serán alcalinas cuando los valores sean entre 7 y 14. El pH neutro es el contenido con agua pura, sin la disolución de CO₂ (Pierick, 1990).

Según (Pierick, 1990), menciona la importancia del pH radica en evitar el rompimiento de las funciones de la membrana celular o la alteración del pH del citoplasma. No obstante, también actúa en otras funciones fisiológicas en límites que no dañe la actividad celular como son:

- Afecta la gelificación del agar en el medio (solidificación)
- Controla la cantidad de sales que se encuentran en forma soluble.

d) Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, similar a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo (Erston, 1933).

Las investigaciones sobre el cultivo de tejidos proporcionaron más información sobre la necesidad de Vitaminas en las plantas. Los intentos de cultivar puntas de raíces cortadas fracasaban si el medio de cultivo *in vitro* solo contenía azúcar y minerales necesarios. La solución de cultivo se completaba añadiendo extracto de levadura. La Vitamina B1 sustituye al extracto de levadura, por ser esencial para el desarrollo de raíces cortadas; otros investigadores indican que la Niacina (B12) y la Piridoxina

(B6) son también esenciales para el crecimiento de las raíces cortadas (Erston, 1933).

Las Vitaminas se clasifican, generalmente, según sean solubles en grasas y solubles en agua. En el cultivo *in vitro* se orienta a las clasificadas en el segundo grupo, así tenemos que son solubles en agua la Vitamina C (Ácido Ascórbico) y las del Complejo B que son, entre otras, Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Piridoxina (B6), Cobalamina (B12), Biotina, Ácido Fólico, etc. A la fecha, solo las Vitaminas solubles en agua han demostrado ser esenciales para las plantas (Erston, 1933).

Las Vitaminas que obran como reguladores esenciales en las plantas superiores son la Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Piridoxina (B6), Niacina y el Ácido Ascórbico (Vitamina C). En condiciones normales, es decir, en la planta completa, la Tiamina (B1) se sintetiza en las hojas y se traslada a las raíces. En solución de cultivo, se acelera el crecimiento de las raíces añadiéndoles Biotina y Tiamina (B1); sin embargo, hoy se sabe que la Biotina se sintetiza en las raíces. Las Auxinas y las sustancias de actividad similar estimulan la formación de órganos, mientras que las Vitaminas Tiamina (B1), Biotina, etc., participan en la nutrición y la asimilación, aumentando la cantidad de protoplasma, pero no afectan a la estructura de la planta (Erston, 1933).

Durante el ciclo vital normal de las plantas verdes, la Tiamina (B1) se sintetiza en las hojas y se almacena en los cotiledones de la semilla. Los

análisis indican que los granos de polen son ricos en Tiamina (B1) o en sus componentes. La Riboflavina (B2) es el compuesto más activo del polen, también el Ácido Ascórbico (Vitamina C) ejerce una notable actividad en la aceleración de la germinación del polen (Erston, 1933).

La Tiamina (B1), es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Por eso, sin esta Vitamina las células vivas no pueden realizar sus funciones vitales (Erston, 1933).

La Riboflavina (B2), es necesaria para el crecimiento de las raíces y funciona reduciendo la cantidad de Auxina del sistema radicular. Una gran cantidad de Auxina inhibe el crecimiento de la raíz (Erston, 1933).

La Niacina (B12), desempeña un papel importante en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, que son grupos portadores de Hidrogeno en la fase respiratoria de deshidrogenación (Erston, 1933).

El Ácido Ascórbico (Vitamina C), interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de oxidación reducción. Se emplean cristales de Ácido Ascórbico (Vitamina C) para reducir los taninos oxidados *in vitro* o en la superficie de frutos recién cortados (Erston, 1933).

e) Reguladores de crecimiento

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. A parte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denominan reguladores, y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determina el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Pierick, 1990).

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores, especialmente las auxinas y citoquinas, juegan un papel muy importante (Pierick, 1990).

Las auxinas generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración de auxina predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se producen raíces, y tiene lugar, en cambio formación de callo (Pierick, 1990).

Las citoquinas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo; generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas (1 - 10 mg l⁻¹) pueden inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Las citoquinas promueven la formación de vástagos axilares por que disminuye la dominancia apical, también retarde el envejecimiento (Pierick, 1990).

Este grupo de compuestos no se utiliza generalmente en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores. En general las giberalinas inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*. También puede romper la dormición de embriones aislados o yemas. Las giberalinas generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios (Pierick, 1990).

f) Compuestos orgánicos

Una de las variantes dentro del cultivo *in vitro* es la adición de compuestos orgánicos al medio de cultivo basal (Pierick, 1990). Entre los más utilizados en la micropropagación de orquídeas destacan la pulpa de plátano y el agua de coco debido al alto contenido de azúcares, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento que contienen (Arditti, 1993).

Otro factor importante observado con la adición de compuestos orgánicos es el aumento porcentual de la sobrevivencia *ex vitro*, una de las etapas más difíciles después del cultivo *in vitro*. De igual forma Shina y Roy (2004), obtuvieron los mayores tamaños de brotes de *Vanda teres* al agregar 10 % de agua de coco y 10 % de pulpa de plátano al medio.

3.3 Agua de Coco

Kitsaki *et al.*, 2004, informaron que el medio de cultivo suplementado con agua de coco, resultó más eficaz para la germinación y formación de protocormos, a diferencia del medio de cultivo suplementado con jugo de piña, que resultó mejor para el desarrollo de *Ophrys* sp. (Orchidaceae).

Nongrum *et al.*, (2007) y Abbas *et al.*, (2011), encontraron que la adición del agua de coco al medio de cultivo tuvo un efecto benéfico en la germinación y formación de plántulas de *Coelogyne ovalis* y *Grammatophyllum scriptum* respectivamente.

Por lo tanto, se puede inferir que la adición adecuada de componentes orgánicos, como agua de coco y jugo de piña al medio de cultivo MS *in vitro*, es un elemento importante para la germinación y desarrollo de plántulas, debido a que son ricos en energía y contienen iones inorgánicos, aminoácidos, vitaminas, reguladores de crecimiento y ácidos orgánicos necesarias para el desarrollo de las semillas de orquídeas (Abbas *et al.*, 2011).

En especies como en *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum* (Rodríguez, 2000) y *Stanhopea tigrina*, (Moreno y Menchaca 2007) las mayores tasas de crecimiento se observaron en los tratamientos suplementados con agua de coco y pulpa de plátano.

Lo *et al.*, (2004), realizaron el trasplante de cuerpos protocórmicos al medio MS (1962), suplementado con agua de coco, observaron que el efecto del agua de coco en estas estructuras fue bastante benéfico, promoviendo el crecimiento de hojas y el número de raíces en un 97 %.

En estudios realizados por Huang *et al.*, (2001), determinaron que la adición de agua de coco al medio de cultivo, estimuló tanto la formación de raíces como el de brotes después de 45 días de cultivo, y que la presencia de ANA no presentó ningún efecto benéfico para la formación de brotes; sin embargo, estimuló el crecimiento de raíces.

Kishor *et al.*, (2006), comprobaron la efectividad de suplementar el medio de cultivo con agua de coco. Peixe *et al.*, (2007), explican que la razón por la cual el agua de coco es exitosa cuando actúa como suplemento de medios de cultivo, es porque posee en su composición zeatina (sustancia de crecimiento). Como es conocido, el AC es una sustancia muy compleja que posee una amplia variedad de componentes orgánicos e inorgánicos, entre los cuales citamos aminoácidos esenciales, diversos compuestos nitrogenados, hormonas, enzimas, purinas y pirimidinas, así como sales minerales y alto contenido de fósforo y magnesio (Krikorian, 1991).

Los resultados obtenidos en investigaciones que se presenta, con aplicación de AC, fueron similares a los obtenidos sobre morfogénesis en explantes juveniles y adultos de varias plantas leñosas como *Kalopanax septemlobus* (Moon *et al.*, 2008), *Cedrela odorata* (Peña-Ramírez *et al.*, 2010), entre otras, lo que se atribuye a la presencia de una mezcla compleja de varias citocininas, entre otras sustancias presentes en el AC, que resultaría químicamente irreproducible.

3.4 Fertilizante foliar

En otros casos se utilizó el fertilizante foliar 7-6-19 en el enraizamiento de meristemas de *Cattleya* sp. (Gutiérrez 1996), el fertilizante 20-10-20 en el cultivo de semillas de *Arabidopsis thaliana* (Pollock y Oppenheimer 1999), los fertilizantes Peters (24-8-16), Floren (10-15-5) y Folifétil (20-30-10) en la micropropagación de *Laelia anceps* (Romero *et al.* 2007) y varios abonos foliares comerciales en la micropropagación de nudos de *Solanum tuberosum* (Azofeifa *et al.*, 2008). En otros trabajos, Pollock y Oppenheimer (1999) no encontraron diferencias en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* al cultivarlas en medio de cultivo suplementado con el fertilizante comercial 20-10-20, comparado con lo observado en el medio de cultivo MS y un caso similar también fue reportado por Azofeifa *et al.*, (2008) al utilizar las formulaciones denominadas AMSF y AMSF+Intra, conformadas por combinaciones de sales minerales y fertilizantes comerciales, en la propagación *in vitro* de plantas de papa cv. Atzimba tal como se observó en híbridos de *Eucalyptus* (Gribble *et al.*, 2002).

Por otro lado, los fertilizantes inorgánicos que se adicionan como complementos a las sales minerales MS o a cualquier otra formulación de sales minerales convencionales, siempre incorporan impurezas o trazas de otros elementos, como cloruros y sodio, que no se consideran en los cálculos o que están contenidos en la formulación del producto comercial y que es imposible obviarlos, pero que pueden influir significativamente en la nutrición, metabolismo y fisiología de los explantes (Taiz y Zieger 2006 y Roussos *et al.* 2007).

Un caso similar se observó en la propagación *in vitro* de plántulas de *Laelia anceps* donde la mayor formación y longitud de raíces ocurrió en los complejos fertilizantes Peters 25 % (24-8-16) y Floren 25 % (10-15-5), utilizados como sustitutos de las sales minerales MS, sin reguladores de crecimiento (Romero y Tirado *et al.*, 2007).

3.5 Sistema de Inmersión Temporal

En los últimos años, en el cultivo *in vitro* ha presentado un desarrollo exponencial. No obstante la manifestación del uso de este sistema y su implementación a gran escala se ha visto limitados por factores como: mutaciones en las plantas propagadas, pérdidas de material por contaminación interna o externa, vitrificación y oxidación fenólicas (Pierik, 1998).

La tasa a la cual los cultivos *in vitro* crecen y producen yemas durante la micropropagación pueden estar influidas por la naturaleza física del medio.

Según esta característica, existen tres tipos de medios en los que se puede realizar un cultivo *in vitro*: semisólido, líquido y en sistemas de inmersión temporal (George, 1993).

Cultivo en medio semisólido: Son aquellos a los cuales se les ha otorgado un agente gelificante y son ampliamente usados en el establecimiento de explantes (George, 1993). El agar es el agente solidificante más utilizado. El explante se mantiene estático sobre el medio, con sólo uno de sus extremos en contacto por donde se realiza la absorción de nutrientes (Lorenzo *et al.*, 1998).

Cultivo en medio Líquido: La utilización de este sistema da como resultado mayores tasas de crecimiento que en medios semisólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio y las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, lo que facilita la absorción de nutrientes (George, 1993). Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos provoca síntomas de estrés por oxidación y vitrificación (Damiano *et al.*, 2003).

Los problemas que presentan los medios Líquidos pueden ser superados por métodos alternativos, como los biorreactores, cuyo principio básico es la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente (Damiano *et al.*, 2003).

3.6 Biorreactores

Los biorreactores son aparatos diseñados para el cultivo a gran escala de células, tejidos u órganos en medio líquido. Para un creciente número de especies, estos han mostrado ventajas sobre la micropropagación en medio semisólido, resultando en mayores tasas de multiplicación, reducción de espacio, energía y mano de obra. Por otro lado el continuo movimiento de los explantes promueve una menor expresión de la dominancia apical, generando la inducción y proliferación de numerosas yemas axilares (FAO/IAEA, 2004).

El control de la morfogénesis y el crecimiento de la biomasa en biorreactores requieren de la manipulación de las condiciones de cultivo, tales como, la atmósfera, la relación oxígeno y dióxido de carbono, pH, minerales, carbohidratos y reguladores de crecimiento (Heyerdahl *et al.*, 1995). Además, el control de la fase gaseosa en los biorreactores depende del flujo de gas y pueden ser fácilmente manipulados para satisfacer los requerimientos de oxígeno y dióxido de carbono. Las columnas de burbujas en los biorreactores son utilizados tanto para la oxigenación como para la agitación de los explantes (Scragg, 1992; Doran, 1993).

Aireación y control de gases en biorreactores

La aireación del cultivo asegura la oxigenación del medio y la agitación de las plantas, con lo cual se evita la sedimentación de la biomasa. Una excesiva agitación puede ocasionar daños en el cultivo y, en el caso de cultivos celulares, la formación de espuma en la parte superior del biorreactor (Scragg, 1992).

Como la biomasa aumenta y el cultivo se vuelve viscoso, se requieren mayores tasas de aireación para asegurar su oxigenación y agitación. La viscosidad y espuma del medio; aunque no son un problema grave como en el caso de cultivos de células vegetales. Pueden disminuirse con el uso de la mitad de la concentración de minerales del medio MS y bajando los niveles de calcio del mismo (Takayma *et al.*, 1991; Ziv, 1991).

Los niveles de oxígeno en los cultivos líquidos dependen de la presencia de este gas en las burbujas que circulan a través del biorreactor y de las condiciones que favorecen la transferencia de oxígeno de ellas a la biomasa (Cazzulino *et al.*, 1991). El flujo de aire que circula por el biorreactor y el tamaño de las burbujas son las dos herramientas que controla el coeficiente de transferencia de oxígeno y el estrés mecánico de la agitación (Takayma y Akita, 1998).

Trabajos previos muestran el efecto beneficioso del enriquecimiento con dióxido de carbono en medios de cultivo en el crecimiento de las plantas en la fase de aclimatación *ex vitro* (Kozai *et al.*, 1992). Por otro lado se han podido ver efectos de reducción del crecimiento por excesiva oxigenación y remoción de dióxido de carbono y otros gases volátiles (Hegarty *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1991).

Además las plantas cultivadas en biorreactores, la tasa de aireación puede afectar los niveles de etileno. Altas tasas de aireación pueden causar

un “lavado” de gases necesarios para el crecimiento de las plantas (Llan *et al.*, 1995).

Características de los medios líquidos de los biorreactores

Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) o sus modificaciones, son tomados como base para el cultivo con medios líquidos. El consumo de nutrientes depende del tamaño y tipo de plantas a desarrollar y de condiciones de cultivo tales como, pH, temperatura, aireación, concentración de minerales, volumen y viscosidad del medio (Williams, 1992; Debergh *et al.*, 1992).

Las plantas cultivadas en medios líquidos tiene una mayor exposición a los componentes de ese medio y su consumo es más rápido. En biorreactores con condensadores o humidificantes de aires utilizados para prevenir la deshidratación, los niveles de nutrientes en el medio dependen de la tasa de absorción de la planta (Archambault *et al.*, 1994).

En cuanto al pH, los medios de cultivo tienen un pH inicial en el orden de 5.5 y 5.9, en el cual durante la esterilización del medio y el crecimiento de las plantas disminuye a 4 y 4.5, lo cual está relacionado al consumo de amonio. Generalmente el pH vuelve a aumentar luego gracias al consumo de nitrato (Stuar *et al.*, 1987).

El uso de reguladores de crecimiento en sistema de cultivo con medios líquidos es más eficiente que en el caso de medios con agar debido al contacto directo entre plantas y el medio (Ammirato y Styer, 1985).

Ventajas y desventajas del uso de biorreactores

Las ventajas del uso de biorreactores incluyen un incremento en la tasa de multiplicación, rápido crecimiento de las plantas, reducción en los costos del medio de cultivo, reducción en el gasto de energía, en el uso de mano de obra y en el uso de espacio (Levin *et al.*, 1997).

La eliminación de agentes gelificantes reduce el costo de los medios de cultivo y la filtración de los mismos elimina la necesidad de autoclavado. Por otra parte la densidad de cultivo en medios líquidos es mucho mayor. La reducción en espacio conlleva a una disminución en los requerimientos de energía para la iluminación y refrigeración, lo cual en forma conjunta a la disminución de mano de obra hacen que los costos de operación sean menores (Levin *et al.*, 1997).

Las ventajas de esta tecnología se relacionan a problemas asociados a la contaminación y la hiperhidricidad (Leifert y Waites, 1990).

Modelo de biorreactores

Varios diseños de biorreactores han sido desarrollados para un amplio rango de cultivos. Básicamente pueden dividirse en dos tipos, aquellos en que las

plantas están inmersas parcialmente en el medio de cultivo y aquellos en que están inmersas permanentemente (Takayma, 1991).

Biorreactores de inmersión temporal

Este diseño es el más adecuado para el caso de materiales sensibles a la hiperhidricidad (Ziv, 1991). Existen tres tipos de biorreactores de inmersión parcial, los de fase gaseosa, los de capa líquida y los de inmersión temporal.

En los biorreactores de fase gaseosa, las plantas se sostienen de un soporte poroso y son asperjados intermitentemente con el medio de cultivo (Ushiyama, 1988) o expuestos a una neblina de nutrientes (Weathers *et al.*, 1988). El exceso de medio es recolectado y recirculado. Este tipo de reactores otorga un buen crecimiento y desarrollo de varios tipos de tejidos aunque los sistemas de generación de la aspersion son difíciles de mantener. En los biorreactores de capa líquida, las plantas están sujetas a una superficie que flota sobre el medio líquido del cual absorben nutrientes. En este caso solo la base del cultivo está en contacto con el medio. Un ejemplo de este sistema es el denominado Life Realt (Osmotek, 2002; Takayma, 1991).

Los biorreactores de inmersión temporal se caracterizan por poner al cultivo en contacto con el medio durante una duración e intervalos determinados. Debido a su construcción y operación simple, significa una alternativa de bajos costos. Un típico diseño de estos biorreactores consta de dos contenedores de plástico o vidrio donde uno contienen el medio líquido y el otro del cultivo a propagar (Adelberg y Simpson, 2002). Dentro de los

biorreactores de inmersión temporal se destaca el sistema RITA, el cual está compuesto por dos compartimientos, uno superior donde se encuentra las plantas y uno inferior donde se deposita el medio de cultivo. Al inyectar aire con una bomba al compartimiento inferior el medio de cultivo es impulsado hacia el que contiene las plantas, quedando inmersa en el medio líquido el tiempo que dure la inyección de aire (Etienne y Berthouly, 2002).

Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

Una unidad de inmersión temporal utilizada normalmente consiste en dos recipientes intercomunicados por tubos de silicona. Uno se usa para la mantención del medio y el otro para el cultivo de los explantes. Para la ventilación se ajustan un filtro esterilizable en cada recipiente. El número de veces (frecuencia) y el tiempo que las plantas son inmersas en el medio, se regulan mediante un programador conectados a válvulas selenoides. Al abrir una de las válvulas el medio es inyectado desde el recipiente de mantención al del cultivo; al abrirla otra vez, el medio vuelve solo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes por cada superficie (Alvard *et al.*, 1993).

El intercambio gaseoso se resulta cuando el medio de cultivo es trasladado al recipiente de mantención. El traslado del medio líquido al otro recipiente se produce mediante el aumento de la presión de aire interna, así, el medio se moviliza hacia el contenedor de menor potencial de presión. Este mecanismo se realiza en ambos contenedores, alternadamente (Alvard *et al.*, 1993).

(Alvard *et al.*, 1993), menciona que este sistema presenta importantes diferencias respecto del método convencional:

- Al trabajar en medios líquidos temporales se puede mantener una gran cantidad de plántulas en un mismo volumen.
- El contacto intermitente del medio con los explantes reduce el nivel de toxinas presentes, ya que se mantienen limpias de sus propios exudados que pueden ser perjudiciales para su crecimiento.
- En el mecanismo permite renovar y/o modificar la atmosfera interna de los contenedores y eventualmente, controlar ciertos aspectos de su desarrollo (preaclimatación).

Las ventajas de mantener un cultivo en un SIT incluyen tres aspectos: un mayor contacto entre la biomasa vegetal y medio, la inexistencia de restricciones en el intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio, así como la de la atmosfera dentro del biorreactor (Ziv, 1991).

Estas características se reflejan en mayores tasas de multiplicación y en un mejor desarrollo de los explantes; por ejemplo, en estudios realizados con frutilla Don y manzana Gala se observó un aumento de 85 y 131 % en la tasa de multiplicación, respectivamente (Damiano *et al.*, 2003).

Para el funcionamiento efectivo de un SIT deben existir condiciones óptimas de cultivo; además de factores ambientales como intensidad lumínica y temperatura, se debe considerar: frecuencia y tiempo de inmersión, densidad del cultivo, volumen del medio y composición, y duración del cultivo (Ackermann *et al.*, 2003).

Estos factores se deben determinar para cada especie y etapa de desarrollo. Las mayores diferencias entre el cultivo *in vitro* convencional y el SIT en biorreactores se producen en la etapa de multiplicación: el medio nutritivo que se utiliza el SIT es líquido en vez de sólido (agar), el contacto del medio con el tejido se realiza de manera intermitente (temporal) y no permanente, y se utiliza un mayor número de explantes en cada contenedor. Este método muestra un impacto importante en los métodos tradicionales de micropropagación, ya que se ha logrado una mayor tasa de multiplicación y aclimatación, así como mayores niveles de supervivencia en condiciones de campo (Ackermann *et al.*, 2003).

Es muy importante establecer el tiempo de inmersión en la multiplicación en SIT, ya que este determina la absorción de nutrientes por los brotes y el control de la hiperhidricidad (Berthouly and Etienne, 2002).

Escalona, (2006) y Berthouly and Etienne, (2002), menciona que el prolongado tiempo prolongado de inmersión de 21 minutos provocó deficiencias de oxígeno en los tejidos de los brotes de yemas axilares, lo cual pudo haber sido uno de las causas en las diferencias en la multiplicación y

señalaron la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las fases de cultivo de la micropropagación.

Basail, (2003) obtuvo un mejor resultado para la variable de coeficiente de multiplicación (9,10) cuando utilizó los minutos de inmersión de los explantes en medio de cultivo, en el cultivar híbrido de plátano vianda "FHIA21" (AAAB).

Frecuencia de inmersión:

Dottin, (2000), en la multiplicación del clon "México 8" *Xanthosoma sagittifolium* (L), al emplear una frecuencia de inmersión cada 4 horas, logró también un desarrollo de los brotes de yemas axilares e incremento del coeficiente de multiplicación a 14,50 en frascos de cultivo Clerboys (Nalgene, USA) de 10 L de capacidad.

El tiempo y la frecuencia de inmersión influyeron en la eficacia del empleo del sistema para la multiplicación de brotes de yemas axilares. A través del control de estos parámetros se reguló la absorción de los nutrientes y la hiperhidricidad de los materiales cultivados. En el cultivo de caña santa *Cymbopogon citratus* (D.C) Staff obtuvieron mejores resultados para el peso fresco y coeficiente de multiplicación al utilizar 6 inmersiones por día (cada 4 horas) en SIT en un litro de capacidad Quiala *et al.*, (2006).

Los intervalos de tiempo de inmersión juegan un papel decisivo en los coeficientes de multiplicación (Berthouly y Etienne, 2002). La duración o frecuencia de inmersión es el parámetro más importante para la eficiencia del

sistema y la inmersión también mejora la calidad del material vegetal produce un incremento en el vigor del brote o en el desarrollo de la planta y reduce la hiperhidricidad (Ziv, 2002).

Lorenzo *et al.*, (1998), observaron un incremento en el crecimiento y la multiplicación de brotes de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), desde 8,3 hasta 23,9, en 30 días de cultivo, cuando aumentaron el volumen de medio de cultivo de 5,0 ml a 50 ml por brotes del SIT.

Escalona, (2006) determinó que para el crecimiento y multiplicación de brotes de piña (*Ananas comosus* L. Merr), es necesario 200 ml de medio de cultivo por brote, además comprobó que los volúmenes de medios de cultivo superiores a 200 ml por brote limitan el coeficiente tenerse en cuenta de multiplicación, además demostró que los periodos prolongados promueven la deformación de los brotes y, por lo tanto, afectan al número de brotes que se pueda obtener.

En este simple sistema el aire esterilizado por filtración es forzado hacia el interior del contenedor por su base, generando aireación y agitación del medio (Merchuk, 1990). Estos biorreactores, también llamados biorreactores tipo airlift o biorreactores de columna de burbujas, son simples de operar y resultan una propuesta económica para la micropropagación de plantas (Levin *et al.*, 1997).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el Laboratorio de cultivos de tejidos vegetales de la Corporación G y G E.I.R.L; ubicado en el departamento de San Martín, provincia de Moyobamba, financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) dentro del Ministerio de la Producción.

4.2 Metodología

4.2.1 Material Vegetal

Se utilizó plántulas de *Cattleya rex* O'Brien establecidos en medio de cultivo M&S (Murashige and skoog, 1962) suplementado con tiamina $0,4 \text{ mgL}^{-1}$, Ácido nicotínico $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, sacarosa 20 gL^{-1} y endospermo líquido de coco 200 mL^{-1} ; ajustado a un pH de 5,1 – 5,4.

4.2.2 Sistema de inmersión temporal (SIT)

El SIT, estuvo compuesto por dos frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad, uno para el crecimiento de las plántulas y el otro como reservorio del medio de cultivo.

Estos frascos se conectaron entre sí por una manguera de silicona (1/2" externo y 1/4" interno). Se colocaron filtros hidrófobos de $0.22 \text{ }\mu\text{M}$.

La presión del aire fue generada por un compresor de aire con encendido automático y regulada por un manómetro.

El medio de cultivo circuló de un frasco a otro con la apertura y cierre de dos electroválvulas de tres vías, que estaban conectadas a un temporizador programable que determinaba la frecuencia y tiempo de inmersión.

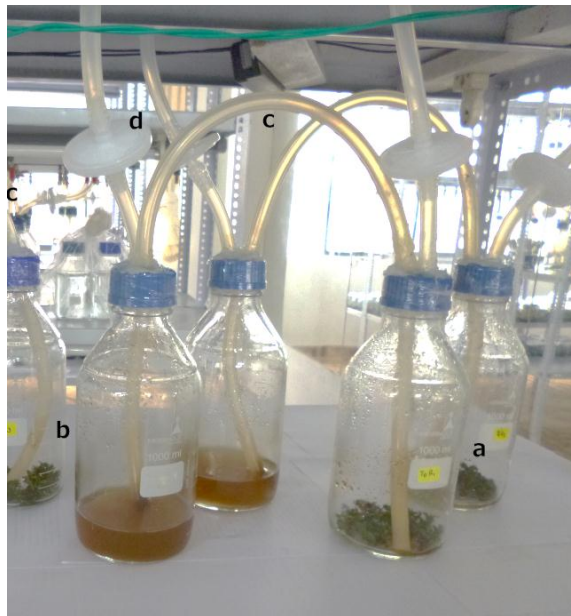


Figura 1: Descripción del sistema de inmersión temporal

Fuente: Elaboración propia, 2014.

Nota: En la figura 1 se observa la descripción del sistema de inmersión donde a: Frasco de crecimiento, b: Frasco de reservorio; c: Manguera de silicona (1/2" externo y 1/4" interno) y d: Filtros hidrófobos (0.22 μ M).

Esterilización del SIT

Los frascos para el crecimiento de las plántulas se taparon con papel aluminio, luego se cubrieron con papel reciclado y se ataron con hilo pabilo; se esterilizó en la autoclave por 30 minutos a 121°C.



Figura 2: Frascos con papel aluminio.

Fuente: Elaboración propia, 2014

El sistema de filtros con la manguera de silicona se colocó papel aluminio en los extremos de la manguera y se envolvió con papel reciclado; se esterilizó en la autoclave 10 minutos a una temperatura de 121°C.

4.2.3 Descripción de los tratamientos

a) Composición del tratamiento T1

Los componentes y las cantidades del tratamiento T1 corresponden al medio M y S (Murashige and skoog, 1962), los insumos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Componentes y cantidades del T1

Reactivos	Fórmula química	Unidad	Cantidad / litro
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	mg	1650,00
Nitrato de potasio	KNO_3	mg	1900,00
Agente quelante	$\text{Na-EDTA}_2\text{H}_2\text{O}$	mg	37,30
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	mg	27,80
Cloruro de calcio di hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg	400,00
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	mg	170,00
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg	0,25
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	mg	0,025
Ácido Bórico	H_3BO_3	mg	6,20
Yoduro potasio	KI	mg	0,83
Sulfato de Manganeso monobásico	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	mg	16,00
Sulfato de Magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	mg	370,00
Sulfato de Zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	mg	8,60
Sulfato de Cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	mg	0,001
Tiamina – HCl	-----	mg	0,40
Ácido nicotínico	-----	mg	0,50
Sacarosa	-----	g	20,00
Endosperma líquida de coco	-----	ml	100,00
pH	-----	-----	5.1 – 5.4

Nota: Fuente León, 1995.

b) Composición del tratamiento T2

Los insumos y las cantidades del tratamiento T2 se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Componentes y cantidades del tratamiento T2

Insumos	Unidad	Cantidad / litro
Fertilizante foliar 11-8-6	ml	6,80
Complejo B	ml	2,50
Plátano seda	g	35
Sacarosa	g	20
Endosperma líquido de coco	ml	100
pH	-----	5,1– 5,4

c) Composición del tratamiento T3

Los componentes y las cantidades del tratamiento T3 corresponden al medio formulado por Padilla (2008), los insumos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Composición del tratamiento T3

Insumos	Unidad	Cantidad / litro
Fertilizante foliar 11-8-6	ml	7,10
Complejo B	ml	3,0
Plátano seda	g	20
Sacarosa	g	20
Endosperma líquido de coco	ml	100
pH	-----	5,1 – 5,4

Fuente: Padilla, 2008

d) Composición del tratamiento T4

Los insumos y las cantidades del tratamiento T4 se describen en la tabla 4.

Tabla 4: Componentes y cantidades del tratamiento T4

Insumos	Unidad	Cantidad / litro
Fertilizante foliar 11-8-6	l	7,40
Complejo B	ml	3,50
Plátano seda	g	45
Sacarosa	g	20
Endosperma líquido de coco	ml	100
pH	-----	5,1 – 5,4

4.2.4 Preparación del medio de cultivo de los tratamientos

- En un vaso precipitado se colocó 500 ml de agua destilada.
- Se pesaron los componentes sólidos (sacarosa y plátano seda).
- Para el tratamiento T1, se agregó las cantidades de las sales minerales especificadas por Murashige and skoog, 1962, modificado por León (1995), que están especificadas en la tabla 3, contenidos en sotocks A, B, C, D, E, F y G.
- Para los tratamientos T2, T3, T4, no se utilizó las soluciones stocks; por lo contrario se utilizó para cada uno de los tratamientos insumos que se describen en las tablas 2, 3 y 4; en diferentes concentraciones. La característica del plátano seda que se utilizó en la preparación del medio de cultivo de los tratamientos T2, T3 y T4 tuvieron las características, como se muestra en la figura 3.



Figura 3: Características del plátano seda

Fuente: Elaboración propia, 2015.

- Luego adicionamos los componentes sólidos por separado a cada solución de medios de cultivo que se establecieron anteriormente según su formulación requerida para cada caso.
- Después de aplicar todo los componentes enrazamos a 2000 ml.
- A cada medio de cultivo establecido se ajustó el pH de 5,1 – 5,4.
- El medio se distribuyó en los frascos, colocando 500 ml de medio de cultivo por frasco, obteniendo 4 frascos por cada tratamiento.
- Los frascos con los medios de cultivo, se pasó a esterilizar en una autoclave de capacidad de 50 litros a temperatura de 121° C, 15 lb de presión, por 20 minutos.



Figura 4: Autoclave



Figura 5: Frascos autoclave

Fuente: Elaboración propia, 2015

4.2.5 Diseño estadístico

El experimento se llevó a cabo con cuatro tratamientos y repeticiones, las claves y descripción de los tratamientos se presentan en la tabla 5. Se empleó el Diseño Completamente al Azar (DCA) y el esquema del ANVA está en el anexo 2:

Tabla 5: Claves y tratamientos empleados en el experimento.

Clave	Tratamientos
T1	M y S (Murashige and skoog, 1962)
T2	Medio con plátano (35gL^{-1}), Fertilizante ($6,8\text{ mL}^{-1}$), complejo B($2,5\text{mL}^{-1}$)
T3	Medio con plátano (20 gL^{-1}), Fertilizante ($7,1\text{ mL}^{-1}$), complejo B(3 mL^{-1})
T4	Medio con plátano (45gL^{-1}), Fertilizante ($7,4\text{ mL}^{-1}$), complejo B($3,5\text{mL}^{-1}$)

Se utilizó 25 plántulas por cada repetición por cada repetición sumando 100 plántulas por tratamiento, con volumen de 40 ml de medio de cultivo por cada plántula. El tiempo de inmersión fue de 14 minutos, con frecuencia de inmersión de 4 horas (6 inmersiones por día). Se incubaron a temperatura de $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un régimen de fotoperiodo de 12 h luz.

4.2.6 Tamaño y características de los tratamientos

N° de tratamientos	:	4
N° de repeticiones	:	4
N° de plántulas/repeticiones	:	25
Total de plántulas/ tratamiento	:	100
Total de plántulas/ experimento	:	400

La aleatorización y la disposición del experimento en el laboratorio se muestran en el Anexo 2.

4.2.7 Variables evaluadas

A los 60 días de cultivo se evaluaron los siguientes indicadores del desarrollo:

- **Coefficiente de multiplicación:**

Se determinó por el número de brotes finales sobre el número de plántulas introducidas.

- **Número de raíces:**

Se contabilizaron las raíces desarrolladas al término del experimento.

- **Porcentaje de supervivencia:**

Se contabilizaron el número de plantas vivas multiplicándole por 100 y dividiendo entre el total de plántulas introducidas.

Los datos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar) y la comparación múltiple de

media se realizó según Tukey con un nivel de significación de $p < 0,05$ lo cual se especifica en cada uno de los resultados.

Cabe mencionar que para los datos de coeficiente de variación y números de raíces se usó para su tabulación la transformación de raíz cuadrada. Calzada (1993), menciona que si los datos numéricos están dados sin denominador común; en estas condiciones los tratamientos no contribuyen por igual al error experimental, razón por la que se debe realizar la transformación de raíz cuadrada, especialmente cuando las variables vienen de contajes o, contajes de eventos raros. La transformación de raíz cuadrada consiste en hallar para cada dato del experimento $\sqrt{x+0,5}$. Las pruebas significativas se realizaron con estos resultados.

V. RESULTADOS

5.1 Coeficiente de multiplicación

5.1.1 Análisis de varianza del coeficiente de multiplicación

Tabla 6: ANVA del coeficiente de multiplicación

FV	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	Significancia
Tratamientos	3	0,14974	0,0499	8,87	>0,002	**
Error	12	0,06750	0,0056			
Total	15	0,21723				

**Altamente significativo

$\bar{x} = 1.17$

$R^2 = 66.83 \%$

$CV = 6.39 \%$

Prueba de Tukey al 95% del coeficiente de multiplicación

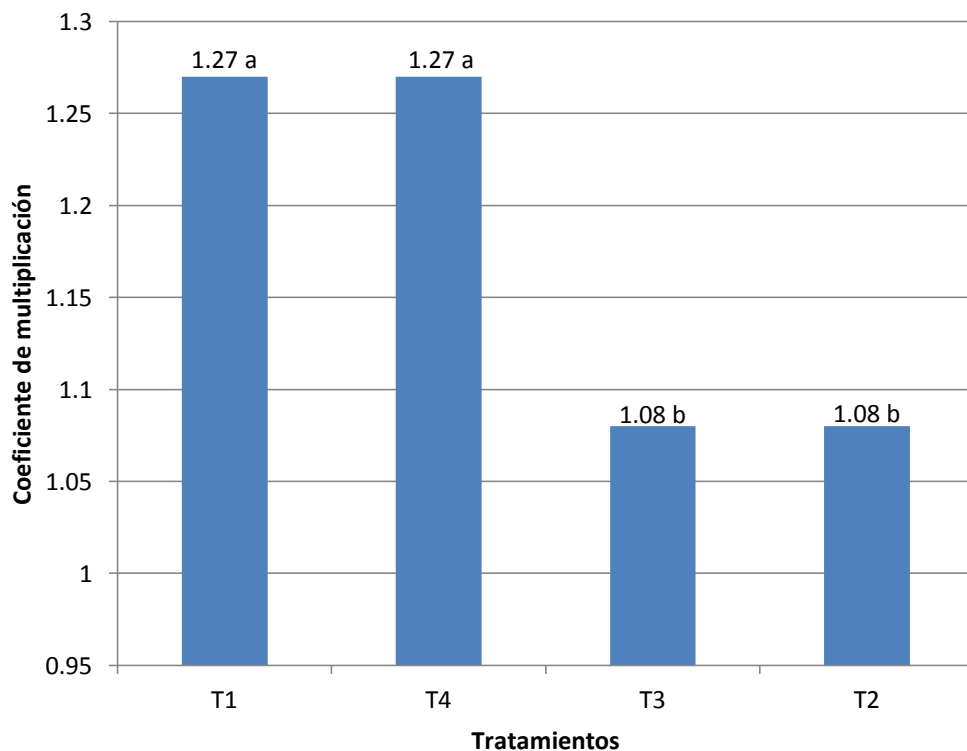


Figura 6: Prueba de Tukey al 95 % del coeficiente de variación

Nota: Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba Tukey

Brotos de los diferentes tratamientos



Figura 7: Brotos de diferentes tratamientos

Fuente: Elaboración propia, 2015.

Nota: Se describe los brotes; donde **b**: Brotos.

5.2 Número de raíces

5.2.1 Análisis de varianza del número de raíces

Tabla 7: ANVA del número de raíces

FV	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	Significancia
Tratamientos	3	5,1245	1,70817	167,98	>0,001	**
Error	12	0,122	0,01017			
Total	15	5,2466				

**Altamente significativo

$\bar{x} = 1,30$

$R^2 = 97,67 \%$

$CV = 7,75 \%$

Prueba de Tukey al 95% del número de raíces

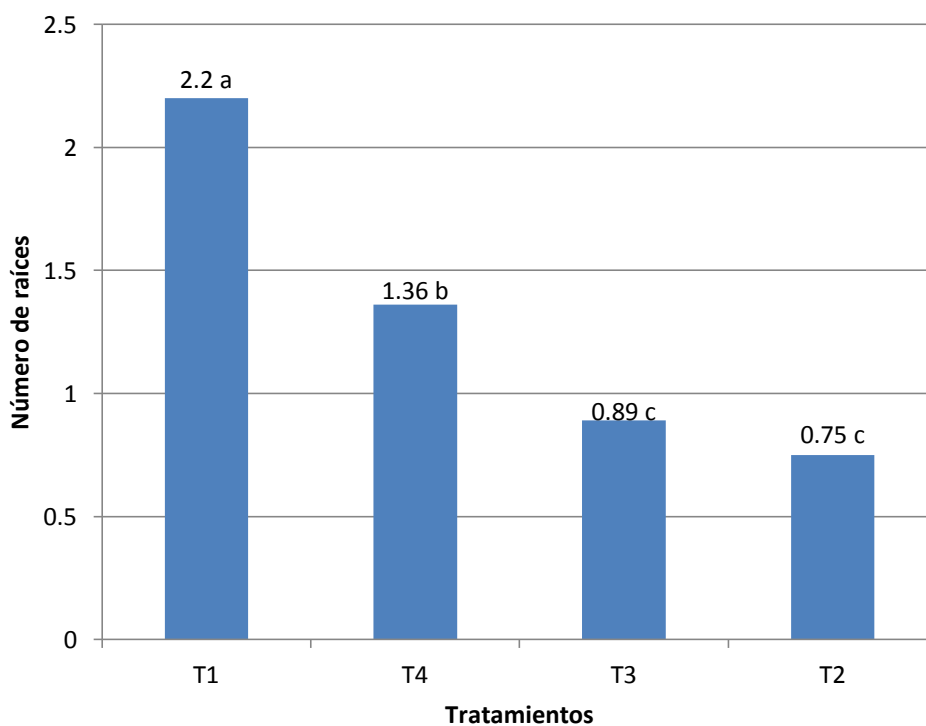
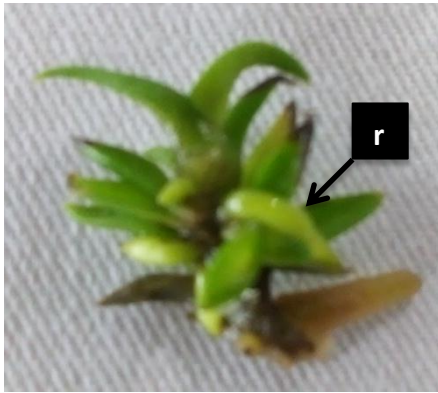


Figura 8: Prueba del resultado de la prueba de Tukey del número de raíces

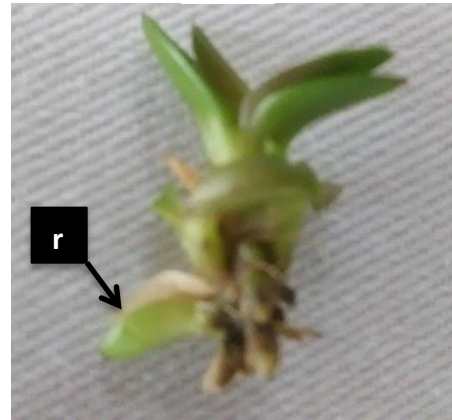
Nota: Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba Tukey

Número de raíces de los diferentes tratamientos

T1



T2



T3



T4



Figura 9: Fotos de número de raíces de los tratamientos

Nota: Se describe las raíces; donde r: Raíces

5.3 Porcentaje de mortandad

5.2.1 Análisis de varianza del porcentaje de mortandad

Tabla 7: ANVA del porcentaje de mortandad

FV	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	Significancia
Tratamientos	3	2,1922	0,73073	18,32	>0,003	**
Error	12	0,4786	0,03988			
Total	15	2,6707				

**Altamente significativo

\bar{x} =0,69

R^2 =82,08 %

CV=4,78 %

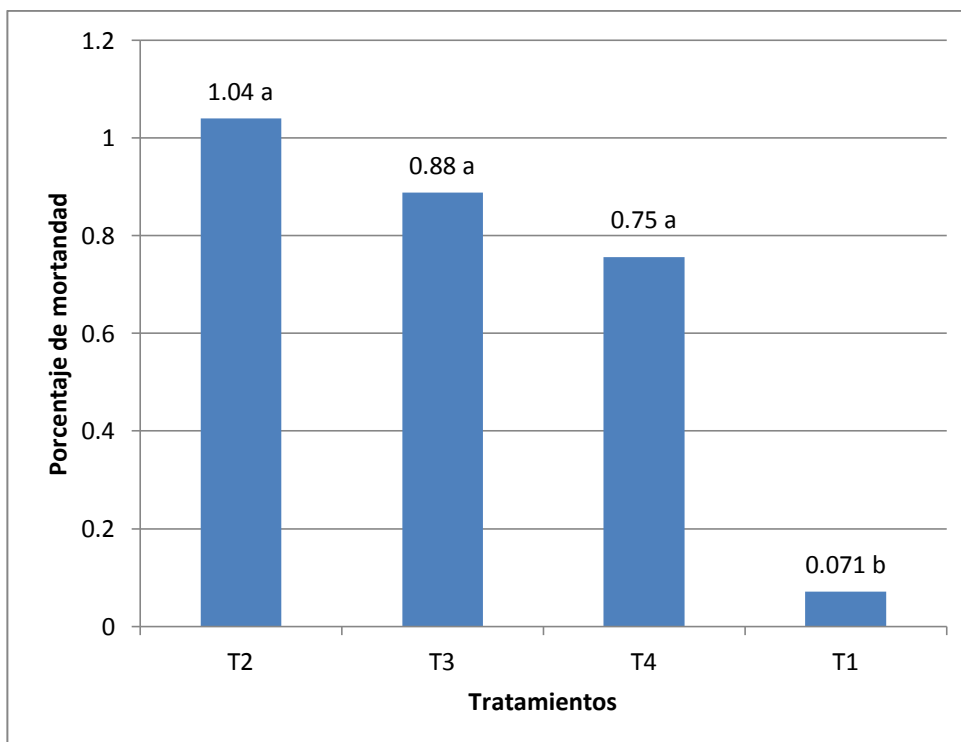


Figura 9: Prueba del resultado de la prueba de Tukey en porcentaje de mortandad

Nota: Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba Tukey.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Coeficiente de multiplicación

El análisis de varianza para el coeficiente de multiplicación presento una alta diferencia significativa entre los tratamientos al 95 % de variabilidad, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 66,83 % lo cual indica las variaciones por el efecto del modelo estadístico se sobre los tratamientos estudiados, un coeficiente de variación (C.V.) de 6,39 % el cual se encuentra en el rango permisible para los trabajos de investigación realizados en laboratorio, como lo indica Gil (2000).

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para los promedios de los tratamientos (figura 6) se obtuvo que los T1 y T4 presentan mayor coeficiente de multiplicación con un promedio de 1.27 presentando diferencia significativa en comparación a los tratamientos T2 y T3 con un promedio de 1.08. Lo cual indica el efecto de la composición de los medios de cultivo sobre las plántulas; siendo el T1 sales altamente puras (ver tabla 2) en mezcla con el agua de coco, funciona sinérgicamente en la nutrición de las células y tejidos (Roca, 1991) así como también Huang *et al.*, (2001) menciona que la adición de agua de coco al medio de cultivo, estimula la formación de raíces y de brotes. El T4 presenta en su composición una mayor cantidad de insumos (ver tabla 4) el cual favoreció la nutrición de las plántulas permitiendo diferenciar los nuevos brotes, como menciona Padilla (2008), al utilizar sustancias orgánicas complejas como el plátano seda homogenizado y endosperma líquido de coco en la composición del medio promueve una rápida diferenciación de

protocormo, desarrollo vegetativo y radicular en orquídeas, así mismo la combinación del agua de coco y la pulpa de plátano generan un crecimiento y desarrollo de los brotes, encontrando efecto similar por Shina y Roy (2004), donde obtuvieron los mayores tamaños de brotes de *Vanda teres* al agregar 10 % de agua de coco y 10% de pulpa de plátano al medio de cultivo.

Así mismo el coeficiente de multiplicación de todos los tratamientos fue influenciado por la densidad de plántulas dentro del SIT, donde Alverca (2015), menciona de que densidades inferiores o superiores a 10 explantes por SIT disminuyen la calidad de las plantas.

6.2 Número de raíces

El análisis de varianza para el número de raíces presentó alta diferencia significativa entre los tratamientos al 95 % de variabilidad, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 97.67 % lo cual indica el efecto de variaciones del modelo estadístico sobre los tratamientos estudiados, un coeficiente de variación (C.V.) de 7.75 % encontrándose en el rango permisible para los trabajos de investigación realizados en laboratorio, como indica Gil (2000).

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para los promedios de los tratamientos (figura 6) presentan una alta diferencias significativas entre los tratamientos, donde T1 obtuvo el mayor promedio de raíces (2.20) de coco solo o en combinación con otros compuestos estimula la división celular. Así mismo la presencia de nitrógeno no proteico soluble en forma de aminoácidos en la

composición del agua de coco, Roca (1991), influyen sobre la síntesis de proteína, resistencia al estrés, la fotosíntesis, brindándole condiciones compensatorios para el desarrollo de las plantas, corroborado por <http://www.agrares.com>.

Mientras que en el T4, también se observó que el medió de cultivo (Tabla 4) tuvo un efecto sobre el promedio de raíces (1.36), efectos obtenidos también en estudios realizados por Moreno y Menchaca (2008), en la propagación *in vitro* de *Stanhope nigripes* B., en medio semi sólido de MS suplementado con agua de coco (120 ml) y pulpa de plátano (100 g) obteniendo un promedio de 5.74 raíces, así mismo Padilla (2008), obtuvo en medio de cultivo semisólido con plátano seda (20 g) y agua de coco (100 ml) suplementado con complejo B un promedio de raíces de 2.5 raíces en el cultivo *in vitro* de *Cattleya* sp., lo cual indica que los compuestos orgánicos de agua de coco, plátano seda y complejo B influyen en el desarrollo de las raíces, en donde Erston (1933), menciona que las Vitaminas en solución de cultivo acelera el crecimiento de las raíces, participan en la nutrición y la asimilación de nutrientes, aumentando la cantidad de protoplasma.

6.3 Porcentaje de mortandad

El análisis de varianza para el porcentaje de mortandad presento alta diferencia significativa entre los tratamientos al 95 % de variabilidad, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 82.08 % lo cual indica el efecto de las variaciones del modelo estadístico sobre los tratamientos estudiados, un coeficiente de variación (C.V.) de 4.78 % encontrándose en el

rango permisible para los trabajos de investigación realizados en laboratorio, Gil (2000).

La prueba de Tukey ($p < 0.05$), para los promedios de los tratamientos (figura 9) presentan una alta diferencia significativa, donde los tratamientos T4, T3 y T2 con promedios de 0.75, 0.88 y 1.04 respectivamente obtuvieron mayores porcentajes de mortandad en comparación al T1 que obtuvo un menor porcentaje de mortandad (0.07), el cual supera estadísticamente.

En los tratamientos T2, T3 y T4 donde se obtuvo un mayor porcentaje de mortandad se observó la presencia de una sedimentación viscosa en el frasco de crecimiento quedando las plántulas inmersas, el cual afectó su desarrollo y provocó la muerte por falta de oxigenación o hiperhidricidad, Takayma *et al.*, (1991), menciona que la biomasa aumenta y el cultivo se vuelve viscoso requiriendo mayores tasas de aireación para asegurar su oxigenación y agitación, evitando la sedimentación de la biomasa (Ziv *et al.*, 1983, Gaspar *et al.*, 1991) que al prolongarse el periodo de contacto entre el medio y el cultivo favorece a la hiperhidricidad causando severos daños como la muerte de los meristemas primarios o incluso la muerte de la planta. Así mismo en la composición de estos tratamientos, se utilizó fertilizante foliar como fuente de sales minerales, Taiz y Zieger (2006), menciona que los fertilizantes inorgánicos que se adicionan como complementos a las sales minerales MS o a cualquier otra formulación de sales minerales convencionales, siempre incorporan impurezas o trazas de otros elementos, como cloruros y sodio, que no se consideran en los cálculos o que están contenidos en la formulación del

producto comercial y que no es imposible obviarlos, pero que pueden influir significativamente en la nutrición, metabolismo y fisiología de los explantes; por lo tanto la viscosidad observada y las impurezas de los fertilizantes en el medio de cultivo complicaron la supervivencia de las plántulas obteniendo un alto porcentaje de mortandad.

VII. CONCLUSIÓN

- 7.1 Los tratamientos con mayor coeficiente de multiplicación fueron el T1 y T4, con promedios de 1.27 brotes.
- 7.2 El tratamiento con mayor número de raíces fue el T1 con promedio de 2.20 raíces.
- 7.3 El tratamiento con menor porcentaje de mortandad fue T1 con 2 % de plántulas muertas.
- 7.4 El medio adecuado para la propagación *in vitro* de *Cattleya rex* O'Brien, bajo el Sistema Inmersión Temporal con tiempo y frecuencia de inmersión de 14 minutos y 4 horas respectivamente, fue el tratamiento T1.

VIII. RECOMENDACIÓN

- 8.1 Habiendo obtenido el mejor tratamiento T1, se recomienda su aplicación en la propagación de *Cattleya rex* O' Brien, en las condiciones del Sistema de Inmersión Temporal.

- 8.2 Realizar trabajos con otros compuestos orgánicos para la propagación *in vitro* de *Cattleya rex* O' Brien bajo el Sistema Inmersión Temporal.

- 8.3 Hacer uso del medio de cultivo del tratamiento T1 como referencia, en la propagación *in vitro* en otras especies de orquídeas bajo el Sistema de Inmersión Temporal.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abbas, B., Heningtyas, F., Amriati, B. (2011). *In vitro seeds germination and plantlets development of Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae). International Research Journal of Plant Science. 2(5):154-159.
- Ackermann, D., Bruschi, A., Sonntag, K. & Sellner, M. (2003). *Using the temporary immersion technique for in vitro culturing of renewable resources plants*. In: Agricultural techniques and technologies on the light agenda. pp. 46-49
- Adelberg, J. and Simpson, E. (2002). *Intermittent Immersion Vessel Apparatus and Process for Plant Propagation*. Internl. s/N: PCT/USO/06586.
- Aharoni, M. (2002). *Aspects of commercial plant tissue cultured propagation in liquid media*. 1 st International Symposium. " Liquid Systems for in Vitro Mass Propagation of Plants". As. Norway p. 70 – 71.
- Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M. and Etienne H. (2005). *Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (Coffea arabica L.) somatic embryos*. Plant Cell Tissue Organ Culture. 81:p. 27-36
- Alvard, D., Cote, F. & Teisson, C. (1993). *Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39:253-258.
- Alverca, G. W. (2015). *Micropropagación de Ananas comosus (L.) Merr. Cultivar MD-2 "GOLDEN", Mediante un Sistema de Inmersión Temporal*. Universidad Nacional de San Martín. p.56

- Archambault, J., Williams, R., Lavoie, L., Pepin and Chavarie, C. (1994). *Production of Somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor*. Biotech. Bioengin. 44 : 930 – 943.
- Azofeifa, A., Guevara, E., Jiménez, V.M. (2008). *Uso de abonos foliares comerciales en la elaboración de medios de cultivo in vitro*. Agronomía Costarricense 32:149-160.
- Basail, M., Medero, M., Martínez, M., Ventura, J., López, J., García, M., Cabrera, M., Santos, A., Rayas, A., Pons, C., BAUTA, M., Álvarez, M., García, J. (2003). *Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la micropropagación de la yuca en Sistema de Inmersión Temporal*. Biotecnología Vegetal 3 (2): 93 – 96.
- Berthouly, M. y Etienne, H. (2002). *Temporary Immersion System: A new concept for use liquid medium in mass propagation*. 1st Int. Symp. “Liquid Systems for in vitro Mass Propagation of Plants”, As, Norway.
- Calzada, J. (1993). *Métodos Estadísticos para la Investigación*, Tercera Edició, Lima, p 643.
- Castro, D., Díaz, J. y Montoya, N. (2002). *Clonal propagation of bananas by biorreactors of temporary immersion*. Memorias XV Reunión: Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología. p. 44 – 48.
- Cazzulino, D., Pederson, H. and Chin, C. (1991). *Bioreactors and image analysis for scale – up and plant propagation* In: Cell culture and somatic cell genetics of plant Vasil I (ed.), Academic press, San Diego, CA. p. 147 – 177.
- Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T. (2000). *Biosynthesis of hormones and elicitors molecules*. En: Buchanan B., Grisse W., Jones R. (eds.)

Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 850-929.

Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S.R., Frattarelli, A. & Monticelli, S. (2003). *Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. Acta Horticulturae*, 616:359-364.

Debergh, P., Aitken – Cristie, J., Cohen, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R. and Ziv, M. (1992). *Reconsideration of the term “Vitrification” as used in micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Culture*. 30 : 135 – 140.

Dressler, R.L. (1993). *Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. New York, Estados Unidos de América. Cornell University Press*. 374 pp.

Doran, P. (1993). *Design of reactors for plant cells and organs In: A Feichter (ed), Bioprocess Design Control*, Vol. 48. Springer – Verlag, Berlin. p. 116 – 169.

Dottin, M. (2000). *Propagación in vitro de Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott. Tesis de doctorado. Universidad Central “Marta Abreu” de la Villas, Sta. Clara, Cuba*.

Erston, V., Miller, Ph.D. (1933) *Fisiología Vegetal. Profesor de Botánica. Universidad de Pittsburg, Fisiólogo del Departamento de Agricultura de los EEUU*. p. 80.

Escalona, M. (2006). *Temporary inmersión beats traditional techniques on all fronts Prophyta anual*. pp 48 – 50.

Etiene, H. y Berthouly, M. (2002). *Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215 – 231.

FAO/IAEA, (2004). *Low cost options for tissue culture technology in developing countries Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26 – 30 August 2002 February 2004*.

- Gaspar, T. (1991). *Vitrification in micropropagation. In Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 17. Hightech an Micropropagation I (Baiaj y P S ed). Berlin Sringer – Verlug.
- George, E.F. (1993). *Plant tissue culture techniques*. In: Plant propagation by tissue culture v.1: The Technology. E.F. George (ed.). Exegetics Ltd., Edington. pp.: 3-36
- Gil, (2000). Uniformidad en la distribución del abono. Agrotecnia. P. 62.
- Gribble, E.K., Conroy, J.P., Holford, P., Milham, P.J. (2002). *In vitro uptake of minerals by Gypsophila paniculata and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation*. Australian Journal of Botany 50:713-723.
- Gutiérrez, C. (1996). *Propagación clonal in vitro de Cattleya por medio de meristemas*. In: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Vol. 1. San José, Costa Rica. P. 302.
- Hamidah, M., Abdul Karim, A.G. y Debergh, P.C. (1996) *Mass propagation of Anthurium by the use of in vitro technique. Second Ph.D. Sympositum. Faculteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*
- Hamidah, M. Abdul Karim, A.G. y Debergh, P.C. (1997). *Somatic embryogenesis and plant regeneration in Anthurium scherzerianum*. Plan Cell, Tissue and Organ Cultura 48: 189-193
- Hegarty, P, Smart N, Sacragg H and Fowler M. (1986). *The aeration of Catharanthus roseus L.G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: the inhibitory effect at high aeration rates on culture growth*. J. Expt. Bot. 37: 1911 – 1920.
- Heyerdahl, P., Olsen, O. and Hvoslef – Eide, A. (1995). *Engineering aspects of plant propagation in bioreactors*. In: Aitken-Christie J, Kozai T, and Smith M

- (eds.), Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 87- 123.
- Huang, L.C.; Lin, C.J.; Kuo C.I.; Huang, B.L.; Murashige, T. 2001. *Phaphiopedilum cloning in vitro*. Scientia Horticulturae. Vol 91. p. 111-121.
- Kim, D., Pederson, H. and Chin, C. (1991). *Cultivation of Thalictum rugosum cell suspension in an improved airlift bioreactor: Stimulatory effects of CO₂ and C₂H₄ on alkaloid production*. Biotech. Bioengin. 39:331 – 339.
- Kitsaki, C., Zygouraki, S., Ziobora, M., Chintziest, S. (2004). *In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae)*. Plant Cell Reports. 23: 248-290.
- Kishor, R., Valli, K., Sharma, G.J. (2006). *Hybridization and in vitro culture of orchid hybrid. Ascocenda 'Kangla'*. Scientia Horticulturae. Vol 108. p. 66-73.
- Leon, M. (1995). *Tesis de Conservación de Especies Peruanas de Orquídeas utilizando Técnicas de Cultivo in vitro*. UNALM. pp. 14 – 15.
- Lorenzo, J.C., Blanco, M.A., Peláez, O, González A, Cid M, Iglesias A, González B, Escalona M, Espinosa P, Borroto CG (2001). *Sugarcane micropropagation and phenolic excretion*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65 (3): 1-8
- Llan, A., Ziv, M. and Halevy, A. (1995). *In Vitro propagation in liquid culture and acclimatization of Brodiaeae*. Scientia Hort. 63: 101 – 112.
- Kevers, C. and Gaspar. (1986). *Vitrificación of carnation in vitro: changes in water content, extracellular space, air volume, and long levels*. Physiol. Veg., 24: 647 – 653.
- Kim, D., Pederson, H. and Chin, C. (1991). *Cultivation of Thalictum rugosum cell suspension in an improved airlift bioreactor: Stimulatory effects of CO₂ and C₂H₄ on alkaloid production*. Biotech. Bioengin. 39: 331 – 339.

- Kitsaki, C., Zygouraki, S., Ziobora, M., Chintziest, S. (2004). *In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species* (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*. 23:284–290.
- Kishor, R.; Valli, K.S.; Sharma, G.J.; (2006). *Hybridization and in vitro culture of and orchid hybrid*. *Ascocenda 'Kangla'*. *Scientia Horticulturae*. Vol 108. p. 66-73.
- Krikorian, A.D., Cronauer, S.S. (1984). Banana In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*. pp. 327-348.
- Kosai, T., Fujiwara, K., Hayash, M. and Aitken – Christie J. (1992). *The in vitro environment and its control in micropropagation*. In: Kurata K. and Kozai T. *Transplant production Systems*. Kluwer Acad. Publ., Dorchet, The Netherlands. p. 247 – 282.
- Leifert, C. and Waites, W. (1990). *Contaminants of plan Tissue culture*. Internl. Assoc. Plant Tiss. Cult. Newsl. 60: 2-13.
- Leroy, T. y Pike, L.M. (1976). *Flasking orchid seeds-A method for the novice grower*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 45: 800-803.
- Levin, R., Alper, Y. and Watad, A. (1997). *Methods and approaches for liquid media and semi – automated micropropagation*. *Acta Hort.* 447: 659 - 663
- Lo, S., Wade, S., Kuo, C., Chen, C., Tsay, H. (2004). *Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of Dendrobium tosaense makino– a medicinally important orchid*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.* 40:528-535.
- Lorenzo, J.C., González, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P. & Borroto, C. (1998). *Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system*. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 54:197-200.

- Martin, S. M. (1980). *Mass culture systems for plant cell suspensions*. En: Staba E. J. (Ed.) *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. C.R.C. Press. Inc. Boca Raton. Florida., U.S.A. pp. 149-166.
- Merchuk, J. (1990). *Why use air – lift bioreactors*. Trends Biotech. 8: 66 – 71.
- Moon, H.K., Park, S.Y., Kim, Y.W., Kim, S.H. (2008). *Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenation tissues from serial grafting of a mature Kalopanax septemlobus tree*. In Vitro Cellular and Development Biology Plant 44:119-127.
- Moreno, D., Menchaca, R.A. (2007). *Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de Stanhopea tigrina Bateman (Orchidiaceae)*. Foresta Veracruzana 9:27-32.
- Murashige, T. & SKOOG, F. (1962). *A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant. 15:473- 479.
- Nongrum, L., Kumaria, S., Tandon, P. (2007). *The influence of in vitro media on asymbiotic germination, plantlet development and ex vitro establishment of Coelogyne ovalis Lindl. And Coelogyne nitida (Wall. Ex Don) Lindl*. Proceedings of the Indian National Science Academy. 73(4):205-207.
- Northen, R. T. (1970). *Home Orchid Growing*. Third Edition. 95-113
- Osmotec, (2002). *The Osmotec Life Line. Advanced products for plant tissue culture*.
- Paek K. , Chakrabarty and Hahn E., 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell Tissue Organ Cult. 81: 287 – 300.
- Padilla, E.D. (2008). *Evaluación de Medios de Cultivo para la Micropropagación in vitro de Orquídeas en el Departamento de San Martín – UNSM*. pp. 79.

- Paque, M. and Boxus, O. (1987). *Vitrification : aphenomenom related to tissue water content*. Acta Hort. 212 :245 – 252.
- Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., Mecedo, E. (2007). *Coconut wáter and BAP successfully replaced zeatin in olive (Olea europaea L.) micropropagation*. Scientia Horticulturae. Vol 113. p. 1-7.
- Peña, Y.J., Juárez, J., Gómez, L., Jerónimo, J.L., García I., González, J.A., Robert, M.L. (2010). *Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (Cedrela odorata L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species*. In Vitro Cellular and Development Biology–Plant 46:149-160.
- Pierick, R.L.M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 324 p.
- Pierik, R.L.M. (1998). *Handicaps for large scale commercial application of micropropagation*. Acta Horticulturae, 230:63-71.
- Pollock, M.A., Oppenheimer D.G. (1999). *Inexpensive alternative to MS medium for selection of Arabidopsis plants in culture*. Bio/Technique 26:254-257.
- Quiala, E., Barbón, R., Jiménez, E., de Feria M, Chávez, M., Capote, A., Pérez, N. (2006). *Biomass production of Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems*. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.42:298-300
- Rhodes, M., J. C., Robins, R. J., Parr, A. J., Hamill, J. (1987). *Secondary product formation in plant cell cultures*. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 105S-114S.
- Rodriguez-Flores. (2000). *Germinación y desarrollo in vitro de Paphiopedilum exstaminodium y P. caudatum, especies en peligro de extinción*. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias. UNAM. pp. 56.

- Romero, R., Luna, B., Barba, A. (2007). *Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación in vitro de Laelia anceps*. Lankesteriana 7:353-356
- Roussos, P.A., Gasparatos, D., Tsantili, E., Pontikis, C.A. (2007). *Mineral nutrition of jojoba explants in vitro under sodium chloride salinity*. Scientia Horticulturae 114:59-66.
- Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H. (2008). *In vitro germination of Encyclia adenocaula (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) seeds*. Revista Internacional De Botánica Experimental Python. 77: 203-215.
- Sagawa, Y. y Kunisaki, J. T. (1984). *Clonal Propagation: Orchids. Cell Culture and Somatic Cell*. 3: 61-67
- Scragg, A. (1992). *Large-scale plant cell culture: methods, applications and products*. Current Opinion Biotech. 3:105-109.
- Sheehan, T. J. (1983). *Recent advances in botany, propagation, and physiology of orchids*. Hort. Rev. 5: pp. 279 - 315.
- Sinha, P. & ROY, S. (2004). *Regeneration of an indigenous orchid, Vanda teres (Roxb.) Lindl. Through in vitro culture*. Plan Tissue Cult. 14(1):55-61.
- Snyman, S.J., Meyer, G.M., Richards, J.R., Ramgareeb, S., Banasiak, M. and Hockett, B. (2007). *Use of the temporary immersion RITA® bioreactor for micropropagation of sugarcane*. South African Journal of Botany. 73(2). P. 336-337
- Stuart, D., Strickland, S. and Walker, K. (1987). *Biorreactor production of alfalfa somatic embryos*. Hort Science. 22: 800 – 803.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 4ta. Ed. Sinauer Associate, Sunderland, Mass., EUA. 764 p.

- Takayama, S. (1991). *Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques*. In: Bajaj Y (ed), *biotechnology in agriculture and forestry: Hightech and micropropagation*. Vol. 17. Springer – Verlag, Berlin. p. 1 – 46.
- Takayama, S. and Akita, M. (1998). *Biorreactor techniques for large-scale culture of plant propagules*. *Adv. Hort Sci.* 12: 93 – 100.
- Ushiyama, K. (1988). *Large Scale culture techniques of plant cells the secondary metabolite production*. *Hakko to Kogyo.* 46: 7 – 11.
- Vieitez, A., Ballester, A., San Jose M.C. and Vieitez E. (1985). *Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chesnut regenerated in vitro*. *Physiol. Plant.* 65: 177 – 184.
- Weathers, P., Cheethan, R. and Giles, K. (1988). *Dramatic increases in shoot number and length for Musa, Cordyline, and Nephrylepsis using nutrient mist*. *Acta. Hort.* 230: 39 – 44.
- Williams, R. (1992). *Towards a model of mineral nutrition in vitro*. In: Kurata K. and Kozai T. (eds), *transplant production systems*. Kluwer Acad. Publ, Cordrecht, The Netherlands. p. 213 – 229.
- Yasuda, S., K. Satoh, T., Ishii, Furuya, T. (1972). *Studies on the cultural conditions of plant cell suspension culture*. En: Terui G. (Ed.) *Ferment. Technol. Today*. Proc. Int. Ferm. Symp. 4th. Soc. Ferm. Tech. Kyoto, Japan. pp 697-703.
- Yeoman, M. M., Miedzybrodska, M. B., Lindsey, K., Mclauchlan W. R. (1980). *The synthetic potential of cultured plant cells*. En: Sala F., Parisi B., Cella R., Cifferri O. (Eds.) *Plant cell cultures: Results and perspectives*. Elsevier/North Holland Biomedical. Press. Amsterdam. pp. 327-343.
- Yong, J., Ge, L., Yan, F., Ngin, S. (2009). *The chemical composition and biological properties of coconut (Cocos nucifera L.) water*. *Molecules.* 14:5144-5164.

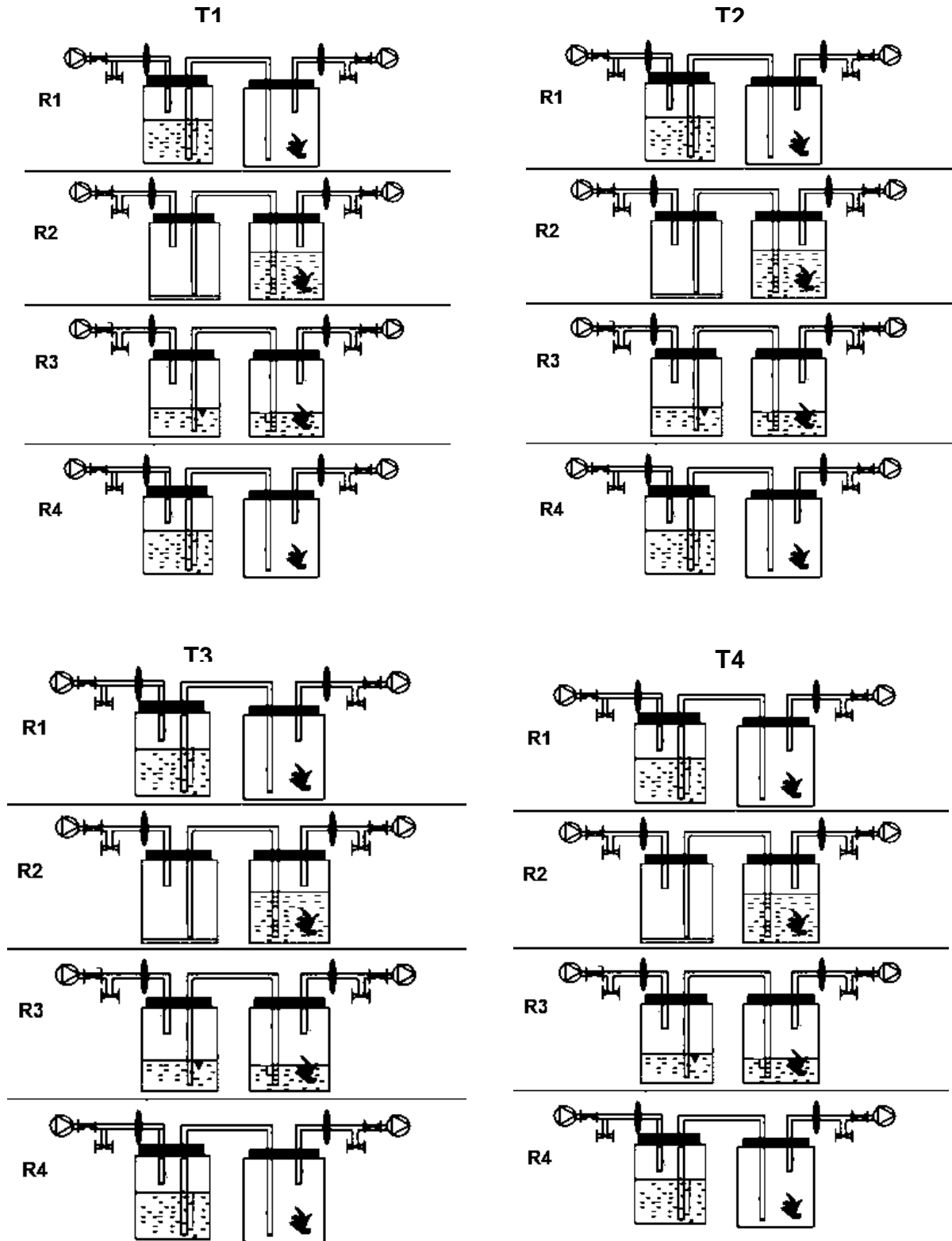
Ziv, M., Herts. N. and. Biran, Y (1983). *Vegetative reproduction of Allium ampeloprasum L. in vivo an in vitro*. Israd J. Bot. , 32: 1 – 9.

Ziv, M. (1991). *Morphogenic patten of plants in liquid medium in shaken flasks or large scale bioreactor cultures*. Israel J. Bot. 40: 145 – 153.

<http://www.agrares.com>

ANEXOS

Anexo 1: Disposición del experimento



Anexo 2: Esquema del análisis de varianza del experimento

Fuentes de Variación (F.V.)	Grados de Libertad (G.L.)	Suma de Cuadrados (S.C.)	Cuadrados Medios (C.M.)	F0
Tratamientos	t-1	$\sum_{i=1}^t n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2$	$\frac{S.C.TRAT.}{t-1}$	$\frac{C.M.TRAT.}{C.M.ERROR}$
Error	$\sum_{i=1}^t n_i - t$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$\frac{S.C.ERROR}{\sum_{i=1}^t n_i - t} = \sigma^2$	
Total	$\sum_{i=1}^t n_i - 1$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{..})^2$		

Anexo 3: Datos coeficiente de multiplicación sin transformar

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
R1	0.96	0.68	0.60	1.08
R2	1.04	0.60	0.56	1.08
R3	0.96	0.64	1.00	1.16
R4	1.56	0.72	0.52	1.12
TOTAL	4.52	2.64	2.68	4.44
PROMEDIO	1.13	0.66	0.67	1.11

Anexo 4: Coeficiente de multiplicación transformados por raíz cuadrada

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
R1	1.24	1.09	1.05	1.26
R2	1.24	1.05	1.03	1.26
R3	1.21	1.07	1.22	1.29
R4	1.44	1.10	1.01	1.27
TOTAL	5.09	4.31	4.31	5.08
PROMEDIO	1.27	1.08	1.08	1.27

Anexo 5: Resultados de la prueba de Tukey al 95 %

Tratamiento	Media	Agrupación
T1	1.27	a
T4	1.27	a
T3	1.08	b
T2	1.08	b

Anexo 6: Número de raíces sin transformar

Repeticiones	Tratamientos			
	I	II	III	IV
R1	4.32	0.04	0.32	0.84
R2	5.00	0.04	0.28	1.64
R3	4.24	0.12	0.32	1.84
R4	3.84	0.08	0.24	1.20
TOTAL	17.4	0.28	1.16	5.52
PROMEDIO	4.35	0.07	0.29	1.38

Anexo 7: Número de raíces transformados por raíz cuadrada

Repeticiones	Tratamientos			
	I	II	III	IV
R1	2.20	0.73	0.91	1.16
R2	2.35	0.73	0.88	1.46
R3	2.18	0.79	0.91	1.53
R4	2.08	0.76	0.86	1.30
TOTAL	8.80	3.02	3.55	5.45
PROMEDIO	2.20	0.75	0.89	1.36

Anexo 8: Resultados de la prueba de Tukey al 95 %

Tratamiento	Media	Agrupación
T1	2.20	A
T4	1.36	B
T3	0.89	c
T2	0.75	c

Anexo 9: Porcentaje de mortandad de datos sin transformar por raíz cuadrada

Repeticiones	Tratamientos			
	I	II	III	IV
R1	0.08	0.76	0.68	0.36
R2	0	0.72	0.76	0.76
R3	0	0.64	0.20	0.28
R4	0	0.84	0.76	0.48
TOTAL	0.08	2.96	2.4	1.88
PROMEDIO	0.02	0.74	0.6	0.47

Anexo 10: Porcentaje de mortandad de datos sin transformar por raíz cuadrada

Repeticiones	Tratamientos			
	I	II	III	IV
R1	0.29	1.06	0.97	0.64
R2	0.00	0.01	1.06	1.06
R3	0.00	0.93	0.46	0.56
R4	0.00	1.16	1.06	0.77
TOTAL	0.08	4.16	3.55	1.88
PROMEDIO	0.02	0.74	0.6	0.47

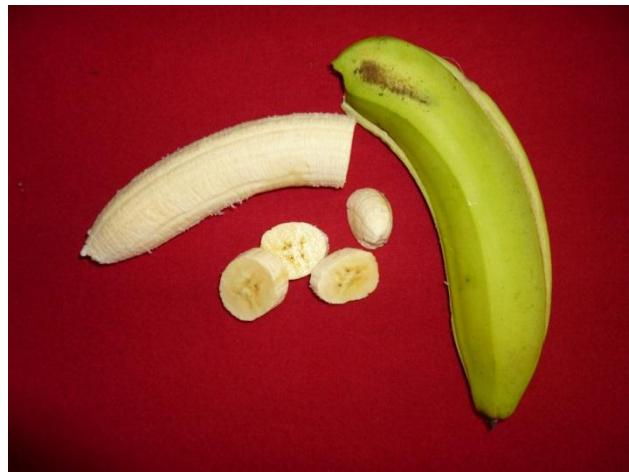
Anexo 11: Resultados de la prueba de Tukey al 95 % porcentaje de mortandad

Tratamiento	Media	Agrupación
T2	1.04	a
T3	0.88	a
T4	0.75	a
T1	0.07	b

Anexo 12: Preparación de los medios de cultivo



Pesado



Homogenizado del compuesto orgánico



Nota: Las fotos son elaboraciones propias, 2015.

Mezcla de los insumos



Dispensado



Nota: Las fotos son elaboraciones propias, 2015.

Esterilización de los medios



Instalación



Nota: Las fotos son elaboraciones propias, 2015.

Anexo 13: Composición química del fertilizante 11-8-6

Naturaleza química

Líquido fertilizante NPK con micronutrientes

Fórmula: 11-8-6 (m/v)

N° Código: 10136

Componentes peligrosos

Nombre químico Concentración [%m/v]	Elemento químico [%m/m]	Concentración
Nitrógeno total 11	N	8,9
Nitrato nitrógeno 4,9	NO ₃ - N(N)	4,0
Amonio nitrógeno 6,1	NH ₄ - N(N)	4,9
Fosfato soluble en agua 8	P ₂ O ₅	6,4
Potasio soluble en agua 6	K ₂ O	4,8
Boro soluble en agua como borato 0,01	B	0,0082
Cobre soluble en agua como quelato con EDTA 0,008	Cu	0,0066
Hierro soluble en agua como quelato con EDTA 0,019	Fe	0,0154
Manganeso soluble en agua como quelato con EDTA 0,016	Mn	0,013
Molibdeno soluble en agua como molibdato 0,0009	Mo	0,008
Zinc soluble en agua como quelato con EDTA 0,006	Zn	0,0049
Azufre 0,7	S	0,5
Cloro 0,5	Cl	0,4

Anexo 14: Composición nutricional del plátano

Proteínas <PROCNT> g	76,2	Hierro <FE> mg	0,15
Grasa total <FAT> g	1,5	β caroteno equivalentes totales <CARTBQ> μg	0,6
Carbohidratos totales <CHOCDF> g	0,3	Retinol μg	-
Carbohidratos disponibles <CHOAVL> g	21	Vitamina A equivalentes totales <VITA> μg	21
Fibra cruda g	18,4	Tiamina <THIA> mg	3
Fibra dietética <FIBTG> g	0,4	Riboflavina <RIBF> mg	0,03
Cenizas <ASH> g	2,6	Niacina <NIA> mg	0,05
Calcio <CA> mg	1	Vitamina C <VICT> mg	0,79
Fósforo <P> mg	5	AscT mg	4,3
Zinc <ZN> mg	27	Agua <WATER> g	347
Energía <ENERC> kJ	83	Energía <ENERC> kcal	71

Fuente: Ministerio de Salud (2009).