Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN TARAPOTO - PERU

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú.
Vea una copia de esta licencia en http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/

Obra publicada con autorización del autor

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE ECOLOGÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Elaboración y aplicación de un protocolo de cultivo in vitro para la propagación de la especie *Cattleya rex* (orchidaceae) a partir de explantes, mediante el sistema de inmersión temporal RITA, con fines de conservación en la provincia de Moyobamba – 2014

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental

AUTOR:

Julius Anthoni Ruiz Ramírez

ASESOR:

Blgo. M. Sc. Alfredo Iban Díaz Visitación

Código N°095158

Moyobamba - Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN - TARAPOTO

FACULTAD DE ECOLOGÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Elaboración y aplicación de un protocolo de cultivo in vitro para la propagación de la especie *Cattleya rex* (orchidaceae) a partir de explantes, mediante el sistema de inmersión temporal RITA, con fines de conservación en la provincia de Moyobamba – 2014.

AUTOR:

Bach. Julius Anthoni Ruiz Ramírez

Sustentado y aprobado el 18 de marzo del 2016, por los siguientes jurados

.....	.....
Ing. M. Sc. Rubén Ruiz Valles	**Ing. M.Sc. Gerardo Cáceres Bardalez**
Presidente	Secretario
.....	.....
Blgo. M. Sc. Luis Eduardo Rodríguez Pérez	**Blgo. M. Sc. Alfredo Iban Díaz Visitación**
Miembro	Asesor

Declaratoria de autenticidad

Julius Anthoni Ruiz Ramírez, con DNI N° 70160722, egresado de la facultad de Ecología, Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, de la universidad Nacional de San Martin – Tarapoto, con la tesis titulada: **Elaboración y aplicación de un protocolo de cultivo in vitro para la propagación de la especie *Cattleya rex* (orchidaceae) a partir de explantes, mediante el sistema de inmersión temporal RITA, con fines de conservación en la provincia de Moyobamba – 2014.**

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencias de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda la información que contiene esta tesis no ha sido auto 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 Martin – Tarapoto.

Moyobamba, 18 de marzo del 2016.

.....

Bach. Julius Anthoni Ruiz Ramírez
DNI N° 70160722

Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres: Ruiz Ramirez Julius Anthoni	
Código de alumno : 095158	**Teléfono:** 942908191
Correo electrónico : jaru22@hotmail.com	**DNI:** 70160722

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de: Ecología	
Escuela Profesional de: Ingenieria Ambiental	

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(X)	Trabajo de investigación	( )
Trabajo de suficiencia profesional	( )		

4. Datos del Trabajo de investigación

Titulo: Elaboración y Aplicación de un protocolo de cultivo in vitro para la propagación de la especie cattleya rex (orchidaceae) a partir de explantes, mediante el sistema de inmersión temporal RITA, con fines de conservación en la provincia de Moyobamba-2014	
Año de publicación: 2016	

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(X)	Embargo	( )
Acceso restringido **	( )		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons,* con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12º del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **"Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA".**

.....

Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

05 / 08 / 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN REPOSITORIO INSTITUCIONAL DIGITAL TARAPOTO

.....

Firma del Responsable de Repossitorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

***Acceso abierto**: uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

Dedico este proyecto de investigación a mi papá Julio Ruiz, a mi tía Astriht Ruiz, a mi tío Edgar Gutiérrez, a mis abuelitos Celia y Antonio, a mi amor Nicida Luna y a mi pequeño hijo Lian Joao que ellos me supieron entender, comprender en todo momento con sus constantes esfuerzos y sacrificios, brindándome su apoyo económico, moral y espiritual, haciendo posible cumplir de la mejor manera este proyecto de investigación.

Agradecimiento

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la fuerza para seguir cada día y no dar marcha atrás ante los contratiempos. A mi papá Julio Ruiz por ser el mayor impulso en cada etapa de mi vida. A mi amor Nicida Luna por estar cada día a mi lado en las buenas y en las malas. A mi hijito Lían Joao por ser la fuente de energía que me da valor para salir adelante. A mis tíos Astriht Ruiz y Edgar Gutiérrez por su apoyo incondicional que me brindan. A mis abuelitos Celia y Antonio por todo el cariño que me dan. Un profundo agradecimiento a Domy Gutiérrez y Antonio Goicochea por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en cultivo in vitro de tejidos vegetales en sus instalaciones, y por supuesto a GDM y HVT por sus orientaciones y apoyos profesionales que me brindaron en la realización de mi tesis.

Índice

Pág.
Dedicatoria vi
Agradecimiento. vii
Índice viii
Índice de tablas x
Índice de gráficos xi
Resumen xii
Abstract xiii

Dedicatoria 1

CAPÍTULO I
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Antecedentes de la investigación 3
1.1.1. Internacional 3
1.1.2. Nacional 3
1.2. Bases teóricas 4
1.2.1. Cattleya rex 4
1.2.2. Cultivo in vitro 5
1.2.3. Medio de cultivo 6
1.2.4. Medio de cultivo 7
1.2.5. Cultivo en medio líquido 13
1.2.6. Sistema de inmersión temporal 13
1.3. Definición de términos 18

CAPÍTULO II
MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material 19
2.2. Métodos 19

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados 24
3.1.1. Elaboración de protocolos de cultivo in vitro 24
3.1.2. Medios de cultivo y sus costos de producción 35

3.1.3. Efecto de las concentraciones de los medio de cultivo 40
3.2. Discusión 44
3.2.1. Efecto de las concentraciones de los medio de cultivo 44
3.2.2. Medios de cultivo y su costo de producción 46
3.2.3. Efecto de las concentraciones de los medio de cultivo 47

CONCLUSIONES 51

RECOMENDACIONES 52

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 53

ANEXOS. 61
Anexo A: Modelo del funcionamiento del SIT que se utilizó 62
Anexo B: Composición del fertilizante Bayfolan 11-8-6 62
Anexo C: Ficha técnica de recolección de datos 63
Anexo D: Ficha técnica del resumen de recolección de datos 63
Anexo E: Suma total y promedio del número de brotes 64
Anexo F: Suma total y promedio de altura de brote 64
Anexo G: Suma total y promedio del número de raíces 64
Anexo H: Panel fotográfico 65

Índice de tablas

Pág.

Tabla 1: *Análisis de varianza* 21
Tabla 2: *Componentes y cantidades del T0* 26
Tabla 3: *Componentes y cantidades del T1* 29
Tabla 4: *Composición del medio de cultivo T2* 32
Tabla 5: Composición y cantidad del T3 35
Tabla 6: *Costos de 1 litro de medios de cultivo T0* 36
Tabla 7: *Costos de 1 litro de medios de cultivo T1* 37
Tabla 8: *Costos de 1 litro de medios de cultivo T2* 38
Tabla 9: *Costos de 1 litro de medios de cultivo T3* 39
Tabla10: *Análisis de varianza del número de brotes* 40
Tabla11: *Análisis de varianza de la altura de brote* 41
Tabla12: *Análisis de varianza del número de raíces* 43
Tabla13: *Protocolo del tratamiento 1.* 45

Índice de gráficos

Pág.

Gráfico 1: Valores de la prueba de Tukey al 95% de C.V 40
Gráfico 2: Valores de la prueba de Tukey al 95% de C.V 42
Gráfico 3: Valores de la prueba de Tukey al 95% de C.V. 43

Resumen

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la empresa Corporación Gy G E.I.R.L. con el objetivo de elaborar un protocolo de cultivo in vitro para propagar la especie ***Cattleya rex*** (orchidaceae) a partir de explantes, mediante sistema de inmersión temporal (RITA), aplicando cuatro tratamiento de las cuales el tratamiento 0(T0) estuvo compuesto por azúcar (20gr L^{-1}).complejo B (3 mlL^{-1}), fertilizante foliar Bayfolan 11-8-6 (7,1 mlL^{-1}) , para el tratamiento 1(T1) se adiciono 10% de agua de coco, para el tratamiento 2(T2) 15% de agua de coco y para el tratamiento 3 (T3)20% de agua de coco. Para el sistema de inmersión temporal se utilizaron un total de 32 frascos de 1000 ml de capacidad. Se trabajó con nivel de significancia de ($p \leq 0,05$). Se aplicó un tiempo de inmersión de 10 minutos cada 6 horas, 4 inmersiones por día, con 40 ml de medio/ explantes. A un mes después del experimento se evaluaron número de brotes, altura de brote y número de raíces, de las cuales el mejor tratamiento fue el tratamiento 1 con un promedio de número de brote de 2,95 brotes, con un promedio de altura de 0,53 cm y con un promedio de 1,77 raíces. Se sacaron el costo de cada medio de cultivo para el trabajo de investigación, los mismos que representan los 4 tratamientos, con estos datos se muestran que los costos de producción del cultivo in vitro de la especie ***Cattleya rex*** no están costoso puesto que con el siguiente trabajo de investigación se demostró que se puede reducir los costos utilizando insumos caseros que se pueden encontrar localmente.

Palabras clave: Cattleya rex, cultivo in vitro, protocolo, sistema de inmersión temporal

Abstract

This research was conducted in the laboratory of plant tissue culture company G y G Corporation EIRL with the objective of developing a protocol for in vitro culture to propagate the species ***Cattleya rex*** (Orchidaceae) from explants, using temporary immersion system (RITA), employing four treatment which treatment 0 (T0) was composed of sugar (20g L^{-1}) . Complex B (3 mlL^{-1}), foliar fertilizer (Bayfolan 11-8-6, 7, 1 mlL^{-1}), for treatment 1 (T1) 10% coconut water were added, for treatment 2 (T2) 15% coconut water and treatment 3 (T3) 20% coconut water. For temporary immersion system a total of 32 bottles 1000 ml capacity were used. We worked with significance level ($p \leq 0, 05$). It was applied an immersion time of 10 minutes every 6 hours, 4 dives /day, with 40 ml medium per explants. One month after the experiment number of shoots, height of shoot and the number of roots were evaluated, of which the best treatment was the treatment 1 with an average number of outbreak 2,95 outbreaks, with an average height of 0,53 cm and and averaging 1,77 roots.. The cost of each culture medium for the research were taken, they represent the 4 treatments, these data show that the production costs of the in vitro cultivation of the species ***Cattleya rex*** are not expensive as the following research showed that costs can be reduced using home supplies that can be found locally.

Keywords: Cattleya rex, in vitro culture, protocol, temporary inmersión system.

Introducción

Las orquídeas constituyen una numerosa familia de plantas con flores que por su belleza y diversidad han fascinado a miles de personas en el mundo desde hace cientos de años. Según los estudios de paleobotánica, se estima que la familia Orchidaceae existe desde hace 120 millones de años. Es una de las familias más evolucionadas y numerosas entre las plantas superiores, debido a su alto grado de diversidad y complejidad en la formación de cada una de sus especies. (Cavero et al., 1991).

La provincia de Moyobamba, capital de la región San Martín, es considerada un verdadero paraíso para los amantes de las orquídeas ya que su mayor tesoro son las más de dos mil variedades de orquídeas que crecen en sus bosques, gracias a la diversidad de pisos ecológicos y al cálido clima que posee. Es más, dentro de ella se han reportado los más grandes descubrimientos mundiales en orquídeas como la ***Cattleya rex***, entre otros. Por tal motivo Moyobamba es conocida como la "ciudad de las orquídeas" siendo la "orquídea símbolo" la ya mencionada ***Cattleya rex,*** una especie endémica de la región.

Pero ahora se está perdiendo esta especie debido en gran parte a la tala de bosques, el aumento de la frontera agrícola, comercialización ilícita y hay quienes que ante el imparable avance de la "civilización" frente a la naturaleza, no duda en recolectar estas plantas con la plena certeza de que es la única manera de preservarlas, aun contraviniendo leyes locales o internacionales.

Así mismo según la CITES-2011, esta majestuosa orquídea si bien no se encuentra necesariamente en peligro de extinción, podría llegar a esta situación a menos que el comercio de especímenes de esta especie este sujeto a una reglamentación estricta a fin de evitar incompatible con su supervivencia.

En la presente investigación se ha tratado de estudiar la manera de cómo con la elaboración y aplicación de un protocolo de cultivo in vitro se podría propagar la especie *Cattleya rex* (orchidaceae) a partir de explantes mediante el sistema de inmersión temporal (RITA) en la provincia de Moyobamba y que sea de bajo costo, para lo cual se ha planteado los siguientes objetivos específicos: Elaborar un protocolo de cultivo in vitro para propagar la especie Cattleya rex (orchidaceae) a partir de explantes, mediante sistema de inmersión temporal (RITA), con fines de conservación en la provincia de Moyobamba. Determinar el medio de cultivo más adecuado y de bajo costo de insumos

disponibles localmente para la propagación de ***Cattleya rex*** (orchidaceae). Evaluar el efecto de las concentraciones de los medios de cultivo casero para la propagación de la especie ***Cattleya rex*** (orchidaceae)

Ahora bajo este contexto es de suponer que la elaboración y aplicación de un protocolo para cultivo in vitro se obtendrá una óptima propagación de la especie ***Cattleya rex***. (orchidaceae), lo cual constituyó la hipótesis de investigación.

La presente investigación consta de tres capítulos: Capítulo I: Revisión bibliográfica, Capítulo II: Material y métodos, capítulo III: Resultados y discusión.

En el primer capítulo se señalan los antecedentes de la investigación, internacionales y nacionales, las bases teóricas y definición de términos básicos.

En el segundo capítulo se menciona el sistema de hipótesis y variables, el tipo y diseño de investigación, la población y muestra utilizada y las técnicas e instrumentos para la recolección y análisis de datos.

En el tercer capítulo se detallan los resultados y discusiones de la investigación.

Finalmente se detalla las conclusiones y recomendaciones de la investigación realizada.

Posteriormente con los resultados obtenidos en la investigación se pretende que las empresas que realizan cultivo in vitro utilicen este protocolo para la propagación de la especie Cattleya rex (orchidaceae) ya que es un protocolo de bajo costo.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Antecedentes de la investigación

1.1.1 Internacional

(Basail M., et al. 2012)**,** menciona que para multiplicar el plátano vianda'INIVITPV06-30' (***Musa spp.,*** AAB) en SIT. Se empleó un tiempo de inmersión de 10 minutos, frecuencia de inmersión cada 6 horas, 40 ml de medio de cultivo por explante, 90 explantes por frasco de cultivo de una capacidad de 10 litros.

(Cadavid, I., 2008) menciona que el tratamiento M y S modificado + agua de coco al 10 %, fue el más adecuado para la inducción de enraizamiento después de 90 días de realizada la siembra de las semillas.

(Basail M., et al. 2007) menciona que es posible multiplicar el cultivar híbrido 'FHIA- 21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal con el empleo de un volumen de medio de cultivo de 40 ml/ explante y una densidad de 70 explantes/frasco de cultivo (10 litros de capacidad), lo que garantizó la mejor respuesta de los explantes en cuanto al coeficiente de multiplicación y sin síntomas de hiperhidricidad ni presencia de yemas adventicias.

1.1.2 Nacional

(Robles L., 2014) menciona que la orquídea ***Phalaenopsis spp*** en el estadio PEQUEÑO, se observa una mínima diferencia estadística entre T5 (MS +Plátano Verde + Agua Coco + Regulador Crec.) con 1,53 y (T4) (MS +Plátano Verde +Agua Coco) con 1.50; que supera a los tratamientos (T3) (MS + Plátano Verde) con 1,46 que Supera (T2) (MS + Plátano Maduro) con 1,43; que supera (T1) (MS + Agua de Coco) con 1,39; que supera a (T0) (MS sin agua de coco) con 1.32.

(Padilla, E. 2008**)** menciona que la utilización de sustancias orgánicas complejas como el endospermo líquido de coco (100 ml/l), en la composición de los medios, tiene efecto en la rápida diferenciación de los protocormos y el desarrollo vegetativo y radicular de las plántulas. (Padilla, E. 2008) menciona

que para la orquídea ***Cattleya sp,*** existe una diferencia estadística de tamaño entre los tratamientos 4 (plátano seda y agua de coco 10%) con 12 mm, supera a los tratamientos T3 (fertilizante foliar 11-8-6 y agua de coco 20%) con 11mm, que supera a T1 (fertilizante foliar 11-8-6 y agua de coco 10%) con 10,2 mm, estos valores indican que las plántulas de ***Cattleya sp***. se desarrollan mejor en un medio de cultivo con la adición de agua de coco y plátano.

(Padilla, E. 2008**)** menciona que para la orquídea ***Cattleya sp,*** existe una mínima diferencia con respecto al número de raíces entre los tratamientos 4 (plátano seda y agua de coco 10%) con 2,5 mm, y el T3 (fertilizante foliar 11-8-6 y agua de coco 20%) con 2.2mm, que supera a T1 (fertilizante foliar 11-8-6 y agua de coco 10%) con 2 mm, estos valores indican que las plántulas de ***Cattleya sp***. Se desarrollan mejor en un medio de cultivo con la adición de agua de coco y plátano.

(Padilla, E. 2008) menciona que los costos de los medio de cultivo para desarrollo y enraizamiento van desde tratamiento 0 (M & S modificado por **León, M. 1995**) con S/. 17,96 el litro de medio de cultivo, T1 con S/. 14,03 el litro, T3 con S/. 12,22 el litro y T4 con S/. 14,12 el litro, los mejores resultados obtenidos en la investigación fueron T0, T3 y T4, esto indica que el T0 resulta más costoso que el tratamiento T3 y T4.

1.2 Bases teóricas

1.2.1 *Cattleya rex*

(Dresler ,1990) clasifica a la orquídea de la siguiente manera

Reyno	: Plantae
Sub reyno	: Embriofitos
Phylum	: Traqueofitas
Sub phylum	: Pterosidos
Clase	: Angiospermas
Sub clase	: Monocotiledoneas :
Orden	:Microsperma
Sub orden	: Ginandras
Familia	: Orquídeas
Género	: Cattleya
Especie	: rex

Planta epifita. **Pseudobulbos**, aproximadamente cilíndricos a fusiformes, de hasta 35 cm de longitud, unifoliados en el ápice. Hojas oblongas o elíptico-oblongas, obtusas, coriáceas. **Inflorescencia** en racimo terminal, el pedúnculo se inicia más o menos oculto por una notoria espata conduplicada de hasta 12 cm de longitud. **Flores** en número de 3 a 8 muy grandes y vistosas, de hasta 17 cm de longitud, los sépalos y pétalos de color cremoso y el labelo coloreado con amarillo y rojo**.(Rolando,1990).**

Distribución: Perú, en el departamento de San Martin entre 800- 1,200 msnm.

Época de floración: Diciembre a marzo.

1.2.2 Cultivo in vitro

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Roca & Mroginski, 1991**).**

El enorme potencial que posee esta metodología ha propiciado que en los últimos 25 años se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo de tejidos, para la producción comercial de plantas ornamentales y frutales a lo que ha motivado que algunos floricultores la estén utilizando como una alternativa viable en sus programas de producción (Aceves & Hernández, 1997). Esta técnica es conocida como cultivo in vitro, cultivo aséptico y micropropagación o cultivo de meristemos, sin embargo estos dos últimos términos pueden dar lugar a confusiones (Montoya, 1991).

El fundamento teórico del cultivo in vitro es el concepto de la totipotencialidad celular. La totipotencia es la capacidad que tiene una célula somática de regenerar un planta completa e igual a la planta madre. La célula y el núcleo contiene los planos (genes) que van a hacer que las plantas se regeneren. El cultivo de tejidos fue considerado inicialmente como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, estas dificultades de los comienzos están hoy en día prácticamente superadas gracias a factores como la disponibilidad de antibióticos, los medios de composición definida, las

instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadoras estériles), dispositivos de cultivo (botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas) (Reina, 2003).

1.2.3 Micropropagación

La micropropagación es la tecnología más difundida de propagación masiva de plantas vía organogénesis. Consiste en un conjunto de procedimientos asépticos de cultivo de órganos, tejidos o células que permitan la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan (Krikorian, 1991).

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales in vitro, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street 1977, Calva y Ríos 1999).

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión. (Calva C. G. et al., 2005).Los cultivos se mantienen bajo las mismas condiciones físicas y fisicoquímicas usadas para la inducción de callos. Los cultivos de órganos se puede rediferenciar hasta plantas completas (micropropagación) que luego se transfieren a invernadero. La temperatura de los cultivos generalmente se controla entre 25 y 28 °C, el pH entre 5,2 y 6,5 y la luz de 0 a 12.000 lux (Calva y Ríos 1999, Seabrook 1980, Martin 1980, Yasuda et al., 1972).

Las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes. Aunque en una misma

planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta. Además, las plantas adultas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos in vitro (Calva y Ríos 1999, Seabrook 1980, Street, 1977).

1.2.4 Medio de cultivo

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 substancias 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 (Martin 1980, Yasuda et al., 1972, Calva y Ríos 1999) y las condiciones físicas y fisicoquímicas de los procesos (Fowler 1982, Rhodes et al., 1987) 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.

Los primeros medios utilizados en cultivo de células y tejidos vegetales fueron semisintéticos. Frecuentemente contenían extractos o complejos orgánicos como agua de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura. Actualmente, la mayoría de los medios son de composición conocida, estando constituidos básicamente por cinco grupos de ingredientes: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, vitaminas y reguladores del crecimiento que in vivo son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan (Seabrook 1980, Yasuda et al., 1972). Las fuentes de nitrógeno más comunes son el nitrato y amonio, pero también se han utilizado urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos, entre otros. La fuente de carbono más empleada es la sacarosa o glucosa y en menor grado la maltosa, galactosa, almidón y melaza. Los micronutrientes, generalmente adicionados al medio de cultivo en forma de sales, son utilizados por las células como cofactores enzimáticos, como el molibdeno para la nitrato reductasa y el

magnesio para algunas cinasas (Murashige y Skoog 1962, Shenk y Hildebrandt 1972). Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (Krikorian, 1991).

1.2.4.1Composición del medio de cultivo a utilizar

1.2.4.1.1 Azúcar

La presencia de azúcar en el medio nutritivo, es esencial para el desarrollo de una planta in vitro (Pierik, 1990) debido a que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo, suele ser insuficiente para satisfacer la demanda de carbono por la planta. Esto, se relaciona con que los tejidos verdes in vitro no son suficientemente autotróficos, con que la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera del tubo de cultivo no es siempre la más adecuada (Gidson, 1967) y con una iluminación insuficiente. En consecuencia, la planta in vitro necesita tomar carbono del medio de cultivo para satisfacer sus necesidades. Venketeswaren (1965), Vasil y Hildebrandt (1966) y Grout y Crisp (1977) intentaron inducir autotrofismo en la planta in vitro sin gran éxito. Chaumont y Gudin (1985) lograron cultivos autotróficos in vitro, aunque de poca calidad, por adición al tubo de ensayo de CO2. (Galzy y Compman, 1992) cultivaron in vitro especies de vid, Viii.\" rupeslris y Viii.\" vinijera en condiciones fotoautotróficas (medio sin sacarosa) después de haberlas cultivado durante 34 días en medio con sacarosa. Es decir, iniciaron el cultivo tipo autotrófico después de haber obtenido una planta completa por cultivo no autotrófico, y no obstante las plantas finales no fueron de buena calidad. Se deduce de lo indicado

que el cultivo autotrófico in vitro es caro, difícil y de resultados inciertos, por lo que la presencia de azúcar en el medio nutritivo es el mejor sistema para complementar el nivel adecuado de carbono a la planta. La sacarosa a concentraciones entre 1 y 5%, según el tipo de material vegetal, es el azúcar más usado en el cultivo in vitro. No obstante, también se pueden utilizar otros azúcares como glucosa, fructosa etc. La nutrición heterotrófica del carbono a partir de sacarosa en el medio, implica la hidrólisis del azúcar por la planta **(Galzy, 1985 y 1990 Y Lees y cols, 1991)**. Aunque de antemano no es posible definir la concentración óptima de sacarosa en el medio, se sabe que cuando ésta es elevada, tiende a disminuir la capacidad fotosintética.

1.2.4.1.2 Vitaminas

Las vitaminas en el cultivo de tejidos han sido consideradas como nutrientes orgánicos suplementarios no indispensables para el desarrollo de la planta; no obstante, su inclusión en el medio in vitro ha determinado mejoras importantes en la calidad de los tejidos en cultivo. Desde que se hicieran los primeros intentos de cultivo de tejidos por Sacks, Knops y Hamberlandt a fines del siglo XIX (Dodds & Roberts, 1988); han sido diversos los estudios referidos al empleo de vitaminas y otros micronutrientes orgánicos, en la búsqueda de las condiciones ideales del cultivo in vitro. Entre los primeros trabajos, se observó que los requerimientos de ciertas substancias orgánicas en pequeñas cantidades, era satisfecha por suplementos ‘no definidos’ encontrados en jugos de frutas, extractos de levaduras, caseína hidrolizada, y leche (George & Sherrington, 1984). Por ejemplo, (White, 1934), al lograr un crecimiento activo en el cultivo de ápices de raíz de tomate con el uso exitoso de sales orgánicas, extracto de levadura y sacarosa en un medio líquido, demostró que el extracto de levadura podía ser sustituido por tres vitaminas del grupo B: **Tiamina**, Piridoxina y Niacina. Las ventajas de la adición de **tiamina** sobre el crecimiento, fueron también reportadas por Bonner y por Robins & Bartley en la década de los

treinta **(citados por George & Sherrington, 1984)**. A esto siguió el descubrimiento de la importancia de la inclusión del ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico, mio-inositol, ácido fólico, y otros en la diversas aplicaciones, como la proliferación de tejidos, producción de callos, retardamiento de la proliferación de tejidos en la oscuridad, etc. (George & Sherrington, 1984). El estudio del complejo utilizado por White en 1934, y Bonner en 1937-38, fue retomado por varios investigadores, entre los que destacan Murashige y Skoog (MS) (1962), quienes emplearon una mezcla de tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y glicina, así como (Gambord et al. 1976, 1981), quienes emplearon ácido nicotínico y piridoxina, logrando estimulación en el crecimiento, recomendando en ambos casos la adición de estas al medio nutritivo. Otras investigaciones indican también la importancia de las vitaminas de MS en el cultivo in vitro como las de (Digby & Skoog, 1966) quienes reportaron la importancia de la tiamina en el cultivo de callos, en ausencia de citoquininas.

En la actualidad, son diversas las opiniones sobre el uso de vitaminas en el cultivo de tejidos, ya que las plantas sintetizan sus propias vitaminas. Algunos, piensan que se debería cuestionar, si la adición frecuente de vitaminas en el cultivo in vitro es necesaria (Pierik, 1990). Sin embargo, se conoce que la capacidad biosintética de vitaminas en cultivo de tejidos vegetales in vitro, puede ser bastante distinta a la capacidad biosintética en plantas in vivo. Por esta razón es que las vitaminas son incluidas en el medio de cultivo de tejidos vegetales (Biotol, 1994; George & Sherrington, 1994).

1.2.4.1.3 Agua de coco

En un esfuerzo por iniciar y mantener la proliferación de los tejidos normales del tallo en cultivo se probaron una gran cantidad de sustancias. Se encontró que había materiales tan distintos como extractos de levadura o jugo de tomate que tenían un efecto positivo, al menos en algunos tejidos. Sin embargo, la mayoría de las estimulaciones bruscas ocurrían cuando se agregaba al medio de

cultivo el **endospermo líquido del coco**, también conocido como agua de coco.

El medio nutritivo de Philip White complementado con una auxina y entre un 10 y 20% de agua de coco mantenían la división de las células de tallo maduras y diferenciadas de una gran variedad de especies y su continua proliferación formaba el tejido calloso (Caplin y Steward 1948). Este descubrimiento indicaba que el endospermo líquido del coco contenía una o más sustancias que estimulaban a las células maduras a entrar y permanecer en el ciclo de división celular. Posteriormente, se demostró que el agua de coco contiene la citoquinina conocida como zeatina, pero este hallazgo no se produjo hasta años después del descubrimiento de las citoquininas (Letham, 1974).

(Arditti y Ernest, 1993), usaron varios aditivos para el cultivo in Vitro, tal es el caso del agua de coco, la cual posee una gran cantidad de componentes, entre ellos encontramos algunas fitohormonas con diferentes concentraciones como: auxinas, citoquininas y giberelinas y, se ha usado rutinariamente en un sin número de métodos de propagación. (Espinoza, 2001).

1.2.4.1.4 Fertilizante foliar

Si bien se considera que existen 13 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, la determinación de los niveles óptimos es compleja (Niedz y Evens, 2007). En 1962, Toshio Murashige y Folke Skoog desarrollaron, basándose en el contenido de compuestos inorgánicos de las hojas de tabaco (***Nicotiana tabacum*** var. Wisconsin 38), un medio de cultivo que permitió el crecimiento y desarrollo satisfactorios de callos de tabaco. Luego de su publicación (Murashige y Skoog, 1962), este medio, conocido como MS empezó a ser utilizado extensivamente en una gran cantidad de especies vegetales, a veces muy distantes taxonómicamente del tabaco, y en una gran diversidad de estructuras vegetales. Gran parte del éxito de este medio, se debe a los niveles altos en sales de amonio, fosfato y de potasio; los cuales han probado ser críticos en los procesos

organogénicos de la mayoría de especies estudiadas (Hughes 1986, Pierik, 1987). En la actualidad, el MS es el medio de cultivo más utilizado para el cultivo in vitro de plantas (George y de Klerk, 2008). Esto porque aunque no contiene necesariamente las cantidades óptimas para todos los explantes, de las diversas especies en que se emplea, la mayoría presentarán cierto grado de crecimiento, lo que representa un punto de partida (Niedz y Evens, 2007). (Zimmerman et al., 1995) mencionan que el costo económico de los diferentes componentes de un medio de cultivo, tanto para laboratorios de investigación como para los comerciales, es un criterio importante en la toma de decisiones. Datos de la (IAEA, 2004), indican que en los países en vías de desarrollo, el costo de los ingredientes del medio de cultivo (sales minerales, azúcar, agente gelificante y agua), la mano de obra, y la energía eléctrica representan de 30-35% del costo de producción.

Se han realizado varios intentos para reducir costos en la preparación de medios de cultivo, pero estos se han enfocado principalmente a sustituir los azúcares y agentes gelificantes por fuentes más baratas (Ganapathi et al., 1995, Jain y Babbar 2002, Leite et al., 2002, Lucyszyn et al., 2006, 2007, Tyagi et al., 2007, Vieira et al., 2007). Adicionalmente, se ha buscado sustituir completamente las soluciones nutritivas por otras con menor contenido de nutrimentos, aunque utilizando productos con grado reactivo. Si bien (Hurtado y Merino, 1997), consideran que la pureza de los ingredientes de un medio de cultivo es un factor crítico, y mencionan la necesidad de que los reactivos utilizados sean de calidad “químicamente pura”, también se ha intentado la sustitución completa de medios de cultivo clásicos por medios mucho más baratos, utilizando fertilizantes foliares para ese fin**.** (Gutiérrez, 1996), utilizó el fertilizante 7-6-19 para aportar las sales minerales al medio de enraizamiento de meristemos de Cattleya sp. Por su parte, (Pollock y Oppenheimer, 1999), utilizaron el fertilizante 20-10-20 en el cultivo de semillas de Arabidopsis thaliana, con la finalidad de reducir costos.

1.2.5 Cultivo en medio liquido

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 a 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 stress por oxidación y vitrificación (Damiano et al., 2003).

1.2.6 Sistema de inmersión temporal

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

Una unidad de inmersión temporal utilizada normalmente consiste en dos recipientes interconectados por tubos de silicona (Jiménez et al., 1999). Uno se usa para la mantención del medio y el otro para el cultivo de los explantes. Para la ventilación se ajusta 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 conectado a válvulas solenoides.

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 al recipiente de mantención. Con este sistema los explantes son inmersos en el medio de cultivo sólo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes por toda su superficie (Alvard et al., 1993**)**. El intercambio gaseoso se restaura cuando el medio de cultivo es trasladado a recipiente de mantención.

Las ventajas de mantener un cultivo en un SIT incluyen tres aspectos: un mayor contacto entre la biomasa vegetal y el medio, la inexistencia de restricciones en el intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio, así como la de la atmósfera dentro del biorreactor (Ziv, 1995). 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). Otros estudios realizados en caña de azúcar (***Sacharum spp***.) mostraron una tasa de

multiplicación de 8,13 ± 0,6 explantes cuando se cultivó en SIT, comparada con 4,0 ± 0,8 versus el cultivo en medio semisólido (Lorenzo et al., 1998).

Para el funcionamiento efectivo de un SIT deben existir condiciones óptimas de cultivo (Ackermann et al., 2003); 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. Estos factores se deben determinar para cada especie y etapa de desarrollo.

1.2.6.1 Factores que influyen en el cultivo in vitro mediante el Sistema de Inmersión Temporal automatizado RITA

1.2.6.1.1 Frecuencia y tiempo de inmersión.

Estudios realizados por (González, 2003) demuestran que el efecto de la frecuencia de inmersión en el desarrollo de brotes puede explicarse por la disponibilidad de los nutrientes. Salisbury, citado por (González, 2003), indica que utilizar una mayor frecuencia de inmersión puede presentar efectos como una baja en la concentración de oxígeno. El choque osmótico sufrido por los explantes durante cada inmersión en el medio de cultivo, posiblemente a mayor frecuencia los tejidos sufran un nivel de estrés que afecte la respuesta del explante (Maya, citado por González 2003). En sistemas de inmersión temporal de cultivo con tejido, es evidente que el tiempo de inmersión es muy importante, puesto que regula la absorción de nutrientes y expresión de hiperhidricidad. Los tiempos de inmersión utilizados para diferentes trabajos varían considerablemente; esto es probablemente debido a la gran variedad de especies, procesos y sistemas de micropropagación de inmersión temporal utilizado. Los largos tiempos de inmersión (1 h cada 6 h) demuestran ser eficaces para la tuberización de papa, mientras que los cortos tiempos de inmersión (1 min cada 12 h) estimulan la producción de embriones somáticos más en el café y el caucho (Berthouly y Etienne, 2005). (Krueger et al., citados Berthouly y Etienne, 2005), mostraron la importancia de

las inmersión para la proliferación de brotes. Se observaron hiperhidricidad con inmersiones de 5 min cada 30 min, pero no se observó con inmersiones durante 5 min cada 60 min. Por otra parte, la primera combinación es mejor para el número de brotes obtenidos.

1.2.6.1.2 La aireación

La aireación es uno de los factores más influyentes sobre la propagación in vitro mediante sistemas de inmersión temporal. En primer lugar debido al ingreso del flujo de aire a los envases del SIT se acciona el mecanismo de cada ciclo de inmersión que eventualmente mantendrá a los explantes en contacto con el medio de cultivo líquido. (Ziv, citado por Albarracín, 2012), señala que el empleo de biorreactores con levantamiento de aire presenta un aumento en la proliferación de yemas meristematicas y una reducción de los cortes de los tejidos siendo este el resultado deseado al propagar plántulas mediante SIT.

1.2.6.1.3 Turbulencia

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de traslado de medio de cultivo de un recipiente al otro en el sistema de inmersión temporal es accionado por la presión de un flujo de aire de entrada ejercida mediante el compresor por las válvulas de carga y descarga, generando así dicho mecanismo; de allí que el SIT es considerado bajo estas condiciones un biorreactor agitado por flujo de aire, lo que implica que esta entrada de aire genere turbulencia (Albarracín, 2012**).** La turbulencia o efecto de la agitación puede constituirse en un problema para el cultivo de células o tejidos en suspensión debido a la formación de grupos o agregados los cuales afectan a la agitación, por lo tanto a la difusión del oxígeno (Pérez, citado por Albarracín, 2012). Además si en un ciclo de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal, la turbulencia generada es excesiva, esto puede causar la destrucción del tejido. Por ello, dicho factor debe ser controlado adoptando diversas medidas que

reduzcan la afectación del cultivo tales como: el empleo de una presión de flujo de aire correcta que será determinada para cada tipo de cultivo y especie de interés, un control mediante variaciones en la composición del medio de cultivo que eviten la formación de agregados celulares y además la manipulación durante los subcultivos (Pérez, citado por Albarracín, 2012).

1.2.6.1.4 Volumen y renovación del medio líquido

Es particularmente importante optimizar el volumen del medio de cultivo líquido por explante cuando se utiliza sistemas de inmersión temporal, tales como sistemas RITA. (Lorenzo et al., citados Berthouly y Etienne, 2005)**,** encontraron que multiplicando por 10 veces el volumen de medió de cultivo para brotes de caña de azúcar, se incrementaba el coeficiente de multiplicación de 8,3 brotes por explante a 23,9 brotes transcurridos 30 días. Sin embargo, el volumen de medio utilizado no afectó la longitud de los brotes formados. Los mayores volúmenes demuestran ser menos eficiente. Utilizando el mismo sistema de inmersión temporal, (Escalona et al., citado por Berthouly y Etienne, 2005), demostraron de manera similar con piña que un volumen de medio de cultivo óptimo para la proliferación de brotes, que se estimó es 200 ml por explante para esa especie. En este caso, volúmenes más grandes también condujo a una caída en la tasa de proliferación.

1.2.6.1.5 Acumulación de biomasa

Como se mencionó anteriormente, el empleo de medio de cultivo liquido en las diferentes etapas de la micropropagación favorece el desarrollo de explantes y tal como se ha reportado para diferentes especies vegetales existen incrementos significativos de la tasa de proliferación (Bermúdez et al., citado por Albarracín, 2012). Sin embargo, se ha citado también la acumulación de biomasa como factor altamente influyente en el cultivo mediante este tipo de técnica como los sistemas de inmersión temporal. La acumulación

de excesiva biomasa en los Sistemas Inmersión Temporal se presenta principalmente por factores como excesivo desarrollo y crecimiento de los propágulos una vez trascurrido el ciclo de multiplicación. Dicho crecimiento puede afectar el índice de multiplicación y disminuirlo considerablemente, por ende, la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal también se vería afectado.

(Bermúdez et al., citado por Albarracín, 2012), han señalado que el uso de retardantes de crecimiento en los medios de cultivo logran disminuir el crecimiento de hojas y estimulan la producción de nuevos brotes disminuyendo la probabilidad de afectación sobre el coeficiente de proliferación debido a acumulación de biomasa.

1.2.6.2 Ventajas del sistema de inmersión temporal

Disminuye los costos de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio. Permite una mejor nutrición mineral, por el contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión por capilaridad, ya que una fina película de medio se mantiene sobre los explantes. Existe una fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente, ya que permite una renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión. También permite una mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas y mayor control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia de las inmersiones (González, 2003). Permite la protección de cada recipiente contra la contaminación por medio del uso de filtros, además la manipulación individual es fácil y anula los riesgos de contaminación cruzada (CIRAD, citado por González, 2003).

1.2.6.3 Principales problemas en el sistema de inmersión temporal. Se ha encontrado también que este tipo de sistemas presenta ciertos problemas en cuanto al desarrollo de los cultivos de interés. En la actualidad, este sistema ha alcanzado una alta automatización y se han logrado

contrarrestar algunas desventajas producidas al emplearlo; sin embargo, entre los principales inconvenientes con los que los investigadores se han encontrado frecuentemente están aquellos relacionados con la fisiología del cultivo después de efectuados los ciclos de inmersión además del mantenimiento de la calidad genética de una determinada especie vegetal en estudio y el difícil mantenimiento de la asepsia en los recipientes (Preil y Hvoslef-Eide, citado por Albarracín, 2012.

1.3 definición de términos

- ✓ **Asepsia.** Conjunto de métodos aplicados para la conservación de la esterilidad.
- ✓ **Conservación ambiental.** Proteger y preservar el futuro de la naturaleza, el medio ambiente o específicamente algunas de sus partes.
- ✓ **Endospermo.** Es un tejido nutritivo que se encuentra a un lado o rodeando completamente al embrión.
- ✓ **Enrazar.** Agregar, nivelar con agua o solución.
- ✓ **Epifita.** Cualquier planta que crece sobre otro tipo de planta o árbol, pero que no lo parasita.
- ✓ **Explante.** Tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento.
- ✓ **In vitro.** Cultivo en vidrio.
- ✓ **RITA.** Recipiente de inmersión temporal automatizado.
- ✓ **Hiperhidricidad.** Trastorno fisiológico que se produce en cultivos de tejidos de plantas caracterizados por alta retención de agua a causa de condiciones adversas de los cultivos.
- ✓ **Protocolo.** Son los procedimientos a ser utilizados para la observación, análisis e interpretación de los resultados de una investigación.
- ✓ **Pseudobulbo.** Es un órgano de almacenamiento que deriva de parte de un tallo entre dos nódulos de hojas.

CAPÍTULO II
MATERIAL Y MÉTODOS

2.1Material

Material de vidrio

- Cajas de petri
- Botellas para cultivo
- Botellas para reactivos y soluciones madres
- Probetas graduadas
- Goteros
- Mechero
- Pipeta

Materiales de metal

- Bisturís y hojas de bisturí
- Pinzas
- Espátulas y cucharas

Equipos específicos

- Horno para secado
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Refrigerador y congelador
- Balanza analítica digital
- Aire acondicionado
- Estufa
- Compresora
- Medidor de pH

Otros materiales

- Baldes de plástico
- Recipientes de plástico
- Papel A4
- Papel aluminio
- Papel milimetrado
- Hilo pabilo
- Tijeras
- Plumón
- Encendedor
- Algodón
- Alcohol
- Tubos de silicona
- Filtros y válvulas de aire
- Cinta polystrec

Material vegetal

- Agua de coco.
- Cattleya rex. El material vegetativo de la ***Cattleya rex*** que se utilizó para la investigación se obtuvo del cuarto de crecimiento del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Corporación G y G E.I.R.L. en fase de multiplicación proveniente de medio semisólido MS adicionado con, Ácido nicotínico 0,5 mgL^{-1}, tiamina 0.4 mgL^{-1}, sacarosa 20 gL^{-1} y endospermo líquido de coco 100 mlL^{-1}; ajustado a un pH de 5,1 – 5,4. Se seleccionaron trece explantes con una altura promedio de 2.00 cm, estos fueron cortados y separados de la base, desechando las partes necróticas y oxidadas. **(Ver foto 1)**.

Foto 1: Explantes sometidos a SIT.

2.2 Métodos

La investigación de tipo aplicada fue conducida bajo un diseño completamente aleatorio

(Calzada, 1998), dado que se evaluó la cantidad de agua de coco para la buena propagación de la ***Cattleya rex*** (orchidaceae). Este diseño tiene la siguiente ecuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + £_{ij}$$

Dónde: **Yij** = Variable respuesta del i-ésimo tratamiento del medio de cultivo como factor.

μ = Media general del factor.

Ti = Efecto del i-ésimo tratamiento de los factores (medio de cultivo).

£ij = Efecto aleatorio del error.

Tabla 1

Análisis de variancia:

Fuente de Variabilidad	Grados de libertad
Tratamientos	4-1 =3
Error experimental	3(4-1)=12
Total	4,4-1=15

La población en la investigación son 1000 explantes del laboratorio corporación G y G E.I.R.L. de la especie ***Cattleya rex*** (orchidaceae) en etapa de multiplicación.

Para la determinación del tamaño de muestra, se tomaran un promedio de 117 explantes de ***Cattleya rex***, 13 por cada repetición y 52 explantes por cada tratamiento.

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 y distrito Moyobamba.

Sistema de inmersión temporal

Para el sistema de inmersión temporal en medio líquido. Se utilizaron dieciséis sistemas con inmersión temporal. Cada uno estuvo conformado por dos frascos con un volumen de 1000 ml de capacidad. **(Ver foto 2).** A las tapas de los frascos se les hizo dos agujeros en donde se introdujeron dos mangueras huecas de silicona autoclavables con un diámetro de ½ pulgadas. Para que el aire no entre por las rendijas que quedaron entre la tapa y la manguera de silicona se sellaron con silicona líquida**. (Ver foto 3)**

***Foto 2*:** frascos de 1000 ml cap**.**

Foto 3: tapa de los frascos

Una de las mangueras se encargaba de introducir y de expulsar el aire del interior del frasco. Dentro del frasco el extremo inferior de la manguera sobresalía con una longitud de 1,00 cm sin tocar el fondo del frasco y en el extremo superior der la manguera sobresalía con una longitud de 11 cm y al extremo de este se colocó un filtro de aire microporo de la marca ¨Millipore ®¨ con una membrana de 0,2 µ de espesor, y este a su vez se conectaba con una manguera de 12 cm a la válvula de aire. **(Ver foto 4)** La otra manguera de silicona tenía el mismo diámetro que la antes mencionada y la funcionalidad era de conectar y transportar el medio de cultivo líquido de un frasco a otro y viceversa debido a la diferencia de presión generada al interior de los frascos, la manguera tenía una longitud total de 88 cm además fue moldeado en forma de ¨U¨ para que entren al interior hasta tocar el fondo del frasco. La presión de aire fue generada por una bomba de vacío con encendido automático. **(Ver foto 5)**

Foto 4: filtro de aire, válvulas de aire y mangueas de silicona

Foto 5: manguera de conexión entre los dos frascos

La frecuencia de inmersión fue cada 6 horas, 4 inmersiones/día, durante un tiempo de inmersión de 10 minutos similar al de (Basail M., et al., 2012.)

Evaluaciones realizadas

Número de brotes

Se evaluó el número de brotes por cada explantes, tomándose el promedio de brotes/SIT, esto a los cuatro SIT evaluados en cuatro (4) tratamientos, para luego realizar el análisis de varianza y prueba de Duncan.

Altura de brotes

Se evaluó la altura de los brotes, tomándose la longitud de los brotes con un papel milimetrado obteniéndose un promedio final que representara la altura de brotes/SIT, esto a los cuatro SIT evaluados en cuatro (4) tratamientos, para luego realizar el análisis de varianza y prueba de Duncan.

Número de raíces

Se evaluó el número de raíces, donde se procedió a contar el numero de raíces de cada plántula, obteniéndose un promedio final de raíces/ SIT, esto a los cuatro SIT evaluados en cuatro (4) tratamientos, para luego realizar el análisis de varianza y prueba de Duncan.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

3.1.1 Elaboración de protocolos de cultivo in vitro

Protocolo 1: tratamiento 0 **(T0)**: medio casero sin agua de coco

Esterilización del SIT

- Los frascos utilizados para el SIT se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar por un tiempo de 20 min aproximadamente. Luego los frascos se taparon con papel aluminio seguidamente con papel reciclado, fueron amarrados con hilo pabilo y metidos en bolsa de polipropileno. **(Ver foto 6).** Luego se procedió a autoclavarlos a 121° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos.
- Para el sistema de mangueras de silicona (incluido los filtros) se taparon con papel aluminio en el extremo de cada manguera, luego se les puso dentro de una bolsa de polipropileno y se les metió al autoclave a 121° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos. **(Ver foto 7).**

***Foto 6*:** frasco listo para la esterilización

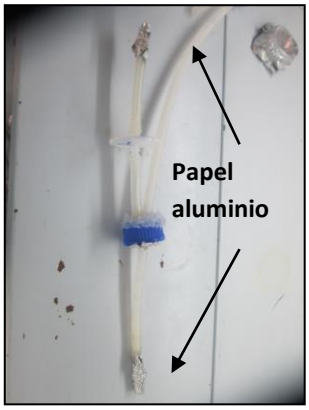


Foto 7: mangueras tapadas con papel aluminio

Traspaso del medio (verter en los frascos)

- Primero se enjuagaron las botellas y se desinfectó con 0.5 % de lejía y se los dejó secar.
- Después se procedió a llenar las botellas, 520 ml de medio por cada frasco.
- Luego se procedió a tapar las botellas con papel aluminio y papel reciclado.
- Se colocaron suavemente las botellas en una autoclave para su esterilización.

- Cabe señalar que la misma cantidad de las botellas con medio de cultivo se autoclavaron sin medio de cultivo. Se autoclavaron las botellas a 121 °C, a 1 atm por un tiempo de 15 min.

Preparación del trabajador

Es obligatorio el lavado de las manos y uñas con un jabón antiséptico y cepillo, que se realizara antes de manipular los objetos dentro de la cámara de flujo laminar.

Los equipos de protección individual que se utilizaron fueron:

- Gorro
- Bata o guardapolo
- Guantes de lates (si es necesario)
- Mascarilla con filtro
- Lentes

Limpieza y uso de la cámara de flujo laminar

Lo primero que se hizo al entrar al área de trabajo previamente barrido, es prender la lámpara de rayos ultravioleta-C ya que tienen una acción germicida lo cual esteriliza el recinto y su contenido cuando se utiliza. Es importante apagar la lámpara durante la utilización ya que rápidamente se producirían quemaduras de sol en la piel expuesta.

Luego de unos 10 minutos aproximadamente se apaga la luz ultravioleta para el uso de la cámara.

Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a colocar los siguientes materiales:

- Alcohol en un envase de vidrio para la esterilización de los instrumentos (pinzas y bisturís) y alcohol en un frasco con espray para la desinfección de las manos.
- Mechero de vidrio con alcohol.
- Cajas petri previamente esterilizadas y pegadas en la base papel milimetrado para la medición de los explantes.
- frascos madres conteniendo el material vegetativo que se va trabajar.
- Lapicero y papel para la toma de apuntes.

Traspaso de los explantes de los frascos madres al SIT.

Una vez puestos todos los materiales en la cámara, se procedió a abrir los frascos madre conteniendo los explantes, se los colocó en una caja petri y se fue seleccionando cada uno tomando siguientes consideraciones de los explantes:

–Que no tengan ni una raíz
–Que el tamaño de las plántulas oscile entre 1.9 y 2.00 centímetros
–Que no tenga ni un brote.

Después se procedió a colocar los explantes seleccionados en uno de los frascos que se utilizó para el SIT.

Luego se procedió a colocar las tapas con las mangueras de silicona a los frascos sellando las tapas con cinta polystrec.

Por último se procedió a trasladar los biorreactores (SIT) al área donde se llevara a cabo el trabajo de estudio.

Los componentes y cantidades para el T0 se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Componentes y cantidades del T0

Insumos	Unidad de medición	Cantidad /litro
Complejo B	Ml	3
Fertilizante Bayfolan (11-8-6)	ml	7,1
Azúcar	Gr	20
Agar –agar	Gr	-----
Carbón vegetal molido	Gr	-----
Agua de coco	Ml	-----
Agua destilada	Ml	1000
pH		5,1-5,4
Volumen	Ml	1000

Fuente: Padilla, 2008.

Protocolo 2: tratamiento 1**(T1)**: medio casero + 10% agua de coco

La esterilización y los demás procedimiento se realizaron siguiendo los pasos del protocolo 1

Esterilización del SIT.

- Los frascos utilizados para el SIT se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar por un tiempo de 20 min aproximadamente. Luego los frascos se taparon con papel aluminio seguidamente con papel reciclado, fueron amarrados con hilo pabilo y metidos en bolsa de polipropileno. Luego se procedió a autoclavarlos a 121 ° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos.
- Para el sistema de mangueras de silicona (incluido los filtros) se taparon con papel aluminio en el extremo de cada manguera, luego se les puso dentro de una bolsa de polipropileno y se les metió al autoclave a 121 ° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos.

Traspaso del medio (verter en los frascos)

- Primero se enjuagaron las botellas y se desinfectó con 0.5 % de lejía y se los dejó secar.
- Después se procedió a llenar las botellas, 520 ml de medio por cada frasco.
- Luego las botellas se taparon con papel aluminio seguidamente con papel reciclado, fueron amarrados con hilo pabilo y metidos en bolsa de polipropileno.
- Se colocaron suavemente las botellas en una autoclave para su esterilización.
- Cabe señalar que la misma cantidad de las botellas con medio de cultivo se autoclavaron sin medio de cultivo. Se autoclavaron las botellas a 121 °C, a 1 atm por un tiempo de 15 min.

Preparación del trabajador

Es obligatorio el lavado de las manos y uñas con un jabon antiséptico y cepillo, que se realizara antes de manipular los objetos dentro de la cámara de flujo laminar.

Los equipos de protección individual que se utilizaron fueron:

- Gorro
- Bata o guardapolo
- Guantes de lates (si es necesario)
- Mascarilla con filtro
- Lentes

Limpieza y uso de la cámara de flujo laminar

Lo primero que se hizo al entrar al área de trabajo previamente barrido, es prender la lámpara de rayos ultravioleta-C ya que tienen una acción germicida lo cual esteriliza el recinto y su contenido cuando se utiliza. Es importante apagar la lámpara durante la utilización ya que rápidamente se producirían quemaduras de sol en la piel expuesta.

Luego de unos 10 minutos aproximadamente se apaga la luz ultravioleta para el uso de la cámara.

Por precaución con un pedazo de algodón empapado de alcohol, limpiar toda la base de la mesa incluyendo las paredes de la cámara de flujo laminar.

Una vez dentro de cámara de flujo laminar se procedió a colocar los siguientes materiales:

- Alcohol en un envase de vidrio en la cual se colocan las pinzas y bisturís.
- Alcohol en un frasco con espray para la desinfección de las manos. Esto se realiza si es posible cada vez que se retiran las manos fuera de la cámara.
- Mechero de vidrio con alcohol para flamear los instrumentos.
- Cajas petri previamente esterilizadas y pegadas en la base papel milimetrado para la medición de los explantes.
- frascos madres conteniendo el material vegetativo que se va trabajar.
- Lapicero y papel para la toma de apuntes.

Traspaso de los explantes de los frascos madres al SIT.

Una vez puestos todos los materiales en la cámara de flujo, se procedió a colocar los explantes en uno de los frascos que se utilizó para el SIT previamente tomando las siguientes consideraciones de los explantes **(ver foto 8):**

–Que no tengan ni una raíz
–Que el tamaño de las plántulas oscile entre 1.9 y 2.00 centímetros
–Que no tenga ni un brote.

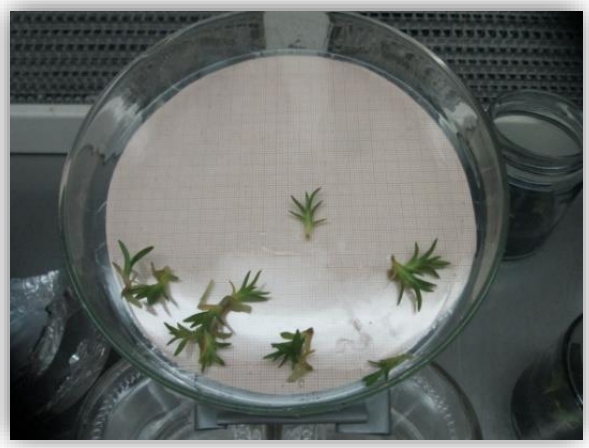


Foto 8: explante seleccionado

Luego se procedió a colocar las tapas con las mangueras de silicona a los frascos sellando las tapas con cinta polystrec.

Por último se procedió a trasladar los biorreactores (SIT) al área donde se llevara a cabo el trabajo de estudio.

Los componentes y cantidades del medio de cultivo para el T1 se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Componentes y cantidades del T1

Insumos	**Unidad de medición**	**Cantidad /litro**
Complejo B	ml	3
ante Bayfolan (11-8-6)	ml	7,1
Azúcar	Gr	20
Agar –agar	Gr	-------
Carbón vegetal molido	Gr	-------
Agua de coco	Ml	100
Plátano seda	Gr	--------
Agua destilada	Ml	1000
Ph		5,1-5,4
Volumen	Ml	1000

Protocolo 3: tratamiento 2 **(T2)**: medio casero + 15% agua de coco

La esterilización y los demás procedimiento se realizaron siguiendo los pasos del protocolo 1.

Esterilización del SIT

- Los frascos utilizados para el SIT se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar por un tiempo de 20 min aproximadamente. Luego los frascos se taparon con papel aluminio seguidamente con papel reciclado, fueron amarrados con hilo pabilo y metidos en bolsa de polipropileno. **.** Luego se procedió a autoclavarlos a 121 ° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos.
- Para el sistema de mangueras de silicona (incluido los filtros) se taparon con papel aluminio en el extremo de cada manguera, luego se les puso dentro de una bolsa de polipropileno y se les metió al autoclave a 121 ° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos. **.**

Traspaso del medio (verter en los frascos)

- Primero se enjuagaron las botellas y se desinfectó con 0.5 % de lejía y se los dejó secar.
- Después se procedió a llenar las botellas, 520 ml de medio por cada frasco.
- Luego las botellas se taparon con papel aluminio y papel reciclado.
- Se colocaron suavemente las botellas en una autoclave para su esterilización.
- Cabe señalar que la misma cantidad de las botellas con medio de cultivo se autoclavaron sin medio de cultivo. Se autoclavaron las botellas a 121 °C, a 1 atm por un tiempo de 15 min.

Preparación del trabajador

Es obligatorio el lavado de las manos y uñas con un jabón antiséptico y cepillo, que se realizara antes de manipular los objetos dentro de la cámara de flujo laminar.

Los equipos de protección individual que se utilizaron fueron:

- Gorro
- Bata o guardapolo

- Guantes de lates (si es necesario)
- Mascarilla con filtro
- Lentes

Limpieza y uso de la cámara de flujo laminar

Lo primero que se hizo al entrar al área de trabajo previamente barrido, es prender la lámpara de rayos ultravioleta-C ya que tienen una acción germicida lo cual esteriliza el recinto y su contenido cuando se utiliza. Es importante apagar la lámpara durante la utilización ya que rápidamente se producirían quemaduras de sol en la piel expuesta.

Luego de unos 10 minutos aproximadamente se apaga la luz ultravioleta para el uso de la cámara

Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a colocar los siguientes materiales:

- Alcohol en un envase de vidrio en la cual se colocó las pinzas y bisturís.
- Alcohol en un frasco con espray para la desinfección de las manos.
- Mechero de vidrio con alcohol.
- Cajas petri previamente esterilizadas y pegadas en la base papel milimetrado para la medición de los explantes.
- Embase de vidrio para soporte para colocar las cajas petri.
- frascos madres conteniendo el material vegetativo que se va trabajar.
- Lapicero y papel para la toma de apuntes.

Traspaso de los explantes de los frascos madres al SIT.

Una vez puestos todos los materiales en la cámara, se procedió a colocar los explantes en uno de los frascos que se utilizó para el SIT previamente tomando las siguientes consideraciones de los explantes:

- Que no tengan ni una raíz
- Que el tamaño de las plántulas oscile entre 1.9 y 2.00 centímetros
- Que no tenga ni un brote.

Luego se procedió a colocar las tapas con las mangueras de silicona a los frascos sellando las tapas con cinta polystrec.

Por último se procedió a trasladar los biorreactores (SIT) al área donde se llevara a cabo el trabajo de estudio.

Los componentes y cantidades del medio de cultivo para el T2 se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Composición del medio de cultivo T2.

Insumos	Unidad de medición	Cantidad /litro
Complejo B	ml	3
Fertilizante Bayfolan (11-8-6)	ml	7,1
Azúcar	gr	20
Agar –agar	gr	------
Carbón vegetal molido	gr	------
Agua de coco	ml	150
Agua destilada	ml	1000
pH		5,1-5,4
Volumen	ml	1000

Protocolo 4: tratamiento 3 **(T3)**: medio casero + 20% agua de coco

La esterilización y los demás procedimiento se realizaron siguiendo los pasos del protocolo 1

Esterilización del SIT

- Los frascos utilizados para el SIT se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar por un tiempo de 20 min aproximadamente. Luego los frascos se taparon con papel aluminio seguidamente con papel reciclado, fueron amarrados con hilo pabilo y metidos

en bolsa de polipropileno. Luego se procedió a autoclavarlos a 121 ° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos.

- Para el sistema de mangueras de silicona (incluido los filtros) se taparon con papel aluminio en el extremo de cada manguera, luego se les puso dentro de una bolsa de polipropileno y se les metió al autoclave a 121 ° C, 1 atm de presión por un tiempo de 15 minutos.

Traspaso del medio (verter en los frascos)

- Primero se enjuagaron las botellas y se desinfectó con 0.5 % de lejía y se los dejó secar.
- Después se procedió a llenar las botellas, 520 ml de medio por cada frasco.
- Luego las botellas se taparon con papel aluminio seguidamente con papel reciclado, fueron amarrados con hilo pabilo y metidos en bolsa de polipropileno.
- Se colocaron suavemente las botellas en una autoclave para su esterilización.
- Cabe señalar que la misma cantidad de las botellas con medio de cultivo se autoclavaron sin medio de cultivo.Se autoclavaron las botellas a 121 °C, a 1 atm por un tiempo de 15 min.

Preparación del trabajador

Es obligatorio el lavado de las manos y uñas con un jabon antiséptico y cepillo, que se realizara antes de manipular los objetos dentro de la cámara de flujo laminar

Los equipos de protección individual que se utilizaron fueron:

- Gorro
- Bata o guardapolo
- Guantes de lates (si es necesario)
- Mascarilla con filtro
- Lentes

Limpieza y uso de la cámara de flujo laminar

Lo primero que se hizo al entrar al área de trabajo previamente barrido, es prender la lámpara de rayos ultravioleta-C ya que tienen una acción germicida lo cual

esteriliza el recinto y su contenido cuando se utiliza. Es importante apagar la lámpara durante la utilización de la cámara ya que rápidamente se producirían quemaduras de sol en la piel expuesta.

Luego de unos 10 minutos aproximadamente se apaga la luz ultravioleta para el uso de la cámara.

Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a colocar los siguientes materiales:

- Alcohol en un envase de vidrio para la esterilización de los instrumentos (pinzas y bisturís)
- Alcohol en un frasco con espray para la desinfección de las manos. Esto se realizara si es posible cada vez que se retiran las manos fuera de la cámara.
- Mechero de vidrio con alcohol. Para flamear los instrumentos y si es necesario la base de los embases que ingresan dentro de la cámara para mayor seguridad.
- Cajas petri previamente esterilizadas y pegadas en la base papel milimetrado para la medición de los explantes
- frascos madres conteniendo el material vegetativo que se va trabajar
- Lapicero y papel para la toma de apuntes

Traspaso de los explantes de los frascos madres al SIT.

Una vez puestos todos los materiales en la cámara, se procedió a colocar los explantes en uno de los frascos que se utilizó para el SIT previamente tomando las siguientes consideraciones de los explantes:

- Que no tengan ni una raíz
- Que el tamaño de las plántulas oscile entre 1.9 y 2.00 centímetros
- Que no tenga ni un brote.

Luego se procedió a colocar las tapas con las mangueras de silicona a los frascos sellando las tapas con cinta polystrec.

Por último se procedió a trasladar los biorreactores (SIT) al área donde se llevara a cabo el trabajo de estudio.

Los insumos y cantidad del T3 se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Composición y cantidad del T3.

Insumos	Unidad de medición	Cantidad /litro
Complejo B	ml	3
Fertilizante Bayfolan (11-8-6)	ml	7,1
Azúcar	gr	20
Agar –agar	gr	------
Carbón vegetal molido	gr	------
Agua de coco	ml	200
Agua destilada	ml	1000
pH		5,1-5,4
Volumen	ml	1000

3.1.2 Medios de cultivo y sus costos de producción

Preparación del medio de cultivo para el tratamiento 0 (T0)

Para la preparación del medio de cultivo del T0 se utilizaron los siguientes insumos:

- Fertilizante Bayfolan (11-8-6)
- Complejo B
- Azúcar
- Agua destilada

De ahí se procedió de la siguiente manera:

- Se midió en un recipiente 1000 ml de agua destilada.
- Se midió con una pipeta 6 ml de complejo B y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).
- Se midió el fertilizante Bayfolan 14,2 ml y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).
- Se pesó 20,00 gr de azúcar y se agregó al recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo poco a poco.
- Una vez agregado todos los componentes se enrazó la solución a 2080 ml con agua destilada. Se midió el pH, y se dejó entre 5,1 y 5,4.

Análisis de costos del tratamiento 0

Se determinó el costo del medio de cultivo. Para esto se realizó la cotización respectiva de los insumos utilizados en el medio propuesto esto se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

Insumos	Costo (S/)	Cantidad total (ml y gr)	C. usado/ (ml y gr)	Total(S/)
Fert. Bayfolan (11-8-6)	22	1000	7,1	0.,56
Complejo B	5	120	3	0,125
azúcar	2,4	1000	20	0,048
Agua destilada	9	1000	969,9	8,729
Costo total del medio de cultivo				9,058

Preparación del medio de cultivo para el tratamiento 1 (T1)

Para la preparación del medio de cultivo del T1 se utilizaron los siguientes insumos:

- Fertilizante Bayfolan (11-8-6)
- Complejo B
- Azúcar
- Agua destilada
- Agua de coco

De ahí se procedió de la siguiente manera:

- Se midió en un recipiente 1000 ml de agua destilada.
- Se midió con una pipeta 6 ml de complejo B y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).
- Se midió el fertilizante Bayfolan 14,2 ml y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).
- Se midió 100 ml de agua de coco y se vació en el recipiente con los demás insumos y se procedió a mezclarlos. (no enrazar)
- Se pesó 20,00 gr de azúcar y se agregó al recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo poco a poco.
- Una vez agregado todos los componentes se enrazó la solución a 2080 ml con agua destilada. Se midió el pH, y se dejó entre 5,1 y 5,4.

Análisis de costos del tratamiento 1

Se determinó el costo del medio de cultivo. Para esto se realizó la cotización respectiva de los insumos utilizados en el medio propuesto esto se muestra en la tabla 7.

Tabla 7

Costos de 1 litro de medios de cultivo T1.

Insumos	Costo (S/)	Cantidad total (ml y gr)	C. usado/ (ml y gr)	Total(S/)
Fertilizante Bayfolan (11-8-6)	22	1000	7,1	0,156
Complejo B	5	120	3	0,125
azúcar	2,4	1000	20	0,048
Agua destilada	9	1000	869,9	7,829
Agua de coco	1,5	250	100	0,6
Costo total del medio de cultivo				9,19

.

Preparación del medio de cultivo para el tratamiento 2 (T2)

Para la preparación del medio de cultivo del T2 se utilizaron los siguientes insumos:

- Fertilizante Bayfolan (11-8-6)
- Complejo B
- Azúcar
- Agua destilada
- Agua de coco

De ahí se procedió de la siguiente manera:

- Se midió en un recipiente 1000 ml de agua destilada.
- Se midió con una pipeta 6 ml de complejo B y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).
- Se midió el fertilizante Bayfolan 14,2 ml y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).

- Se midió 150 ml de agua de coco y se vació en el recipiente con los demás insumos y se procedió a mezclarlos. (no enrazar)
- Se pesó 20,00 gr de azúcar y se agregó al recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo poco a poco.
- Una vez agregado todos los componentes se enrazó la solución a 2080 ml con agua destilada. Se midió el pH, y se dejó entre 5,1 y 5,4.

Análisis de costos del tratamiento 2

Se determinó el costo del medio de cultivo. Para esto se realizó la cotización respectiva de los insumos utilizados en el medio propuesto esto se muestra en la tabla 8.

Tabla 8

Costos de 1 litro de medios de cultivo T2.

Insumos	Costo (S/)	Cantidad total (ml y gr)	C. usado/ (ml y gr)	Total(S/)
Fertilizante Bayfolan (11-8-6)	22	1000	7,1	0,156
Complejo B	5	120	3	0,125
azúcar	2,4	1000	20	0,048
Agua destilada	9	1000	819,9	7,37
Agua de coco	1.5	250	150	0,9
Costo total del medio de cultivo				8,608

Preparación del medio de cultivo para el tratamiento 3 (T3)

Para la preparación del medio de cultivo del T2 se utilizaron los siguientes insumos:

- Fertilizante Bayfolan (11-8-6)
- Complejo B
- Azúcar

- Agua destilada
- Agua de coco

De ahí se procedió de la siguiente manera:

- Se midió en un recipiente 1000 ml de agua destilada.
- Se midió con una pipeta 6 ml de complejo B y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).
- Se midió el fertilizante Bayfolan 14,2 ml y se vació en el recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo. (No enrazar).
- Se midió 200 ml de agua de coco y se vació en el recipiente con los demás insumos y se procedió a mezclarlos. (no enrazar)
- Se pesó 20,00 gr de azúcar y se agregó al recipiente con agua destilada y se procedió a mezclarlo poco a poco.
- Una vez agregado todos los componentes se enrazó la solución a 2080 ml con agua destilada. Se midió el pH, y se dejó entre 5,1 y 5,4.

Análisis de costos del tratamiento 3(T3)

Se determinó el costo del medio de cultivo. Para esto se realizó la cotización respectiva de los insumos utilizados en el medio propuesto esto se muestra en la tabla 9.

Tabla 9

Costos de 1 litro de medios de cultivo T3

Insumos	Costo (S/)	Cantidad total (ml y gr)	. usado/ (ml y gr)	Total(S/)
Fertilizante Bayfolan (11-8-6)	22	1000	7,1	0,156
Complejo B	5	120	3	0,125
azúcar	2,4	1000	20	0,048
Agua destilada	9	1000	769,9	6,929
Agua de coco	1.5	250	200	1,2
Costo total del medio de cultivo				8,158

3.1.3 Efecto de las concentraciones de los medio de cultivo casero

Número de brotes

Análisis de varianza del número de brotes

Tabla 10

Análisis de varianza del número de brotes

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	18,9369	6,31229	323,48	0,000
Error	9	0,1756	0,01951		
Total	15	19,1744			

* Significativo

$\overline{X}$ = 1,77 R^2 = 98,76% CV= 7,89%

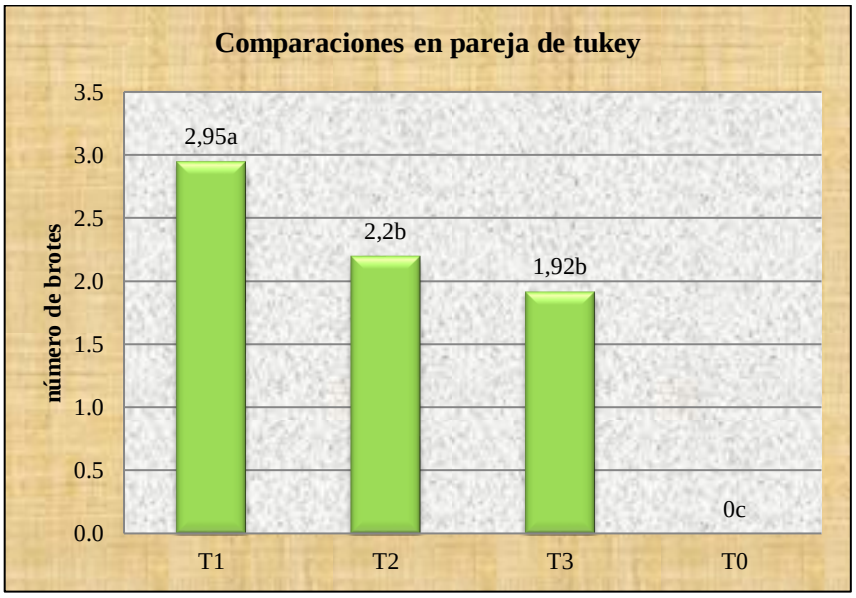


Gráfico 1: Valores de la prueba de Tukey al 95% de coeficiente de variación.

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

***Foto 9*:** brote de T1

Foto 10: brote de T2

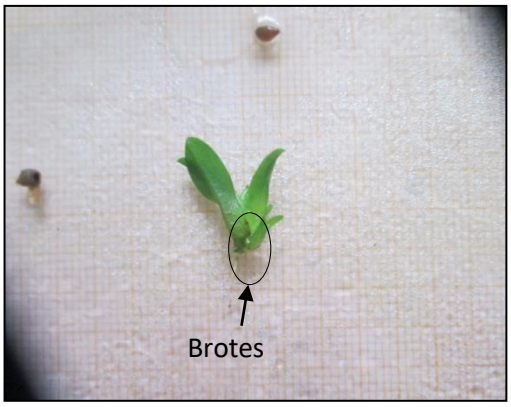


***Foto 11*:** brote T3

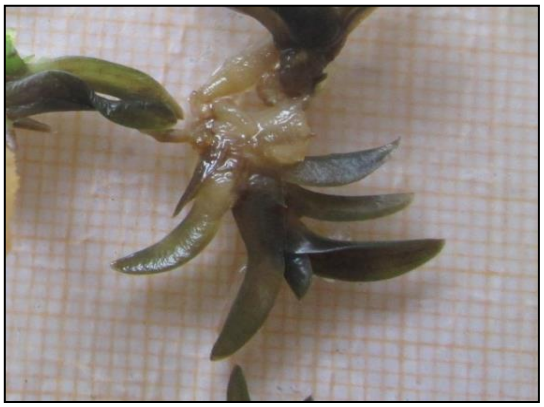


***Foto 12*:** Explantes de T0

Altura de raíces

Análisis de varianza de la altura de brote

Tabla 11

Análisis de varianza de la altura de brote

Fuente	GL	SC sec.	MC ajust.	Valor F	Valor P
Tratamientos	3	0,64147	0,21382	324,8	0,000
Error	12	0,0079	0,00066		
Total	15	0,64937			

$\overline{X}$ = 0,34 R^2 = 98,78% CV=7,55

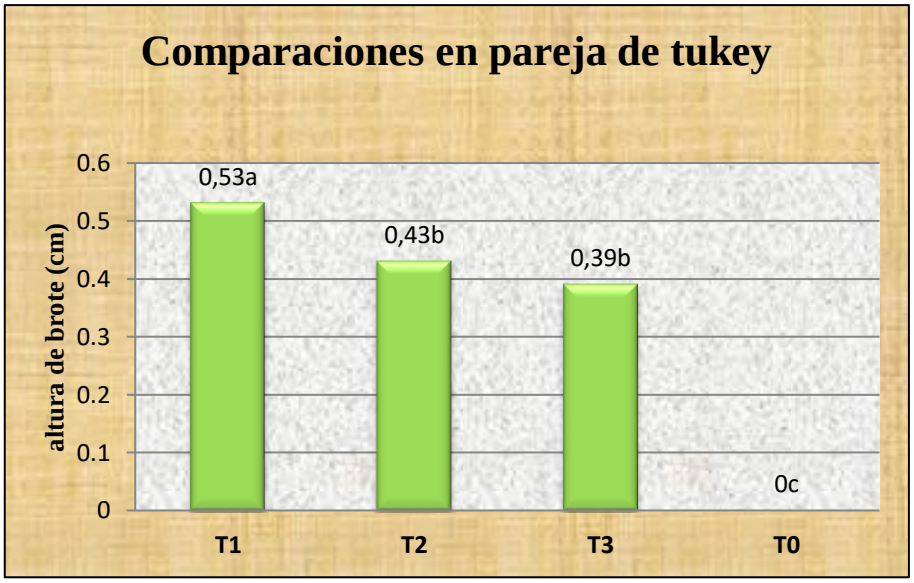


Gráfico 2: Valores de la prueba de Tukey al 95% de coeficiente de variación**.**

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

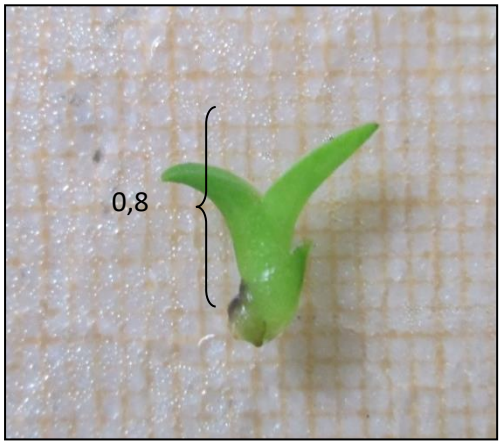


***Foto 13*:** altura de T1

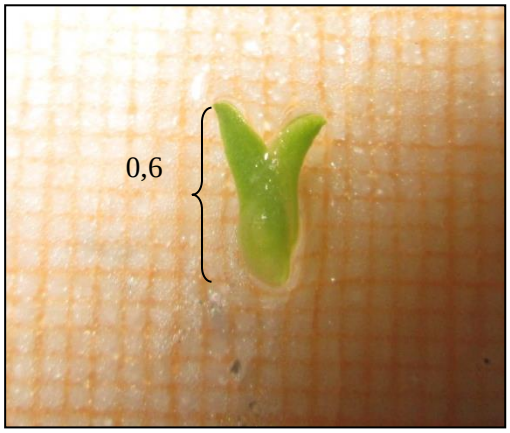


Foto 14: altura de T2

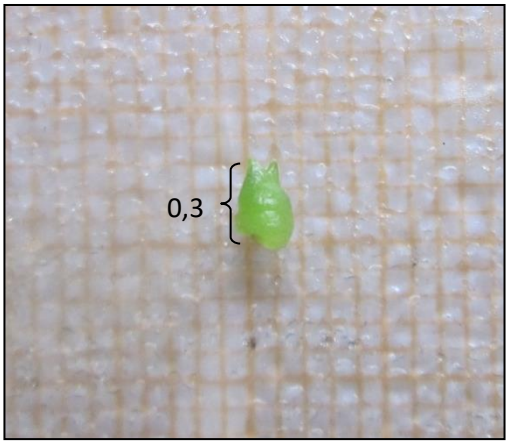


Foto 15: altura de T3

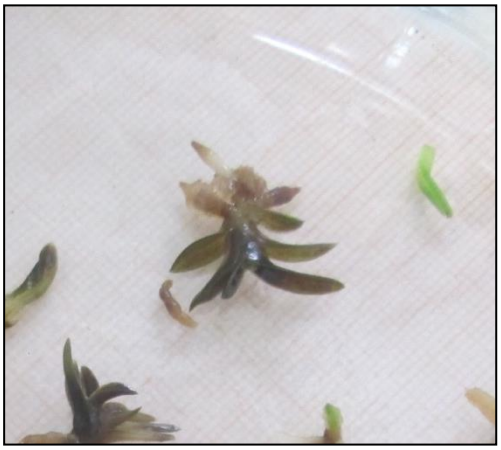


***Foto 16*:** altura de T0

Número de raíces

Análisis de varianza del número de raíces

Tabla 12

Análisis de varianza del número de raíces

Fuente	GL	SC sec.	MC ajust.	Valor F	Valor P
Tratamientos	3	8,4593	2,8198	269,83	0,000*
Error	12	0,1254	0,0104		
Total	15	8,5847			

$\overline{X}$ = 1,25 R^2 = 98,54% CV= 8,15 %

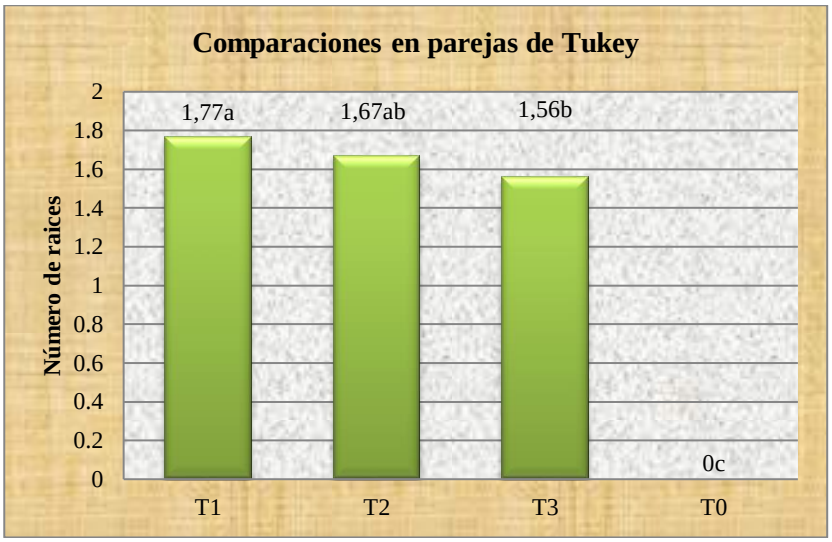


Gráfico 3: Valores de la prueba de Tukey al 95% de coeficiente de variación.

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Foto 17: raíces de T1

Foto 18: raíces de T2

Foto 19: raíces T3

Foto 20: raíces T0

3.2 Discusión

3.2.1 Protocolo de cultivo in vitro

Para la elaboración de los protocolos que se utilizaron en sistema de inmersión temporal se obviaron algunos insumos como es el agar-agar. ya que el sistema que se utilizo fue un medio de cultivo líquido. Por otro lado también se obvio el carbón activado ya que reduce el índice de brotación, (Acuña ,2016).

(Prizao et al, 2012) menciona que el uso de carbón activado se ha extendido en la industria de micropropagación de orquídeas ya que algunas especies genera un mayor número de brotes y raíces aún en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento y promueve un adecuado balance interno de auxinas y citoquininas de la planta. Sin embargo (Prizao y colaboradores, 2012), asimismo mencionan que estos resultados varían según la especie de estudio, ya que en el caso de *Catasetum fimbriatum* este secuestra las auxinas que requiere para una adecuada brotación; una situación que podría asimismo haber afectado a *C.rex* ya que se reporta que el carbón activado es capaz de adsorber inclusive un 99,5% de las auxinas adicionadas al medio de cultivo en el trascurso de 5 días (Thomas, 2008)

El análisis estadístico revelo diferencias estadística significativa teniendo al T1 con 2,95 según el número de brotes, siendo significativamente superior a los demás tratamientos, así mismo también se pudo registrar diferencias significativas entre tratamientos, en este caso los explantes sembrados en un medio conteniendo agua de coco tuvieron mejores resultados que aquel que no lo tuvo, que viene a ser nuestro tratamiento 0.

De los resultados anteriores, para el establecimiento de un protocolo de micropropagación in vitro de plantas de ***Cattleya rex*** (orchidaceae), a través de procesos morfogénicos, se seleccionó el **protocolo 1**, donde se obtuvo mejores resultados en cuanto al número de brotes, tamaño de explantes y número de raíces.

Los resultados obtenidos abren la posibilidad de profundizar los estudios como por ejemplo, la aplicación de los fundamentos del diseño de biorreactores en la micropropagación, (Curtis, 2005), para mejorar tanto el rendimiento, como la calidad de los brotes y de las raíces desarrolladas en los cultivos in vitro, que dicho sea de paso, representa una de las áreas fundamentales de investigación dentro del cultivo de tejidos vegetales, porque de ello depende en gran medida la aclimatación de las pantas en condiciones ex vitro.

Resumen del protocolo de preparación del tratamiento 1 para el cultivo in vitro de la *Cattleya rex*.

Volumen: 2 080 ml

Formulación: azúcar 20 gr, fertilizante Bayfolan (11-8-6) 7,1 mlL^{-1}, complejo B 3 mlL^{-1}, agua de coco 100 mlL^{-1}.

Tabla 13

Protocolo del tratamiento 1.

Insumos	Volumen/1L	Volumen/2 080 ml
Complejo B	3 mlL^{-1}	6,24 mlL^{-1}
Fertilizante Bayfolan (11-8-6)	7,1 mlL^{-1}	14,56 mlL^{-1}
Azúcar	20 gr	41,6 mlL^{-1}
Agua de coco	100 mlL^{-1}	208 mlL^{-1}

Desinfección:

Los frascos y mangueras utilizados para el SIT se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar por un tiempo de 20 min aproximadamente.

Preparación:

Pesar y medir todos los insumos e ir agregando en un recipiente conteniendo agua destilada, mezclar los insumos poco a poco. Una vez disuelto todos los insumos enrazar la solución a 2080 ml. Medir el pH y dejar entre 5,1 – 5,4.

Vaciar el medio de cultivo en las botellas, 520 ml/botella.

Sellar las botellas con papel aluminio y papel reciclado.

Autoclavar las botellas a 121 °C, a 1 atm por un tiempo de 15 min.

Traspaso de los explantes de los frascos madres al SIT.

Una vez puestos todos los materiales en la cámara, se procedió a colocar los explantes en uno de los frascos que se utilizó para el SIT. Luego se procedió a colocar las tapas con las mangueras de silicona a los frascos sellando las tapas con cinta polystrec. Por último se procedió a trasladar los biorreactores (SIT) al área donde se llevara a cabo el trabajo de estudio.

3.2.2 Medios de cultivo y su costo de producción

Los cuadros 2, 3,4 y 5 muestra los componentes y las cantidades que se utilizó para preparar un litro de medio de cultivo, los mismos que representan los tratamientos del trabajo de investigación. En los cuadros 2, 3,4 y 5 se muestran los costos de los diferentes medios de cultivo (tratamientos), como se puede observar los costos van desde T0 con 9,058 S/ el litro de medio de cultivo, T1 con 9,19 S/ el litro de medio de cultivo, .T2 con 8,608 S/ el litro de medio de cultivo y T3 con 8,158 S/ el litro de medio de cultivo, los cuadros de varianza y los gráficos de las pruebas de Tukey muestran que los mejores resultados obtenidos en la investigación corresponden a los tratamiento 1 y 2, pero de los dos el que tuvo mejores resultados fue el T1 que mantiene una diferencia de 0.45 S/ ,lo que implica un ahorro para el productor, si lo llevamos a gran escala si se desearía preparar 100 litros de medio de cultivo tendríamos un ahorro de 45.00 S/ a más, esto nos indica que el T1 es el medio más adecuado para propagar la especie ***Cattleya rex.***

3.2.3 Efecto de los diferentes medios de cultivo

Número de brotes

La tabla 5 representa el análisis de varianza respecto al número de brotes de la orquídea ***Cattleya rex*** con valores para el C. V. con 7,89% y un R^2 con 98,76%, los mismos que corroboran la confiabilidad de los resultados obtenidos durante la investigación y la alta determinación entre variable evaluada y los tratamientos en estudio.

En el grafico 1, según la prueba de Tukey con respecto al número de brotes a partir de explantes existe una diferencia estadística significativa, destaca al influir en un mayor número de brotes el tratamiento 1(fertilizante + complejo B + 10% de agua de coco) con 2,95 , siendo significativamente superior a los demás tratamientos, como T2 (fertilizante + complejo B + 15% de agua de coco) con 2,2, y T3 (fertilizante + complejo B + 20% de agua de coco) con 1,92 de las cuales estos dos últimos tratamiento son significativamente iguales superando a T0 (fertilizante + complejo B) con 0, estos valores indican que los explantes de ***Cattleya rex*** se desarrollan mejor en un medio de cultivo con la adición de agua de coco.

Estos resultados encontrados confirman lo reportado por (Espinoza 2001), quien menciona que el agua de coco contiene fitohormonas que ayudan a un mejor desarrollo de las plántulas, siempre y cuando las concentraciones son variadas y que ayuden al desarrollo de las mismas, pero no coincide con el experimento de (Montenegro F., et al., 2013) lo cual menciona que al utilizar agua de coco al 20% produce mejores resultados con mayor número de brotes formados (5,4), y con un 100% de plantas normales, al contrario de la concentración al 10% de agua de coco que produce 4,7 brotes formados, con 75% de plantas normales.

Altura de brotes

La tabla 6, representa en análisis de varianza con respecto al tamaño de brote en cm. influencia de los 4 tratamientos de ***Cattleya rex.*** con valores para el C.V 7,55 % y un R^2 de 98,78%, los mismos que adoptan la confiabilidad de los resultados obtenidos durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

En el grafico 2, se muestra el resultado de la prueba de Tukey con respecto al tamaño de planta en cm. Lo cual muestra que el tratamiento 1 con 0.53 cm es significativamente mayor a los tratamientos 2 y 3, con T2 0,43 cm y T3 0,39 cm, los cuales estos dos tratamiento son significativamente iguales y con una diferencia estadística significativa al tratamiento 0 con 0,00 cm de altura.

Estos resultados podrían deberse a la composición de los medios T0 (medio casero sin agua de coco) T1 (medio casero con 10% de agua de coco), T2 (medio casero con 15% de agua de coco) y T3 (medio casero con 20% de agua de coco)

En los estudios realizados por (Robles L., 2014) menciona que la orquídea ***Phalaenopsis spp*** en el estadio pequeño, se observa una mínima diferencia estadística de tamaño entre T5 (MS +Plátano Verde + Agua Coco + Regulador Crec.) con 1,53 y T4 (MS +Plátano Verde +Agua Coco) que supera a T0 (MS sin agua de coco) con 1,32. Así mismo, Padilla, E. 2008, menciona que para la orquídea ***Cattleya sp,*** existe una diferencia estadística de tamaño entre los tratamientos 4 (plátano seda y agua de coco 10%) con 12 mm, supera a los tratamientos T3 (fertilizante foliar 11-8-6 y agua de coco 20%) con 11mm. estos resultados coinciden con el experimento ya que el agua de coco 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).

Número de raíces

La tabla 7, representa el análisis de varianza con respecto al número de rices. Influencia de los 4 tratamientos de ***Cattleya rex.*** con valores para el C.V 8,15 % y un R^2 de 98,54%, los mismos que adoptan la confiabilidad de los resultados obtenidos durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio

En el grafico 3, se muestra el resultado de la prueba de Tukey con respecto al número de raíces. Lo cual muestra que el tratamiento 1 con 1,77 y el tratamiento 2 con 1,67 son los que tuvieron mayor número de raíces en comparación con el T3 con 1,56, pero estadísticamente estos tres son

significativamente iguale y mayores que el T0 con 0. En estudios realizados por (Padilla, E. 2008), menciona que la utilización de sustancias orgánicas complejas como el endospermo líquido de coco (100 ml/l), en la composición de los medios, tiene efecto en la rápida diferenciación de los protocormos y el desarrollo vegetativo y radicular de las plántulas; así mismo menciona que para la orquídea ***Cattleya sp,*** existe una mínima diferencia con respecto al número de raíces entre los tratamientos 4 (plátano seda y agua de coco 10%) con 2,5 mm, y el T3 (fertilizante foliar 11-8-6 y agua de coco 20%) con 2,2 mm, que supera a T1 (fertilizante foliar 11-8-6 y agua de coco 10%) con 2 mm, estos valores indican que las plántulas de ***Cattleya sp***. Se desarrollan mejor en un medio de cultivo con la adición de agua de coco y plátano. Cadavid, I., 2008, menciona que el tratamiento M y S modificado + agua de coco al 10 %, fue el más adecuado para la inducción de enraizamiento después de 90 días de realizada la siembra de las semillas.

De manera general el tratamiento que no genero ningún resultado fue el tratamiento 0 (azúcar, fertilizante + complejo B) que no incorporó agua de coco. Una característica frecuente de las plantas anormales es la clorosis que ha sido atribuida a desbalances minerales en el medio de cultivo, particularmente por altos niveles de K y P, que pueden causar una deficiencia fisiológica de Fe, 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, Roussos et ál., 2007).

Es importante destacar tal y como lo hace (Arditti, 1993), que el efecto del agua de coco varía dependiendo del híbrido utilizado, pero lo que sí es claro, es que incrementa la proliferación del protocormo y estimula el desarrollo del explante.

(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. En los últimos años, diferentes investigaciones han revelado que esta sustancia cuenta con un efecto importante en la micropropagación de diferentes especies *in vitro,* entre ellas, las orquídeas induciendo convenientemente el desarrollo de los cuerpos protocórmicos.

De acuerdo con los análisis estadísticos basados en promedio, coeficiente de variación y en la Prueba de comparación de Tukey, se logró establecer, que se presentaron diferencias estadísticas en el efecto promedio de los tratamientos ($P < 0,05$) donde se determinó que el T1 fue el de mejor tratamiento y el tratamiento 0 fue el de menor resultados.

CONCLUSIONES

- Se logró elaborar un protocolo de cultivo in vitro para propagar la especie ***Cattleya rex*** (orchidaceae) a partir de explantes, mediante sistema de inmersión temporal (RITA), con fines de conservación en la provincia de Moyobamba.

- El medio de cultivo más adecuado para la propagación in vitro de la orquídea ***Cattleya rex***, bajo el sistema de inmersión temporal RITA durante un tiempo de inmersión de 10 min, una frecuencia de inmersión de 4/día y 40 ml/explantes fue el tratamiento 1(azúcar 20 gr, fertilizante Bayfolan (11-8-6) 7,1 mlL^{-1}, complejo B 3 mlL^{-1}, agua de coco 100 mlL^{-1}).

- Los tratamientos con mayor número de brotes fueron el tratamiento 1 (medio casero + 100 mlL^{-1}) y tratamiento 2 (medio casero + 150 mlL^{-1}), de las cuales el mejor tratamiento fue el T1 con un promedio de 2,95 brotes.

- El tratamiento con mayor altura de brote fue el tratamiento 1 (medio casero + 100 mlL^{-1}) con un promedio de 0,53 cm, y los tratamientos que tuvieron menores resultados fueron el tratamiento 3 (medio casero + 200 mlL^{-1}) con 0,39 cm, seguidamente por el tratamiento 0 (medio casero) con 0,00 cm.

- No hubo una diferencia estadística significativa entre los tratamiento T1 (medio casero + 100 mlL^{-1}), T2 (medio casero + 150 mlL^{-1}) y T3 (medio casero + 200 mlL^{-1}) con respecto al número de raíces.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar a la corporación G y G E.I.R.L, para la propagación masiva de orquídeas de la especie ***Cattleya rex*** el tratamiento 1(Bayfolan 11-8-6 + complejo B + 10% de agua de coco).

- Se recomienda a la corporación G y G E.I.R.L, emplear concentraciones de agua de coco menores a 100 ml/L.

- Se recomienda a las distintas empresas que realizan trabajos de cultivo in vitro realizar ensayos en otras especies utilizando como base el tratamiento 1 (medio casero+ 10 % de agua de coco).

- Se recomienda a otros tesistas emplear otras marcas de fertilizantes foliares y a otras concentraciones para la preparación de medios de cultivo in vitro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aceves, R, J, L. & Hernández, H, J.(1997).Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo in vitro de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad.

Ackermann, D.; Brusch, A.; Sonntag, K. & Sellner, M. (2003). Using the temporary immersion technique for in vitro culturing of renewable resources plants. Pp. 46-49 In: Agricultural techniques and technologies on the light agenda.

Acuña, M. (2016). Optimización de la multiplicación in vitro de Cattleya dowiana bateman (1866) en sistemas de cultivo líquido y de inmersión temporal.

Aitken-Christie J. (1991). Automation. In: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (eds.), Micropropagation: technology and application. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. P. 363-388.

Aitken-Christie J, Kozai T, & Takayama S. (1995). Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: Aitken-Christie J, Kozai T, and Smith (eds.), Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netrerlands. P. 1-18.

Albarracín Acosta, CP. (2012). Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación in vitro de cilantro cimarrón (Eryngium foetidum) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC, 203 p.

Alvard, D.; Cote, F. & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant Cell, T issue and Organ Culture, 39:253-258.

Arditti, J. (1984). An History Of Orchid Hibridation, Send Germination and Tissue Culture. Bot. J. Linn. Soc. 89 New York. Pp: 359- 381.

Arditti, J.; Ernest, R. (1993). Micropropagation oforchids. New York: John Wiley & Sons, Inc., p. 682.

Basail M., ET AL. (2007). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la propagación in vitro del cultivar híbrido ‘FHIA-21’ (AAAB) en

Sistemas de Inmersión Temporal. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP).Cuba. Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 1: 53 – 56.

Basail M., ET AL. (2012). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación in vitro del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (Musa spp., AAB). Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales. Santo Domingo, Cuba. Biotecnología Vegetal. Vol. 12, No. 1: 53 – 57.

Berthouly M; Etienne H. (2005). Temporaly inmersión system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. Eds. AK Hvoslef-Eide; W Preil. Francia, CIRADAMIS. p. 165-195

Biotol (Project Biotechnology by open learning) (1994). In vitro Cultivation of Plant cells. Open Universiteit. The Netherlands and University of Grenwich, Butterwath-Heinemman Martins. The printers. Gran Bretaña pp. 40-62. 199 p.

Cadavid, I., (2008). Micropropagación de **Cattleya quadricolor.** Universidad EAFIT. Escuela de ingeniería, Departamento de Ingeriría de Procesos.

Calva C. G., Perez Vargas J., (2005) Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. pp 2- 16.

Calva C. G., Rios L. E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.

Caplin, S. M., And Steward, F.C (1948). Effectof coconut milk on the growth of explants from carrol root. Science 106, 655 -7.

Cavero M., Collantes B. & Patroni C. (1991). Orquídeas del Perú. Centro de Datos para la Conservación del Perú.

Chaumont, D. and Gudin, e (1985). Transition from photomixotrophic to photoautotrophic growth of Asparagus officinalis in suspension culture. Biomass 8 41-58.

Cites (Convención sobre el comercio Internacional de especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), (2011). Lista de especies.

Curtis. W.C. 2005. Aplication of bioreactor design principles to plant micropropagation. Plant cell tissue and organ culture, 81: 255-264.

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.

Digby, J. & F. Skoog (1966). Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. Plant Physiol. 41: 647-652.

Doods, J. H. & L. W. Roberts (1988). Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press Cambridge. 231 pag.

Dressler, RL. (1990). The Orchids .Natural History and Classification. Massachusetts. Harvard University Press. 332 pp.

Espinoza G. A. (2001). Proliferación de rhynchosteleBictoniense (orchidaceae) a partir de semillas y explantes de material cultivado in Vitro. Universidad Nacional Autónoma de México – Laboratorio de Cultivo de Tejido vegetales. FOWLER M. W. (1982). The large scale cultivation of plant cells. Progr. Ind. Microb. 16: 207-229.

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

Galzy, R And Compan, D. (1992). Plant Cell Tiss. Org. Cul!. 31 : 239-244.

Galzy, R 1985. Les possibiJités de conservation "in vitro" d'une collecIÍon de clones de vignes. Bulletin de L'OIV. Vol. 58 650-651377-390.

Gambord, O. L. & P. J. Shyluk (1981). Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue culture: In plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Ed. T. A. Thorpe, pp. 21-44. New York Academics.

Gambord, O. L.; T. Murashige, T. A. Thorpe; & I. K. Vasil (1976). Plant tissue culture media. In vitro 12: 473-478.

Ganapathi T.R., Mohan J.S.S., Suprasanna P., Bapat V.A., RAO P.S. (1995). A low-cost strategy for in vitro propagation of banana. Current Science 68:646-650.

George E.F., De Klerk G.-J. (2008).The components of plant tissue culture media. I – Macro- and micronutrients, pp. 65-113. In: E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds). Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. The background. 3 ed. Springer, Dordrecht, Holland.

George, F. E. & D. P. Sherrington (1984). Plant propagation by Tissue Culture. Handbook and directory of commercial labs. 690 p.

George, E.F. (1993). Plant tissue culture techniques. Pp:.3-36. In: Plant propagation by tissue culture v.1: The Technology. E.F. George (ed.). Exegetics Ltd., Edington.

Gidson. (1967). Austr. J Biol. Sci. 20: 189-191.

González Luna, KS. (2003). Respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Tesis. Bach. Ing. Biot. Cartago, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. p. 10-11.

Gutiérrez C. (1996). Propagación clonal in vitro de Cattleya por medio meristemos. In: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Vol. 1. San José. Costa Rica. p 302. EUNA

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.

Grout; B.W.W. And CRISP, P. (1977) Practical aspects of lhe propagation of cauliflower by meristem culture. Acta Horticulturae 78: 289-196.

Hughes K. (1986). Ornamental species, pp. 5-41. In: B. Conger (ed). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC, Boca Raton, Florida.

Hurtado D, Merino M. (1997). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México. 232 p.

Iaea (Agencia Internacional de la Energía Atómica). (2004). Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26–30 August 2002. 102 p.

Jain N., Babbar S.B. (2002). Gum katira–a cheap gelling agent for plant tissue culture media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71:223-229.

Jiménez, E.; Pérez, J.; De Feria, R.; Barbón, R.; Capote, A.; Chávez, M.; Quiala, E. & Pérez, J., (1999). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 59:19-23.

Krikorian, A. (1991). Propagación clonal in vitro. En: Roca, W. y Mroginski, L. (Ed). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, p95-125.

Lees, R.P., Evans, E.H. and Nicholas, J.R. (1991). Pbotosyntbesis in Clematis The President, during growth "in vitro" and subsequent "in vivo" acclimatization. J Exp. Bol 238 605-610.

Leite G.B., Finardi N.L., Fortes G.R. DE L. (2002). Use of vermiculite as a substrate and effect of light on in vitro rooting of pears, cv. Bartlett and clone OH x F97. Ciencia e Agrotecnología (Lavras) 26:977-982.

León, M. (1995). Tesis “Conservación de Especies Peruanas de Orquídeas Utilizando Técnicas de Cultivo de Tejidos In Vitro. UNALM. Pp 14-15.

Letham, D. S. (1974). Regulators of Cell Division in Plant Tissues. Physiologia Plantarum. Volumen 32, Issue 1, Pages: 66–70.

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.

Lucyszyn N., Quoirin M., Koehler H.S., Reicher F., Sierakowski M.-R. (2006). Agar/ galactomannan blends for strawberry (Fragaria x ananassa Duchesne) cv. Pelican micropropagation. Scientia Horticulturae 107:358-364.

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.

Montoya, H, L, M. (1991). Cultivo de tejidos vegetales.

Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3):473-497.

Niedz R.P., Evens T.J. (2007). Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant 43:370-381.

Padilla, E. (2008). tesis "evaluación de medios de cultivo para la micropropagación in vitro de orquídeas de las especies catleya spp. y oncidium lanceanum en Tarapoto." Universidad Nacional de San Martin. Facultad de ciencias agrarias.

Pierik R. (1987). In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht. Holanda. 344 p.

Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi Prensa. Madridi España. pp. 49-84, 127-133. SALAUES, R.; C. Rocabado & D.

Pollock M.A., Oppenheimer D.G. (1999). Inexpensive alternative to MS medium for selection of Arabidopsis plants in culture. Bio/Techniques 26:254-257.

Prizao, E., Menezes,L., Milaneze, M., Aparecida,C, & Silva, M.(2012). Activated charcoal and graphite for the micropropagation of Cattleya bicolor Lind. And a orchid double- hybrid BLC PPastoral Innocence. Acta Scientiarum. Agronomy, 34(2), 157-161.

Reina, M. (2003). Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 1: Introducción al cultivo celular.

Robles, L., (2014). Tesis "Optimización de cinco medios de cultivo en cuatro fases de micropropagación en cinco estadios entre variedades de phalaenopsis". Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Facultad de ciencias agrarias industrias alimentarias y ambiental.

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.

Roca, W, M & MROGINSKI, L, A. (1991). establecimiento de un laboratorio para cultivo de tejidos vegetales. Capitulo Nº 1.

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.

Seabrook J. E. A. (1980). Laboratory culture. 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 1-20

Shenk R. A., Hildebrandt (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.

Street H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing. Oxford., England. pp. 61-102.

Taiz L., Zeiger E. (2006). Plant Physiology. 4ta. Ed. Sinauer Associate, Sunderland, Mass., EUA. 764 p.

Tyagi R.K., Agrawal A., Mahalakshmi C., Hussain Z., Tyagi H. (2007). Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (Curcuma longa L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant 43:51-58.

Vasil, I.K. Aod HILDEBRANDT, A.e. (1966). Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown "in ·¡itro". Planta 68: 69-82.

Venketeswaren, S. (1965). Studies on tbe isolarion of green pigmented callus lÍssue of tobacco and its continued maintenance in suspension cultures. Physiol. Plan!. 18: 776-789.

Vieira R.L., Leite G.B., Wamser A.F. (2007). Efeito de substratos porosos no enraizamento in vitro do porta-enxerto de macieira M-9 (Malus pumilla). Revista Brasileira de Fruticultura (Jaboticabal) 29:128-132.

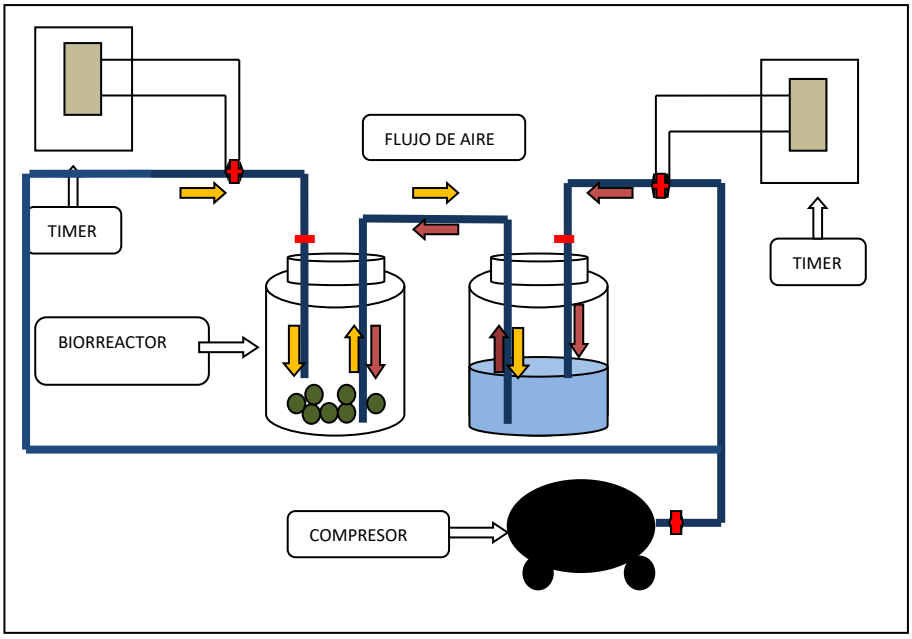
Yasuda S., K. Satoh T., Ishii, Furuya T. (1972). Studies on the cultural conditions of plant cell suspension culture. En: Terui G. (Ed.) Ferment. Technol. Today. Proc. Int. Ferm. Symp. 4th. Soc. Ferm. Tech. Kyoto, Japan. pp 697-703.

Zimmerman R., Bhardwaj S., Fordham I. (1995). Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43:207-213.

Ziv, M. (1995). T he control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. Acta Horticulturae, 393:25-38.

ANEXOS

Anexo A: Modelo del funcionamiento del SIT que se utilizó



Anexo B: composición del fertilizante Bayfolan 11-8-6.

COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Naturaleza química

Líquido fertilizante NPK con micronutrientes
Fórmula: 11-8-6 (m/v)
N°Código: 10136

Componentes peligrosos

Nombre químico	Elemento químico	Concentración [% m/m]	Concentración [% m/v]
Nitrógeno total	N	8,9	11
Nitrato nitrógeno	NO_3 – N (N)	4,0	4,9
Amonio nitrógeno	NH_4 – N (N)	4,9	6,1
Fosfato soluble en agua	P2O5	6,4	8
Potasio soluble en agua	K2O	4,8	6
Boro soluble en agua como borato	B	0,0082	0,01
Cobre soluble en agua como quelato con EDTA	Cu	0,0066	0,008
Hierro soluble en agua como quelato con EDTA	Fe	0,0154	0,019
Manganeso soluble en agua como quelato con EDTA	Mn	0,013	0,016
Molibdeno soluble en agua como molibdato	Mo	0,008	0,0009
Zinc soluble en agua como quelato con EDTA	Zn	0,0049	0,006
Azufre	S	0,5	0,7
Cloro	Cl	0,4	0,5

Anexo C: ficha técnica de recolección de datos

explantes	número de brotes	tamaño de brote	numero de raíces
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
promedio			

Anexo D: Ficha técnica del resumen de recolección de datos

NÚMERO DE BROTES , ALTURA DE BROTES Y SUMA DE REICES				
	Tratamientos			
REPETICIONES	T0	T1	T2	T2
R1				
R2				
R3				
R4				
∑ total				
promedio final				

Anexo E: Suma total y promedio del número de brotes

NÚMERO DE BROTES				
	Tratamientos			
REPETICIONES	T0	T1	T2	T2
R1	0	2,9	2,1	1,7
R2	0	3	2,2	2,1
R3	0	3,1	2,1	1,8
R4	0	2,8	2,4	2,1
∑ total	0	11,8	8,8	7,7
promedio final	0	2,95	2,2	1,925

Anexo F: Suma total y promedio de altura de brote

ALTURA DE BROTE				
	Tratamientos			
repeticiones	T0	T1	T2	T2
R1	0	0,6	0,43	0,4
R2	0	0,5	0,44	0,39
R3	0	0,5	0,42	0,38
R4	0	0,5	0,43	0,39
∑ total	0	2,1	1,72	1,56
promedio final	0	0,525	0,43	0,39

Anexo G: Suma total y promedio del número de raíces

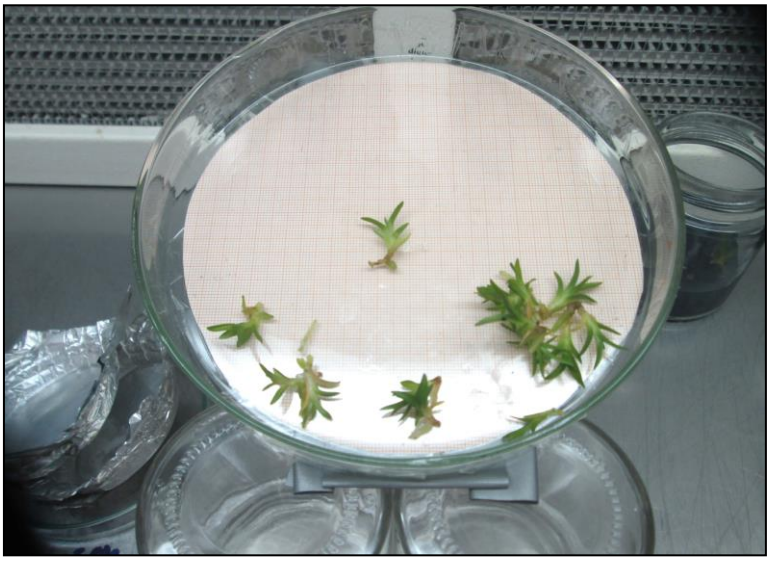
NÚMERO DE RAICES				
	Tratamientos			
REPETICIONES	T0	T1	T2	T2
R1	0	1,6	1,69	1,7
R2	0	1,7	1,7	1,59
R3	0	2	1,65	1,45
R4	0	1,8	1,66	1,5
∑ total	0	7,1	6,7	6,24
promedio final	0	1,77	1,67	1,56

Anexo H: Panel fotográfico

Fotografía 1: insumos y materiales para la preparación de los medios

***Fotografía 2*:** tratamientos esterilizados

***Fotografía* 3:** Área de trabajo



***Fotografía 4*:** seleccionando los explantes para ser introducidos al SIT

***Fotografía 5*:** introducción de los explantes al frasco

***Fotografía 6*:** SIT instalado y en funcionamiento