

UNIVERSIDAD AMAZONICA DE PANDO
AREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y NATURALES
CARRERA: INGENIERIA AGROFORESTAL



**ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE ANTIOXIDANTES Y REGULADORES DE
CRECIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN “IN VITRO” CON PLÁNTULAS DE
ORQUÍDEA (*Oncidium baueri*) A PARTIR DE SEMILLAS**

Tesis de Grado para optar al título de Ingeniero Agroforestal

Presentado por: Univ. Lourdes Lucero Nuñez Alave

Asesores: Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo

Ing. Griceldo Carpio Tancara

COBIJA – PANDO – BOLIVIA

2018

HOJA DE APROBACIÓN

La presente tesis fue revisada y aprobada por:

CARGO	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMAS
Presidente	Dr. Benjamín Oliveira Carrillo	_____
1er. Vocal	Ing. Mary Jesús Añez Campos	_____
2do. Vocal	Ing. Dunia Calderón Vaca	_____
3er. Vocal	Ing. David Gómez Roca	_____
Asesora	Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo	_____
Asesor	Ing. Griceldo Carpio Tancara	_____

Cobija, 11 de Diciembre de 2018

DEDICATORIA

*A Dios Padre, al Hijo y al Espíritu Santo
de amor y misericordia que nunca me dejaron.*

*A mis papas: David y Margarita
quienes siempre me apoyaron.*

A mis hijas y sobrina:

Celeste, Anita y Yerenisse

Por ser personitas especiales en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a Dios quien nunca me abandono; a Jesús quien guía mi camino, al Espíritu Santo que me fortalece.

Muchas gracias a mis papas David y Margarita; fueron los seres que estuvieron conmigo en las buenas y aun cuando falle siguieron apoyándome.

Gracias a mis hermanos Jesús y Carla; mis hijas Celeste y Anita por ser el motivo de seguir adelante también agradecer a mi esposo, Juan Carlos por apoyarme.

Mis más sinceros agradecimientos a mis asesores Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo e Ing. Griseldo Carpio Tancara por brindarme su apoyo y conocimiento en el presente trabajo de investigación. Así también a la señora Dovildes Maffi, Ing. Andrea Torres Torrico, Lic. José Luis Panoso, Ing. Edil Flores, Ing. Guido Vargas, Lic. Severo Meo e Ing. Jonhny Garcia; quienes aportaron en gran manera con información además de material vegetal en algunos casos.

Agradecer a mis tribunales: Ing. Dunia Calderón Vaca, Ing. Mary Jesús Añez Campos e Ing. David Gómez Roca por sus recomendaciones que complementaron la presente investigación.

A mis docentes y otros ingenieros que nos enseñaron y guiaron durante los años de estudio en la universidad.

A mis amigos y compañeros quienes fueron un apoyo compartiendo buenos y malos momentos; especialmente Juana, Iracema, Nely, Janeth, Judith y Lucy.

Agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales, por su colaboración en todo el trabajo de laboratorio: Ing. Gabriela Ancasi Espejo, Lic. Israel Muñoz Guzman, Univ. Fabian Usnayo, Madeleine Duri Yaca, Jesmin Benito Huanca y Roy Peña Queteguay.

Muchas gracias a los hermanos de la fe en Jesús que son compañía grata en días buenos y soporte en días malos.

RESUMEN

La presente investigación titulada “Análisis y comparación de antioxidantes y reguladores de crecimiento para la propagación “in vitro” con plántulas de orquídea (*Oncidium baueri*) a partir de semillas”, tuvo los siguientes objetivos específicos: a) determinar el regulador de crecimiento con mayor porcentaje de germinación de las semillas, b) Evaluar el agente antioxidante con menor incidencia de oxidación en el establecimiento, y c) comparar los tratamientos para establecer los antioxidantes y reguladores de crecimiento con mejor desarrollo fenológico de las plántulas.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal dependiente del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la U.A.P. El material vegetal utilizado fue semillas contenidas en frutos de la orquídea. El procedimiento experimental consistió en la desinfección de las cápsulas, preparación de medios de cultivo, siembra del material vegetal del cultivo *in vitro* y cambio de medios después de la germinación. Los factores sometidos a evaluación fueron: antioxidantes (carbón activo y ácido cítrico) y reguladores de crecimiento (AIA y BAP; combinaciones de coco, plátano, manzana, tomate y piña). Las variables evaluadas fueron tasas de: germinación, contaminación y oxidación; durante el desarrollo se evaluaron: estadio de crecimiento, altura de plántula, número de hojas y raíces por planta; el diseño experimental empleado fue el completamente al azar y arreglo combinatorio con dos antioxidantes y tres reguladores de crecimiento, es decir seis tratamientos y doce repeticiones.

Los resultados indican que: los reguladores de crecimiento AIA y BAP dieron lugar al mayor porcentaje de germinación de las semillas, mientras que el antioxidante ácido cítrico redujo significativamente (a 0%) con mínima diferencia de carbón activo; finalmente la combinación del antioxidante carbón activo con el regulador de crecimiento AIA y BAP permitieron un rápido crecimiento hasta alcanzar la fase de ser trasladados a la aclimatación.

Palabras claves: antioxidantes, reguladores de crecimiento, orquídeas *in vitro*.

ABSTRACT

The present research entitled "Analysis and comparison of antioxidants and growth regulators for the propagation" in vitro "with orchid seedlings (*Oncidium baueri*) from seeds", had the following specific objectives: a) to determine the growth regulator with greater percentage of germination of the seeds, b) Evaluate the antioxidant agent with less incidence of oxidation in the establishment, and c) compare the treatments to establish the antioxidants and growth regulators with better phenological development of the seedlings.

The research was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory under the Area of Biological and Natural Sciences of the U.A.P. The plant material used was the seeds contained in fake orchid fruits. The experimental procedure consisted of the disinfection of the capsules, preparation of culture media, planting of the plant material of the in vitro culture and change of media after germination. The factors under evaluation were: antioxidants (active carbon and citric acid) and growth regulators (AIA and BAP, combinations of coconut, banana, apple, tomato and pineapple). The variables evaluated were: germination, contamination and oxidation rates; during development, the following were evaluated: growth stage, plant height, number of leaves and roots per plant; the experimental design used was the completely randomization and combinatorial arrangement with two antioxidants and three growth regulators, that is, six treatments and twelve repetitions.

The results indicate that: the growth regulator AIA and BAP gave rise to the highest percentage of germination of the seeds, while the antioxidant citric acid significantly reduced (to 0%) the oxidation before the acclimatization; finally, the combination of the antioxidant activated carbon with the growth regulator AIA and BAP allowed rapid growth until reaching the stage of being transferred to acclimation.

Keywords: antioxidants, growth regulators, orchids in vitro.

INDICE

HOJA DE APROBACIÓN.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INDICE.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE GRAFICOS.....	xi
LISTA DE FOTOS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	3
1.2. Identificación y Planteamiento del Problema.....	3
1. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
2. HIPÓTESIS.....	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Generalidades de la orquídea.....	6
4.1.1. Historia de las orquídeas.....	6
4.1.2. Historia de las orquídeas en Bolivia.....	6
4.1.3. Origen y distribución.....	7
4.1.4. Importancia ecológica de las orquídeas.....	7
4.1.5. Importancia económica de la orquídea.....	8
4.1.6. Endemismo.....	9

4.1.7.	Epífitas.....	9
4.1.8.	Tipos de crecimiento.....	10
4.1.9.	Morfología floral de las orquídeas.....	10
4.2.	Descripción de <i>Oncidium baueri</i>	10
4.2.1.	Clasificación taxonómica.....	10
4.2.2.	Características botánicas.....	11
4.2.3.	Biología de la polinización.....	13
4.2.4.	Biología de la germinación de semillas.....	14
4.3.	Cultivo in vitro.....	14
4.4.	Micropropagación in vitro.....	14
4.5.	Propagación in vitro por semilla de la orquídea.....	15
4.5.1.	Semillas de cápsula cerrada de orquídea.....	15
4.5.2.	Germinación asimbiótica in vitro de la semilla.....	16
4.6.	Reguladores de crecimiento vegetal.....	17
4.6.1.	Auxinas.....	17
4.6.2.	Citoquininas.....	17
4.6.3.	Extractos orgánicos.....	18
4.6.3.1.	Agua de coco.....	18
4.6.3.2.	Manzana.....	18
4.6.3.3.	Piña.....	19
4.6.3.4.	Plátano.....	19
4.6.3.5.	Tomate.....	19
4.7.	Antioxidantes.....	19
4.7.1.	Carbón activo.....	20
4.7.2.	Ácido cítrico.....	20
5.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	21
5.1.	Ubicación geográfica.....	21
5.2.	Materiales.....	21
5.2.1.	Material vegetal.....	21
5.3.	Materiales y equipos.....	22
5.4.	Procedimiento experimental.....	25

5.4.1.	Recolección del material vegetal.....	25
5.4.2.	Desinfección de las cápsulas.....	26
5.4.3.	Preparación de medios de cultivo.....	26
5.4.4.	Siembra del material vegetal del cultivo in vitro.....	29
5.4.5.	Cambio de medios (Sub cultivos).....	30
5.5.	Métodos empleados en la recolección de datos.....	30
a.	Germinación.....	30
b.	Contaminación.....	31
c.	Oxidación.....	32
d.	Estadios de crecimiento.....	33
e.	Altura de plántulas.....	33
f.	Número de hojas.....	34
g.	Número de raíces.....	34
5.6.	Diseño experimental.....	35
5.6.1.	Modelo estadístico.....	36
5.6.2.	Análisis y evaluación de datos.....	36
6.	RESULTADOS.....	37
6.1.	Germinación de semillas de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	37
6.2.	Contaminación de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	38
6.3.	Oxidación de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	39
6.4.	Estadios de crecimiento de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	41
6.5.	Altura de plántula de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	43
6.6.	Número de hojas de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	44
6.7.	Número de raíz de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	46
7.	DISCUSIÓN.....	48
7.1.	Germinación.....	48
7.2.	Contaminación.....	49
7.3.	Oxidación.....	49
7.4.	Estadios de crecimiento.....	50
7.5.	Altura de plántula.....	51
7.6.	Número de hojas.....	51

7.7.	Número de raíces.....	52
8.	CONCLUSIONES.....	53
9.	RECOMENDACIÓN.....	54
10.	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	55
10.1.	Consulta en internet.....	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro N° 1 Países exportadores de orquídeas.....	8
Cuadro N°2 Materiales, equipos e insumos utilizados en la presente investigación.....	23
Cuadro N° 3 Macronutrientes y micronutrientes usados en la preparación stock general.	24
Cuadro N° 4 Medios de cultivo para los tratamientos.....	27
Cuadro N° 5 Factores y tratamientos.....	35
Cuadro N° 6 Análisis de varianza para la germinación de la orquídea <i>Oncidium baueri</i> mediante cultivo in vitro.....	37
Cuadro N° 7 Análisis de varianza para la variable oxidación en la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	39
Cuadro N° 8 Análisis de los tratamientos de Estadios de crecimiento en las últimas nueve semanas.....	41
Cuadro N° 9 Análisis de varianza para altura de plántula de la orquídea <i>Oncidium baueri</i> en cultivo in vitro.....	43
Cuadro N° 10 Análisis de varianza para número de hojas de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	44
Cuadro N° 11 Análisis de varianza para número de raíz de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1. Germinación in vitro de la semilla de orquídea <i>Oncidium baueri</i>	38
Gráfico N°2. Porcentaje de la contaminación.....	39
Gráfico N° 3. Oxidación de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	40
Gráfico N°4. Estadio de crecimiento de la orquídea <i>Oncidium baueri</i> en los últimos dos meses.....	42
Gráfico N° 5. Altura de plántula de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	43
Gráfico N° 6. Número de hojas de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	45
Gráfico N° 7. Número de raíz de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	46

LISTA DE FOTOS

Foto 1	Planta de orquídea.....	12
Foto 2	Flores de orquídea.....	12
Foto 3	Frutos de orquídea.....	13
Foto 4	Semillas de <i>Oncidium baueri</i>	13
Foto 5	Ubicación geográfica del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.....	21
Foto 6	Cápsula en la planta.....	22
Foto 7	Cápsula (fruto) abierta.....	22
Foto 8	Semillas con vista microscópica.....	22
Foto 9	Recolección de las capsulas verdes.....	25
Foto 10	Desinfección de las capsulas con hipoclorito de sodio y agua.....	26
Foto 11	Peso de soluciones.....	27
Foto 12	Medición del pH.....	27
Foto 13	Siembra in vitro de la orquídea <i>Oncidium baueri</i>	29
Foto 14	Cambio del medio de cultivo.....	30
Foto 15	Semillas germinadas.....	31
Foto 16	Presencia de bacterias.....	31
Foto 17	Presencia de hongos.....	31
Foto 18	Sin presencia de agentes contaminantes.....	32
Foto 19	Oxidación de las semillas.....	32
Foto 20	Tratamientos y repeticiones en la última semana de evaluación.....	33
Foto 21	Medición de altura de plántula.....	33
Foto 22	Conteo de número de hojas.....	34
Foto 23	Conteo de número de raíces.....	34

1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son plantas con flores, que por su belleza y diversidad han fascinado a miles de personas en el mundo desde hace cientos de años. Se constituye como una de las familias más jóvenes desde el punto de vista evolutivo (Barbery y Morales; 2011).

La familia Orchidaceae tiene una amplia diversidad en el reino vegetal, estimado entre 750 géneros y 25.000 a 30.000 especies en todo el mundo (Thorpe y Yeung, 2011). Gracias a su capacidad evolutiva, presenta variaciones en el tamaño, la forma, la textura y el color de la flor, adquiriendo un aspecto atractivo como planta ornamental, llegando a tener valor potencial económico en el mercado mundial como plantas de ornato (Nagaraju y Mani; 2005).

De acuerdo con Orozco (1996); Estados Unidos, Inglaterra, Francia, Taiwán, Japón, China, Tailandia, Australia, Hawái y Singapur han profundizado el interés por el cultivo y la explotación de orquídeas, con dos objetivos definidos. El primero es el de la producción de flor cortada para abastecer el mercado internacional de floricultura. El segundo objetivo es el de producir y comercializar plantas de diferentes tamaños, para abastecer de plantas ornamentales el mercado interno de cada país.

En Bolivia, se estima que la riqueza potencial de orquídeas alcanza entre 2.000 y 3.000 especies de las cuales 1.200 han sido identificadas y descritas; además existen 400 especies endémicas. (Vásquez & Ibsch; 2004) estiman que las orquídeas ocupan el 10% de toda la flora total, dejando de un lado a todas las familias de las plantas.

Sin embargo, el periódico Los Tiempos menciona que Panozo 2014; resalta que el único levantamiento científico de datos sobre las orquídeas en Bolivia acompañado de descripciones gráficas está en los libros publicados por

Roberto Vásquez con la Fundación Amigos de la Naturaleza (FAN) faltando mayores estudios.

Según el Director Rubens Barbery del Centro para la Participación y el Desarrollo Humano Sostenible (Cepad), un estudio realizado hace cuatro años demostró que el festival de las orquídeas, durante los tres días, genera \$us 400.000 al municipio de Concepción, a través del turismo donde el centro de atracción son las orquídeas. (Periódico El Deber 2018).

La recolección excesiva e ilegal de orquídeas con fines comerciales, la destrucción de los árboles hospederos y su hábitat natural es una amenaza que pone en peligro de extinción. (Salazar *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). También la germinación de las orquídeas en estado silvestre presenta limitaciones, como la poca reserva de nutrientes en las semillas, lo cual es un factor limitante para su germinación y supervivencia (Chen y Chen; 2007).

Oncidium baueri al igual que otras especies del género *Oncidium*, poseen un alto potencial ornamental en proyectos paisajísticos y también como flor de corte. (Lorenzi & Souza; 2001).

Se caracterizan por ser una especie epífita, es decir que crecen sobre los árboles utilizándolos como hospederos; además estas plantas absorben agua que proviene de la lluvia y de la humedad relativa del aire; y nutrientes del proceso de descomposición de la materia orgánica del tronco. (Miller & Warren; 1996. Campos; 1998).

El cultivo in vitro es una importante herramienta para la germinación de las semillas de las orquídeas, siendo la única manera de aprovechar su propagación (Arditti y Ernst, 1993).

1.1 Justificación

En el departamento Pando, en los últimos años ha incrementado significativamente los focos de calor, causando la quema de todas las especies que encuentra a su paso, entre ellas están las orquídeas como *Oncidium baueri*, haciendo que en la actualidad algunas estén en peligro de extinción, sumado a la deforestación de especies comerciales aumentando el peligro para su existencia.

Para la reproducción o multiplicación de estas especies, desde años atrás se realizan investigaciones de los medios de cultivo in vitro asimbióticos más adecuados para cada especie de orquídeas; principalmente de aquellas especies que son endémicas de un país o región, están en peligro de extinción, tienen un valor alto económico o que son símbolo de algún país.

La biotecnología vegetal a través del cultivo in vitro, hace posible la germinación hasta la formación de plántulas orquídeas de una sola capsula, bajo condiciones asépticas apropiadas; además de acortar el tiempo del desarrollo fenológico en comparación con su medio natural, además se obtienen plantas vigorosas y sanas.

Los resultados de la presente investigación, permitirán adoptar la(s) mejor(es) alternativa(s) para la reproducción in vitro de orquídea *Oncidium baueri* y a corto plazo, manteniendo así la diversidad de especies ornamentales en la región amazónica.

1.2. Identificación y Planteamiento del Problema

El problema principal de la especie *Oncidium baueri* es la dificultad de germinación en su medio natural; por tener semillas tan pequeñas (polvo), que además carecen de endospermo, conteniendo poca reserva de alimento.

Otro de los problemas que presenta es la destrucción de su hábitat con la deforestación de los bosques, ocasionado por la quema y tala.

El tráfico de las orquídeas es un problema que aporta a la disminución de la población de cada especie, impidiendo la propagación en su medio natural.

En América Latina, existen países que le dan un valor cultural a varias especies de esta amplia y exótica familia; Costa Rica declaró flor nacional a *Guarianthes kinneriy* Venezuela hizo lo mismo con la orquídea *Cattleya mossiae*; además existen parques nacionales donde el principal atractivo son las orquídeas como; el Parque Nacional Natural Las Orquídeas, de 32.000 hectáreas aproximadamente, se localiza en la vertiente occidental de la cordillera occidental de Colombia.

A nivel nacional el Departamento de Santa Cruz aprecia las especies que se encuentran en su territorio; no solo con la realización del Festival de Orquídeas que cada año se realiza en Concepción, también el año 2010 decreto a la orquídea endémica *Oncidium stacy* como patrimonio cultural y natural declarándola flor símbolo de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra.

Se menciona en el Plan Departamental de Desarrollo Forestal de Pando como una necesidad de investigación sobre los recursos forestales a nivel de procesos y reproducción de tejidos o micro propagación.

Con el propósito de conservar la especie *Oncidium baueri*, que es una especie endémica de América tropical, y encontrarse en nuestro Departamento; además de tener atractivas flores y presentar un valor ornamental; por tales motivos se propagaran a través del cultivo in vitro de semillas.

Conociendo los problemas mencionados se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el antioxidante y regulador de crecimiento adecuado para la propagación in vitro con plántulas de orquídea *Oncidium baueri* a partir de semillas?

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar y comparar los antioxidantes y reguladores de crecimiento más adecuados para la propagación in vitro de la plántula de *Oncidium baueri* a partir de semillas.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el regulador de crecimiento con mayor porcentaje de germinación de las semillas de *Oncidium baueri* a través del cultivo in vitro.
- Evaluar el agente antioxidante con menor incidencia de oxidación en el establecimiento de la orquídea *Oncidium baueri*.
- Comparar los tratamientos para establecer los antioxidantes y reguladores de crecimiento con mejor desarrollo fenológico de las plántulas durante la propagación in vitro de *Oncidium baueri*.

3. HIPÓTESIS

Ha: Los antioxidantes y reguladores de crecimiento influyen en el desarrollo para la propagación in vitro de *Oncidium baueri*.

Ho: Los antioxidantes y reguladores de crecimiento no influyen en el desarrollo, para la propagación in vitro de *Oncidium baueri*.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Generalidades de la orquídea

4.1.1. Historia de las orquídeas

El nombre orquídeo fue usado por primera vez por Teofrasto, filósofo de la antigua Grecia que vivió entre el siglo VI y el V a.C. que escribió el primer tratado sistemático de botánica farmacología "De historia plantarum" dónde habla de algunas plantas que presentaron dos tubérculos redondeados en la base de las raíces. Del parecido con los testículos de los hombres, Teofrasto las llamó "Orchis" que en griego significa precisamente "testículos" de ahí se origina el nombre" orquídeas." (Tiza; 2010 cita a Sequeira; 1980)

Existen escritos chinos de 1.500 años de antigüedad donde se hace referencia al cultivo de las orquídeas. En la antigua Grecia se le atribuían propiedades curativas y afrodisíacas.(Wikipedia.com cita a Freuler; 2008)

Los aztecas utilizaban una orquídea: la vainilla, para enriquecer una bebida espesa hecha a base de cacao, destinada a los nobles y a los guerreros, conocida con el nombre de xocoatl. (Wikipedia.com cita a Ecott, s/f; Bernardino de Sahagún, s/f)

4.1.2. Historia de las orquídeas en Bolivia

En el siglo 18 casi todos los países de Sud América tenían su flora estudiada, pero Bolivia recién comenzó un estudio de nuestra flora en los siglos XIX y XX. En lo que concierne a orquídeas se empieza un estudio científico de esta familia y sus colecciones en la tercera parte del siglo XX con los aportes de Luer, Dodson, Vásquez e Ibish. Antes sólo contábamos con un listado de Foster de 1.958 con alrededor de cien especies de orquídeas de Bolivia, de acuerdo con registros de Haenke, Pflansi, d'Orbigny y otros. A la fecha contamos con alrededor de 1.500 especies coleccionadas por los

estudiosos antes citados, de las cuales 1.200 están identificadas y publicadas en los dos volúmenes en Bolivia, por Vásquez e Ibish. (Moreno; 2005)

4.1.3. Origen y distribución

Los científicos consideran que las orquídeas se originaron aproximadamente hace 100 a 120 millones de años. Se cita el Archipiélago de Borneo como el posible lugar de origen de estas interesantes plantas (Sequeira, 1980).

En cuanto a la distribución de la familia Orchidaceae se encuentran en todo el planeta, desde la Siberia hasta la Tierra del Fuego, con excepción de los polos y lugares con alturas superiores a los 4.500 metros sobre el nivel del mar. Muchas son epífitas (crecen sobre otras plantas) y se las ve creciendo en bosques tropicales húmedos o en bosques secos o semi-desérticos del planeta. Muchas son litofitas, viven adheridas a las rocas de las laderas de montañas y una buena parte son terrestres, habiéndose adaptado a vivir tanto en los desiertos como en las sabanas inundadizas, en campos rupestres o en los valles montañosos. (Vásquez; 1995)

Específicamente la especie *Oncidium baueri* se encuentra distribuida desde las Islas de Sotavento, Puerto Rico, Costa Rica, Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Brasil, Ecuador, Perú y Bolivia en las zonas tropicales, bosques húmedos montanos a partir de 1.300 m.s.n.m. (Wikipedia.com).

4.1.4. Importancia ecológica de las orquídeas

Oncidium baueri es una especie epífita y como todas las plantas, juegan un papel importante dentro de los ecosistemas y en particular las plantas epífitas no se quedan atrás, ya que éstas ofrecen una gran diversidad de nichos y recursos que son aprovechados por los animales, como hormigas, arañas, pequeños mamíferos (ratones), anfibios, aves y reptiles, contribuyendo al

incremento de la biodiversidad del ecosistema en donde se encuentran. (Saldaña, Juárez y Villar 2014)

Las orquídeas epífitas son el grupo de plantas que han podido colonizar con más éxito las copas de los árboles (Hágsater *et al.*, 2005). Sin embargo, éstas son altamente depredadas por lo que se considera que se les debe brindar una protección especial.

4.1.5. Importancia económica de la orquídea

Las importaciones de mayor volumen se dan en los países europeos y Japón, entre las especies comerciales más importantes cultivadas por su tamaño y belleza están en Europa y América; *Cattleya* y *Cymbidium*; *Dendrobium* en Tailandia; *Vanda* y *Phalaenopsis* en Filipinas; *Aranda* en Malasia y Singapur; *Dendrobium* y *Vanda* en Hawái. El cultivo y desarrollo de nuevas tecnologías, ha generado la producción de híbridos, los cuales se exportan a gran escala (Ammirato, 1990).

Cuadro N° 1 Países exportadores de orquídeas

País/origen	Unidades	Valor (US \$)
Tailandia	1.359.938	396.000
Holanda	1.093.548	342.000
Singapur	103.439	138.000
Nueva Zelanda	63.991	124.000
Colombia	29.800	2.000
Indonesia	15.000	41.000
Panamá	6.580	5.000
Taiwán	1.950	4.000
Total	2.674.246	1.052.000

Fuente: Dpto. de comercio USA (2000)

4.1.6. Endemismo

Endemismo es un término utilizado en biología para indicar que la distribución de un taxón está limitada a un ámbito geográfico reducido y que no se encuentra de forma natural en ninguna otra parte del mundo. Por ello, cuando se indica que una especie es endémica de cierta región, significa que solo es posible encontrarla de forma natural en ese lugar. Wikipedia.com.

El endemismo puede considerarse dentro de un abanico muy amplio de escalas geográficas. Así, un organismo puede ser endémico de una cima montañosa o un lago, de una cordillera o un sistema fluvial, de una isla, de un país o incluso de un continente. Wikipedia.com.

4.1.7. Epífitas

La palabra epífita (del griego *epi* sobre y *phyton* planta), se refiere a las plantas que crecen sobre otro organismo vegetal, llamado forofito, que utilizan solamente como soporte; las raíces de la epífita se adhieren al forofito pero no obtienen ningún tipo de nutrimentos de él. Los nutrimentos son provenientes de fuentes como el polvo y la lluvia; además, aprovechan la descomposición de hojas, y otros organismos enteros o fragmentarios muertos; (Parra; 2013).

Las orquídeas, han desarrollado un tejido especializado que cubre sus raíces, recibe el nombre de “velamen”, siendo este un tipo de epidermis formado por capas de células muertas, engrosando las paredes celulares; así, el velamen protege a las raíces de daños y absorbe el agua en la temporada de lluvias, mientras que en la temporada seca proporciona una barrera que impide la pérdida de agua por transpiración. (Parra; 2013)

4.1.8. Tipos de crecimiento

Las orquídeas presentan dos tipos de crecimientos, monopodial y simpodial:

Se llama monopodiales a las orquídeas que crecen a partir de un sólo punto y se van desarrollando cada año, añadiendo hojas y creciendo un tallo en proporción. No tienen pseudobulbos ni rizoma y sus raíces normalmente son aéreas (frecuentemente colgantes), por esta razón las especies adaptadas a períodos de sequía, tienen hojas abultadas que les sirven como reserva. (Menchaca; 2011)

Las orquídeas que crecen en forma simpodial, lo hacen hacia los lados, en los que uno de los brotes terminales muere y continúa el crecimiento con la aparición de nuevos brotes. Éstas siempre tienen pseudobulbos. (Menchaca; 2011)

4.1.9. Morfología floral de las orquídeas

Las flores en general son hermafroditas (raramente unisexuales), en general cigomorfas (de simetría bilateral), usualmente resupinadas, es decir, las partes florales giran 180° durante el desarrollo. Las flores están formadas por tres elementos externos llamados sépalos, dos laterales y uno dorsal, y tres elementos internos llamados pétalos, el inferior modificado en un labio o "labelo" de tamaño mayor y color más intenso que los demás. A veces son interpretados como 6 pétalos en dos verticilos en lugar de 3 sépalos y 3 pétalos (Simpson; 2005).

4.2. Descripción de *Oncidium baueri*

4.2.1. Clasificación taxonómica

Su clasificación es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Cymbidieae

Subtribu: Oncidiinae

Género: *Oncidium*

Sección: Oblongata

Especie: *Oncidium baueri*

Según John Lindley (1833).

4.2.2. Características botánicas

Oncidium baueri es una especie de orquídeas epifitas; nativa de América tropical.

Su nombre se debe del griego onkidion que significa pequeño abultamiento, en referencia al callo que presenta en el labelo (flor), y baueri: epíteto otorgado en honor de Ferdinand Bauer (Botánico y pintor austriaco de los años 1.800).

Aunque vulgarmente se conoce mejor como "Lluvia de Oro", en alusión a su forma esplendorosa en florecer, de amarillo brillante.

Es una especie herbácea de un gran tamaño, que prefiere el clima caliente, con un tipo de crecimiento simpodial.

Tiene pseudobulbos envueltos por varias vainas con 2 a 3 hojas apicales, lineales, acuminadas.

Produce una inflorescencia colgante, de 1,4 a 2,5 metros de largo, con 7 a 20 flores, tiene muchas panículas ramificadas con brácteas lanceoladas, acuminadas, papiráceas con 7 flores en cada rama que florecen en la primavera. Wikipedia.com.



Foto 1. Planta de orquídea



Foto 2. Flores de orquídea



Foto 3. Frutos de orquídea

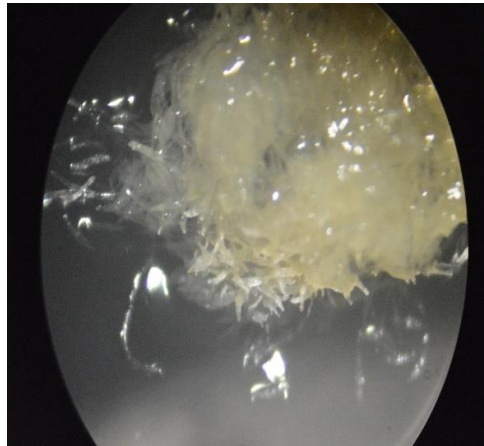


Foto 4. Semillas de *Oncidium baueri*

4.2.3. Biología de la polinización

La belleza de las orquídeas también se refleja en su reproducción considerada compleja y cruzada. Moreno explica que la misma es realizada por las abejas, avispas, moscas y el viento. Para ello algunas orquídeas incluso tienen la forma de una abeja a fin de atraer a sus polinizadores. (Los Tiempos.com.2014)

Las estructuras claves para la polinización son aquellas compuestas: el labelo y la columna. El labelo actúa como plataforma de aterrizaje, para que el polinizador tenga el tiempo necesario para que el polen se pegue a su cuerpo. La columna en su parte superior, recibe el polen adosado al insecto, proveniente de otra flor. El polen no se encuentra libre, sino agrupado en dos polinios, los cuales poseen una sustancia viscosa que se adhiere al insecto permitiendo el transporte en el cuerpo del insecto o en su probóscide. (Moreira; 2009).

4.2.4. Biología de la germinación de semillas

Las semillas de orquídeas, son minúsculas, conocidas usualmente como semillas de polvo y además contienen pocas reservas de alimento. En su medio natural germinan en simbiosis con un hongo micorriza, éste les proporciona durante su evolución, los azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean adultas, tiempo que ya fabricarán su propio alimento, a su vez le facilitan al hongo la fotosíntesis que no puede llevar a cabo por sí mismo, por lo que esta unión les beneficia a ambos. La semilla germinada produce a su alrededor una masa sin forma de células llamada protocormo. (ljardineros.com 2010).

Dependiendo de la especie y manteniendo las condiciones normales, el protocormo avanzará en su crecimiento por varias semanas, pueden ser meses o incluso años, hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas.

En el caso de los protocormos de las orquídeas epífitas son generalmente verdes, posibilitándolos a producir parte de su alimento. (ljardineros.com 2010).

4.3. Cultivo in vitro

Segretín (2006), menciona que el cultivo in vitro (término que literalmente significa *en vidrio*), incluye diferentes técnicas; consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explanto, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas.

4.4. Micropropagación in vitro

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. (Tiza; 2010)

Lara; 2001 aporta que la propagación in vitro comprende cuatro etapas importantes en la producción:

- Etapa I: siembra de embriones (semillas).
- Etapa II: traspaso a la multiplicación. Cada mes se hace un traspaso a un frasco con medio de cultivo fresco para su crecimiento y se conocen como subcultivos. En orquídeas es de 6 a 8 dependiendo de la especie.
- Etapa III: Enraizamiento.
- Etapa IV: Aclimatación que consiste en el traspaso al invernadero.

4.5. Propagación in vitro por semilla de la orquídea

Tanto en forma convencional como in vitro, las orquídeas se pueden multiplicar en forma sexual, así como asexual o vegetativamente. En la propagación

vegetativa se obtiene una descendencia igual a la planta madre. Al utilizar semillas de plantas cultivadas, la descendencia será heterogénea y rara vez igual al material inicial. (Pierik; 1990).

4.5.1. Semillas de cápsula cerrada de orquídea

Para Valmayor y Sagawa, (1967), citado por Pierik, (1990), las semillas de orquídeas pueden germinar fácilmente in vitro cuando se cosecha la cápsula cerrada, aunque no esté madura, teniendo las siguientes ventajas:

- La esterilización es más fácil en una cápsula cerrada y con menor riesgo que se dañe.
- El aborto embrionario es menor.
- Las semillas inmaduras se pueden sembrar 2 ó 3 meses antes de que las cápsulas maduren.

4.5.2. Germinación asimbiótica in vitro de la semilla

La germinación asimbiótica es usualmente usada en la propagación de orquídeas tropicales. Utilizando los medios de cultivo in vitro, que sustituyen los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo argumenta (McKendrick; 2000).

Según (Pierik; 1990) las razones para propagar orquídeas in vitro son:

- ✓ La germinación in vitro de las semillas de orquídeas tiene más probabilidades de éxito por ser muy pequeñas y por sus escasas reservas alimenticias.
- ✓ La germinación y el desarrollo de los protocormos y eventualmente de las plántulas in vitro se desarrollan rápidamente.

- ✓ En la naturaleza, la semilla para poder germinar depende de una relación simbiótica con un hongo. Sin embargo, in vitro es posible sustituir la acción del hongo por un medio nutritivo (asimbiótico).
- ✓ Con un medio nutritivo se puede conseguir un 100% de germinación in vitro, lo cual no sucede en la naturaleza
- ✓ La siembra de embriones inmaduros es posible mediante la propagación in vitro, acortándose el ciclo de mejora.
- ✓ En el laboratorio se obtiene un ambiente controlado y sin competencia por hongos y bacterias.

4.6. Reguladores de Crecimiento Vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal, son un grupo de sustancias químicas que inhiben, estimulan o retardan el desarrollo y crecimiento de las plantas. La literatura maneja términos como hormonas vegetales, fitohormonas, fitorreguladores y biorreguladores; este último término no es muy usado entre los investigadores. Algunos autores clasifican como reguladores de crecimiento a todas aquellas sustancias de síntesis artificial, mientras que la clasificación de hormonas vegetales o fitohormonas se da a los compuestos de síntesis endógena (Pessarakli, 2001; Segura, 2003 citado por Neyoy 2012).

Arditti y Ernst (1993), manifiestan que la mayoría de los tejidos de orquídeas requieren auxinas y citoquininas para su crecimiento.

4.6.1. Auxinas

El principal efecto de las auxinas es la elongación de las células, debido principalmente a que la pared celular se hace más plástica. Son sintetizadas en los ápices meristemáticos y en menor cantidad en las raíces. La auxina principal sintetizada de forma natural por las plantas es el ácido indol acético (AIA), aunque se han encontrado otras como el ácido fenilacético, los cloroindoles y más recientemente, el ácido indolbutírico (AIB). El movimiento de estas

fitohormonas por la planta es desde los ápices hasta las raíces (translocación basipétala) y viceversa (acropétala). Sin embargo, el movimiento basipétalo es mucho más rápido que el acropétalo. (CANNA Research).

4.6.2. Citoquininas

Las citoquininas estimulan la división y diferenciación celular que afecta a una amplia gama de procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, entre lo que cabe citar la iniciación del desarrollo del cloroplasto, fotosíntesis, la expansión de los cotiledones, así como la inducción de la formación de brotes en cultivo vegetales (Condemarin *et al* 2007 cita a Salisbury & Ross 2000, AscónBieto & Talon 2001, Martínez; 2002).

Las citoquininas se dividen en naturales: como la zeatina N6 (N6-4 Hidroxi, 3 metil, 2 butiril) y las sintéticas como la quinetina (KIN), y la más utilizada N6 Benzylaminopurina (BAP), también N6 Benciladenina (BA).

4.6.3. Extractos orgánicos

El empleo de sustancias orgánicas es de gran importancia para favorecer procesos germinativos o para el desarrollo y aclimatización de orquídeas debido a que estimula el crecimiento y la formación de raíces y pseudobulbos. Además, posee la ventaja de su bajo costo comparado con el de reguladores de crecimiento como las auxinas y citoquininas. (Pérez *et al* 2016 cita a Minea *et al.*, 2004; Moreno *et al* 2007; Flores *et al.*, 2008; Salazar *et al*, 2012).

4.6.3.1. Agua de coco

El agua de coco, contiene altas concentraciones de azúcares, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento vegetal (Arditti; 1993); además de ser rica en magnesio y fosfato contiene alrededor de 2,5% de azúcar. Las hormonas que tiene el agua de coco

son auxinas, giberelinas, 1, 3 diferilurea, zeatina, glucosido de zeatina, ribosido de zeatina (Roca y Mroginski; 1991).

4.6.3.2. Manzana

La manzana es una de las frutas más completas y enriquecedoras. Un 85% de su composición es agua, por lo que resulta muy refrescante e hidratante. Los azúcares, la mayor parte fructosa (azúcar de la fruta) y en menor proporción, glucosa y sacarosa de rápida asimilación en el organismo, son los nutrientes más abundantes después del agua. Es fuente discreta de vitamina E o tocoferol y aporta una escasa cantidad de vitamina C. Es rica en fibra, en cuanto al contenido mineral sobresale el potasio. La vitamina E posee acción antioxidante. (Flores *et al* 2014)

4.6.3.3. Piña

También (Kitsaki *et al.*, 2004;) coinciden en que el agua de coco y el jugo de piña, son ricos en energía, vitaminas, aminoácidos y fitohormonas.

Salazar y Cancino (2012), indican que el mejor porcentaje de germinación se desarrolló en el medio de cultivo suplementado con jugo de piña para las especies de *Prosthe cheavespa* y *Sobralia klotzscheana*.

4.6.3.4. Plátano

Blasco y Gómez (2014) aportan que la pulpa de plátano contiene diversas propiedades, es una excelente fuente de potasio. El potasio se puede encontrar en una variedad de frutas, verduras o incluso carnes, sin embargo, un solo plátano puede proporcionar hasta el 23% de potasio que se necesita al día. El plátano es rico en vitaminas A, B6 , C y D. Ya que uno solo de estos frutos contiene el 41% del requerimiento necesario de vitamina B6 al día.

4.6.3.5. Tomate

Los tomates tienen un gran contenido de agua (95%). El otro 5% consiste principalmente de carbohidratos y fibra. (Ferreiro; 2018).

4.7. Antioxidantes

(Pedroza *et al* 2010) menciona que la oxidación fenólica es un factor importante que puede ocasionar serios problemas en el establecimiento y la supervivencia de los explantes de la mayoría de las especies. Cuando los tejidos son dañados se liberan compuestos fenólicos que se manifiestan con un ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante, que se puede extender a todo el medio, provocar daños al crecimiento y hasta su muerte.

Una de las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica es agregar antioxidantes al medio de cultivo, los que son inhibidores de la polifenoloxidasas o adsorbentes. Entre los más empleados se pueden citar los ácidos ascórbico, cítrico y málico y carbón activado (Pedroza y Micán, 2006).

4.7.1. Carbón activo

Arditti y Ernst (1993), plantearon que entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos de orquídeas se encuentra el aumento de la aireación del medio de cultivo. Una segunda razón es que absorbe el etileno, el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación, y basado en el estudio de las características de absorción y cambios que se producen en el medio de cultivo durante el autoclavado. El carbón activo también puede absorber las hormonas vegetales y las vitaminas lo que explica por qué en ocasiones puede ser inhibidor del crecimiento.

4.7.2. Ácido cítrico

El ácido cítrico es un antioxidante muy utilizado en el cultivo in vitro para evitar la oxidación de tejidos, son solubles en agua que ayudan a la reducción de fenoles en el medio de cultivo Thorpe *et al.* (1991).

Las concentraciones optimas del ácido cítrico oscilan de (50 a 100 mg. /l). (Dublín s/ f, citado por Roca & Mrogniski, 1991).

5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1. Ubicación geográfica

El trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Pando; Municipio Cobija; Cantón Santa Cruz; en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente al Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando.



Foto 5. Ubicación geográfica del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Ubicada a 11° 01' 59,20'' de Latitud Sur y 62° 45' 31,13'' de Longitud Oeste.

5.2. Materiales

5.2.1. Material vegetal

El material vegetal que se utilizó, fueron cápsulas verdes de *Oncidium baueri* (frutos falsos de las orquídeas); que contienen millones de semillas, aunque una pequeña parte no son viables para la germinación, las mismas que fueron adquirida del vecino país Epitaciolandia - Acre-Brasil.



Foto 6. Cápsula en la planta



Foto 7. Cápsula (fruto) abierta

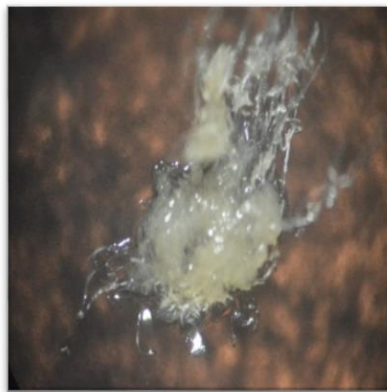


Foto 8. Semillas con vista microscópica.

5.3. Materiales y equipos

Cuadro N°2 Materiales, equipos e insumos utilizados en la presente investigación.

<i>Equipos e Instrumentos de Laboratorio</i>	<i>Materiales de Campo y de Gabinete</i>	<i>Materiales e Insumos de Desinfección y Reguladores de Crecimiento Orgánicos</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ EQUIPOS • Agitador magnético. • Autoclave. • Balanza analítica. • Balanza de precisión • Cámara de flujo de aire horizontal • Estereoscopio • Microondas • Microscopio • pH metro. 	<ul style="list-style-type: none"> • MATERIAL DE CAMPO • Frasco esterilizado • Lupa • Tijera • Cuchillo pequeño • Licuadora 	<ul style="list-style-type: none"> • MATERIALES DE DESINFECCION • Agua común • Agua de botellón • Agua destilada esterilizada • Alcohol etílico al 70% y 96% • Bisturí • Detergente Ola • Escobilla pequeña • Hipoclorito de sodio al 2%, 5% y 10%. • Mechero de alcohol • Papel de aluminio
<ul style="list-style-type: none"> ✓ INSTRUMENTOS • Cajasetri • Frascos vidrio de 250ml y 500ml para almacenar soluciones • Frascos âmbar com rosca de 500ml y 1000ml • Jeringas 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ MATERIAL DE GABINETE • Cámara fotográfica • Computadora • Cuadernillo • Impresora • Internet • Lapicero • Lápiz 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ REGULADORES DE CRECIMIENTO ORGANICOS • Coco • Manzana • Piña • Plátano • Tomate

dosificadoras <ul style="list-style-type: none"> • Magentas • Pinzas • Probetas de 10, 50, 100, 200,500 y 1000ml. • Tubos de ensayo • Vasos precipitados de 25, 50, 100, 500 y 1000ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Regla • USB 	
---	--	--

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 3 Macronutrientes y micronutrientes usados en la preparación stock general. Darías (1993)

Soluciones stock	Cantidad (mg/g/L)	Medio de cultivo (ml)
a. Macronutrientes 10 x (g/l)		
KNO ₃ nitrato de potasio	19.0 g	100 ml
NH ₄ NO ₃ nitrato de amonio	16.5 g	
CaCl ₂ · 2H ₂ O cloruro de calcio	4.4 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O sulfato de manganeso	3.7 g	
b. Micronutrientes 100 x (g/l)		

H3BO3 ácido bórico	0.62 g	10 ml
MnSO ₄ . H ₂ O sulfato de manganeso	1.69 g	
ZnSO ₄ . 7H ₂ O sulfato de zinc	0.86 g	
c. Vitaminas 1000 x (mg/100ml)		
Tiamina – HCL	0.01 mg	10 ml
Myo- inositol	1 g	

Fuente: Rodolfo Darías Rodríguez

5.4. Procedimiento experimental

5.4.1. Recolección del material vegetal

Se recolectaron 6 cápsulas verdes de una planta de orquídea *Oncidium baueri*, en el orquidario de la señora Dovildes Maffi.



Foto 9. Recolección de las capsulas verdes

5.4.2. Desinfección de las cápsulas

Las cápsulas fueron llevadas al laboratorio y se procedió a su lavado, en una mezcla esponjosa de detergente y dos gotas de ola en agua; luego con ayuda de un cepillo se lavó el exterior de la cápsula cuidando de no maltratarla.

Después de enjuagarlas con agua de botellón estéril, se colocó todas las cápsulas en hipoclorito de sodio al 1% (NaClO) por 10 minutos, posteriormente se enjuago 4 veces con agua de botellón estéril.

En la cámara de flujo laminar se pusieron todas las cápsulas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos (NaClO), luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril para luego sembrarlas al medio de cultivo.



Foto 10. Desinfección de las capsulas con hipoclorito de sodio y agua.

5.4.3. Preparación de medios de cultivo

Como soluciones stock general o solución madre se preparó la solución del medio nutritivo desarrollado de Murashige y Skoog (1962) que se describe en la tabla N° 3 y 4; utilizado con éxito en casi todas las especies de orquídeas Hurtado y Merino (1987).





Foto 11. Peso de soluciones



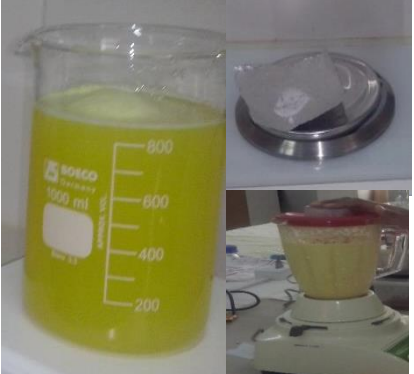
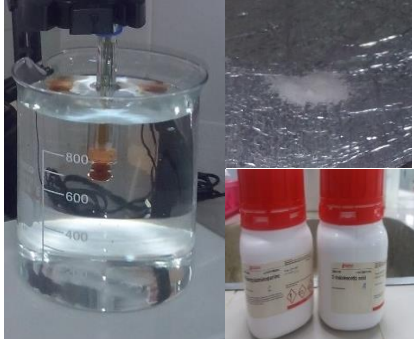


Foto 12. Medición del pH

Cuadro N°4. Medios de cultivo para los tratamientos

En el siguiente cuadro se describirá cada medio de cultivo utilizados como tratamientos:

Medio de cultivo	Descripción
<p>M1</p> 	<p>Murashige y Skoog; adicionado con 30g/L de sacarosa; 2g/L de phytigel; 2ml/L de L-cisteyna; 80g/L de plátano, manzana y tomate; 200ml/L de agua de coco; y 2g/L de carbón activo.</p>
<p>M2</p> 	<p>Murashige y Skoog; adicionado con 30g/L de sacarosa; 2g/L de phytigel; 2ml/L de L-cisteyna; 200ml/L de jugo de piña; 200ml/L de agua de coco; y 2g/L de carbón activo.</p>

M3		<p>Murashige y Skoog; adicionado con 30g/L de sacarosa; 2g/L de phytigel; 2ml/L de L-cisteina; 10ml/L de AIA; 2ml/L de BAP; y 2g/L de carbón activo.</p>
M4		<p>Murashige y Skoog; adicionado con 30g/L de sacarosa; 2g/L de phytigel; 2ml/L de L-cisteina; 80g/L de plátano, manzana y tomate; 200ml/L de agua de coco; y 70mg/L de ácido cítrico.</p>
M5		<p>Murashige y Skoog; adicionado con 30g/L de sacarosa; 2g/L de phytigel; 2ml/L de L-cisteina; 200ml/L de jugo de piña; 200ml/L de agua de coco; y 70mg/L de ácido cítrico.</p>
M6		<p>Murashige y Skoog; adicionado con 30g/L de sacarosa; 2g/L de phytigel; 2ml/L de L-cisteina; 10ml/L de AIA; 2ml/L de BAP; y 70mg/L de ácidocítrico.</p>

Fuente: Elaboración propia

5.4.4. Siembra del material vegetal del cultivo in vitro

La introducción del material vegetal se realizó en condiciones asépticas, en la cámara de flujo laminar horizontal, con el uso de alcohol al 70 y 96% para la esterilización de los instrumentos con los que se hizo la siembra.

Con la ayuda de una pinza se extrajo una porción de semillas para sembrarlas en cajas petri; que contienen los medios de cultivo, luego de sellar con film; inmediatamente se trasladó al área de crecimiento. Se procedió a la incubación a 25 °C con una humedad relativa de 90% y un fotoperiodo de 16 horas luz.



Foto 13 Siembra in vitro de la orquídea *Oncidium baueri*

5.4.5. Cambio de medios (Sub cultivos)

Los cambios de medios de cultivo se realizaron al observar que los protocormos tenían un tamaño considerable y el espacio se fue reduciendo en la caja petri o frasco.



Foto 14.

5.5. Métodos empleados en la recolección de datos

Se realizó la evaluación haciendo uso de los siguientes parámetros en las siete variables:

a. Germinación

En la variable de germinación se realizó la evaluación cada semana durante un mes y medio, observando el brote del embrión rompiendo la testa de las semillas sembradas en las cajas petri; de acuerdo a los valores de:

1 = plantas germinadas

2 = plantas no germinadas

Según la escala de Mamani, (1993).

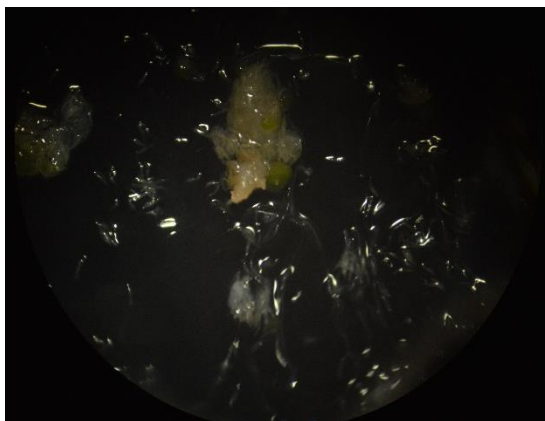


Foto 15. Semillas germinadas

b. Contaminación

La variable de contaminación se evaluó, con un seguimiento semanal durante un mes observando el porcentaje de la contaminación (presencia de bacterias u hongos presentes en el medio de cultivo o en la semilla de orquídea) de acuerdo a la escala de Mamani, (1993).

1 = plantas contaminadas

2 = plantas no contaminadas



Foto 16 presencia de bacterias

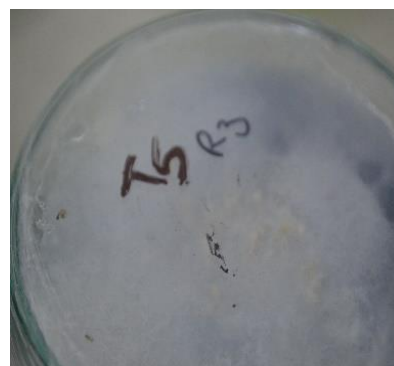


Foto 17 presencia de hongos

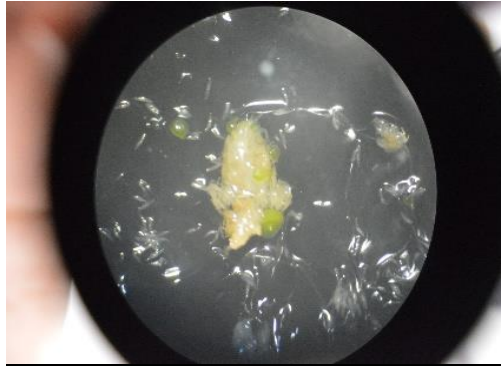


Foto 18. Sin presencia de agentes contaminantes

c. Oxidación

Se realizó seguimiento a los tratamientos observando si las plantas presentaron oxidación (adquiriendo color marrón), de acuerdo a la escala de Mamani, (1993).

1 = plantas sin oxidación

2 = plantas con oxidación



Foto 19.

d. Estadios de crecimiento

Para la variable de estadios de crecimiento se registraron los datos cada semana, durante 9 meses, el tiempo en que la semilla viable de orquídea se desarrolló hasta la formación de la plántula.



Foto 20. Tratamientos y repeticiones en la última semana de evaluación

e. Altura de plántulas

En la variable altura de plántulas se realizó la medición al final del desarrollo de los explantes (formación de plántulas) de orquídea *Oncidium baueri* en condiciones in vitro, se extrajeron 10 plántulas al azar en las doce repeticiones por los seis tratamiento, con ayuda de una regla metálica y se midió desde las hoja hasta la raíz.



Foto 21. Medición de altura de plántula

f. Número de hojas

Finalizando la etapa 8 del desarrollo, se sacaron al azar 10 plántulas de cada tratamiento en las doce repeticiones; para conocer el número de hojas se procedió al conteo de todas las hojas por plántula.



Foto 22. Conteo de números de hojas

g. Número de raíces

El número de raíz se conoció al extraer 10 individuos al azar y se contaron todas las raíces que presentaban cada plántula de cada repetición en los 6 tratamientos.



Foto 23 Conteo de numero de raíces

5.6. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en la presente investigación fue distribución completamente al azar bifactorial.

Cuadro N° 5 Factores y tratamientos.

Factor (a)	Factor (b)
Antioxidantes	Reguladores de crecimiento
A 1= Carbon activo	B 1= coco, plátano, manzana y tomate. B 2= coco y piña B 3= AIA y BAP (Ácido indolacético)
A 2= Ácido cítrico	B 1= coco, plátano, manzana y tomate. B 2= coco y piña B 3= AIA y BAP

El número de repeticiones fueron doce; por lo tanto, el número de las unidades experimentales son $2 \times 3 \times 12 = 72$

El número de tratamientos fueron seis:

A1 B1	A2 B1
A1 B2	A2 B2
A1 B3	A2 B3

5.6.1. Modelo estadístico

Los datos de cada una de las variables de respuesta fueron sometidos al diseño experimental y se analizaron según el siguiente modelo estadístico:

$$\hat{Y} = \mu + B_i + A_j + R_k + A_jR_k + \varepsilon$$

Dónde:

\hat{Y} = Valor de una variable de respuesta observado en una unidad experimental

μ = media general

B_j = Efecto del j-ésimo bloque o repetición

A_j = *Efecto del j-ésimo tipo de antioxidante*

R_k = *Efecto del k-ésimo regulador de crecimiento*

A_jR_k = *Efecto de la interacción entre el tipo de antioxidante y regulador de crecimiento*

ε_{ijk} = Error experimental

5.6.2. Análisis y evaluación de datos

Para el análisis y evaluación de los resultados, los datos obtenidos fueron transcritos en una hoja electrónica del Microsoft Excel, posteriormente se importaron a una base de datos del paquete estadístico Asistat versión 7.7; se sometieron al análisis de varianza considerando un 5% de probabilidad de error o significancia. En caso de observarse diferencias significativas entre los tratamientos, sub-tratamientos o interacción, los promedios de los tratamientos fueron sometidos a la prueba múltiple de Duncan, considerando la misma probabilidad de error.

6. RESULTADOS

6.1. Germinación de semillas de la orquídea *Oncidium baueri*

Cuadro N° 6: Análisis de varianza para la germinación de la orquídea *Oncidium baueri* mediante cultivo in vitro.

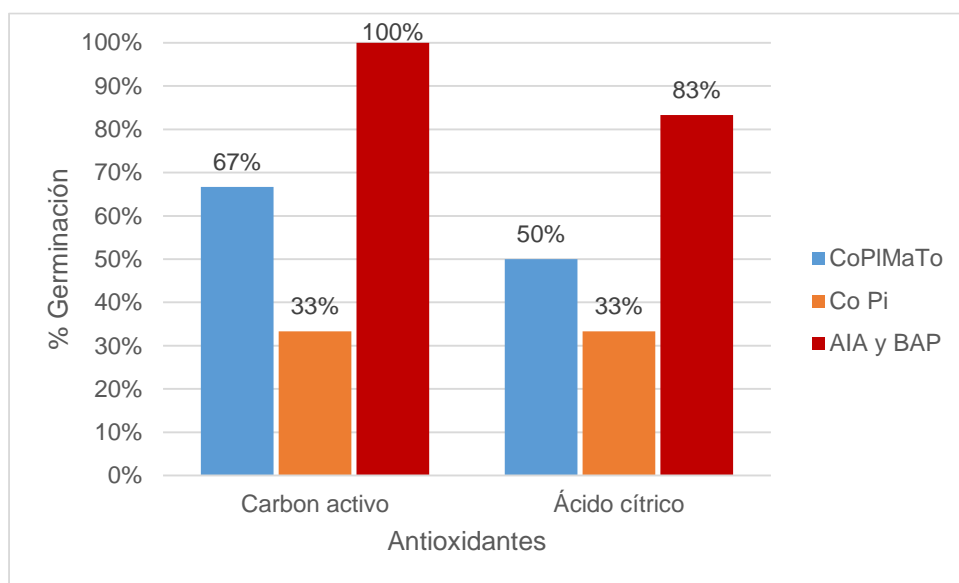
FV	GL	CM	F
Antioxidantes	1	0.11111	0.53 ns
Reguladores	2	1.02778	4.87 *
Interacción	2	0.02778	0.13 ns
Error	30	0.21111	
C.V.%	28.52		

C.V.= Coeficiente de Variación **=Significativo al 95% ns= No Significativo

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza para la germinación por efecto de los tratamientos (Cuadro N° 6) muestra que no existe diferencia significativa para la interacción entre antioxidante y regulador de crecimiento; sin embargo, existe diferencia significativa entre reguladores de crecimiento ($p < 0.05$). El coeficiente de variación (C. V.) fue de 28.52%, esto demuestra que el diseño experimental es óptimo.

Gráfico N° 1. Germinación in vitro de la semilla de orquídea *Oncidium baueri*



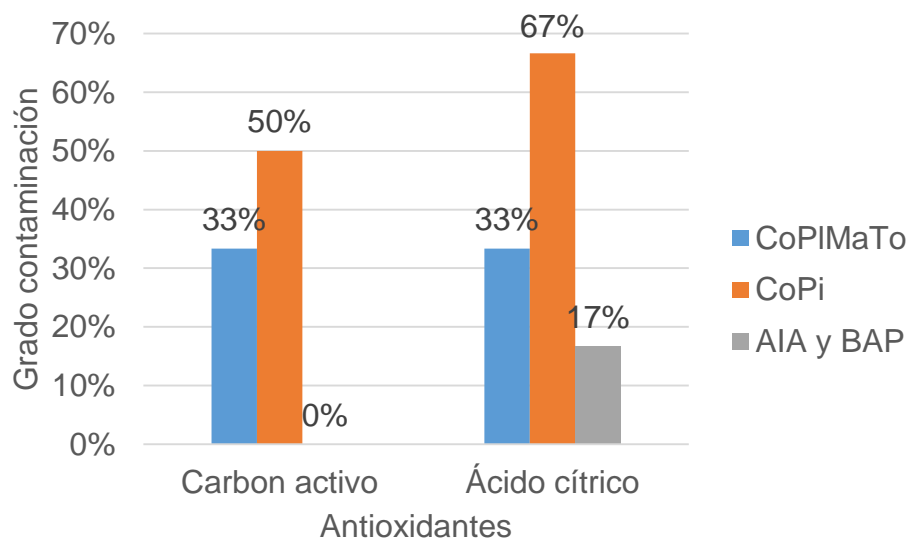
Observamos que los reguladores de crecimiento convencionales (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina: son óptimos porque tuvieron mayor germinación de la orquídea *Oncidium baueri* en la fase de establecimiento estadísticamente superiores con (100% y 83% de germinación); además el T1 y T4 que tienen como reguladores de crecimiento coco, plátano, manzana y tomate, obtuvieron (67% y 50%) respectivamente. A comparación de los T2 y T5 compuestos de coco y piña con un 33% de germinación en ambos casos; siendo los que menos germinaron.

6.2. Contaminación de la orquídea *Oncidium baueri*

El gráfico N° 2 permite observar que la mayor contaminación tuvo lugar en presencia del antioxidante Ácido cítrico y el regulador de crecimiento compuesto por coco y piña (67%), seguido por el antioxidante Carbón activado y el regulador de crecimiento compuesto también por coco y piña (50%), además que, en los dos antioxidantes, con el regulador de crecimiento compuesto por coco, plátano, manzana y tomate se observó una tercera parte de contaminación con (33%) en ambos; mientras que la menor contaminación tuvo

lugar en el antioxidante Carbón activado y el regulador de crecimiento AIA Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina, en que se redujo al (0%), seguido del antioxidante ácido cítrico combinado con el mismo regulador de crecimiento (17%).

Gráfico N°2. Porcentaje de la contaminación



6.3. Oxidación de la orquídea *Oncidium baueri*

Cuadro N° 7. Análisis de varianza para la variable oxidación en la orquídea *Oncidium baueri*

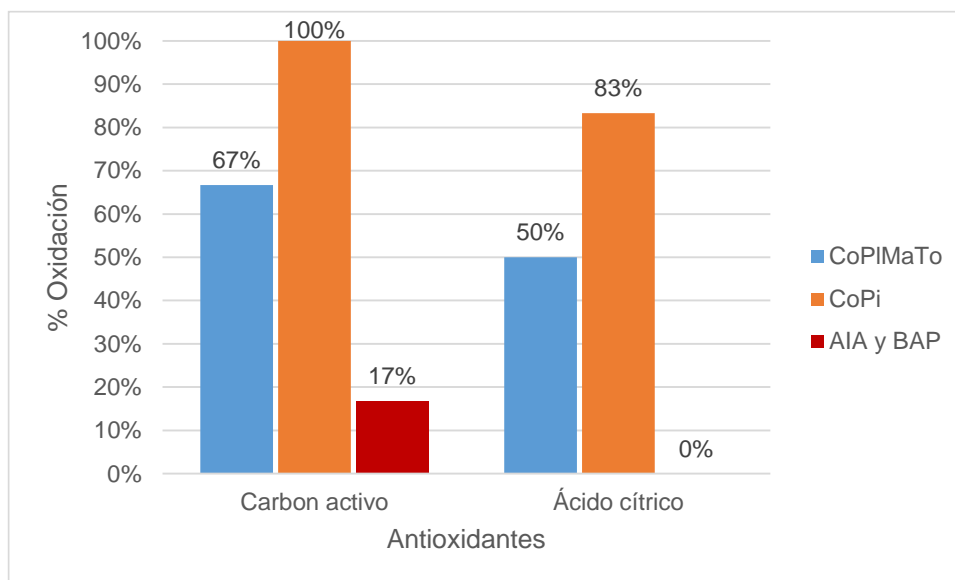
FV	GL	CM	F
Antioxidantes		1	0.25000 1.67 ns
Reguladores		2	2.11111 14.07 **
Interacción		2	0.00000 0.00 **
Error		30	0.15000
C.V.%	25.35		

C.V.= Coeficiente de Variación **=Significativo al 95% ns= No Significativo

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza para la variable de oxidación por efecto de los factores (Cuadro N° 7) muestran que existieron diferencia significativa en el factor 2 ($p < 0.05$) así también entre los seis tratamientos. El coeficiente de variación (C. V.) fue de 25.35 que indica una moderada variación de los datos.

Gráfico N° 3. Oxidación de la orquídea *Oncidium baueri*



Observando el Gráfico N° 3 según el análisis de varianza por factorización destacamos que los reguladores de crecimiento con menos oxidación fue el compuestos (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina con (0% y 17%); sin embargo R1 y R4 formados por coco, plátano, manzana y tomate tuvieron resultados intermedios con (67% y 5%) a comparación del R2 y R5 integrados de coco y piña los cuales oxidaron más con (100% y 83%), en ambos casos respectivamente. Podemos notar que los reguladores de crecimiento inciden en los antioxidantes utilizados no habiendo tanto en el carbón activo como en el ácido cítrico mucha diferencia en oxidación para la orquídea *Oncidium baueri*.

6.4. Estadios de crecimiento de la orquídea *Oncidium baueri*

En el cuadro siguiente, se observa los estadios de crecimiento, en función de los antioxidantes y reguladores de crecimiento.

Cuadro N° 8. Análisis de los tratamientos de Estadios de crecimiento en las últimas nueve semanas.

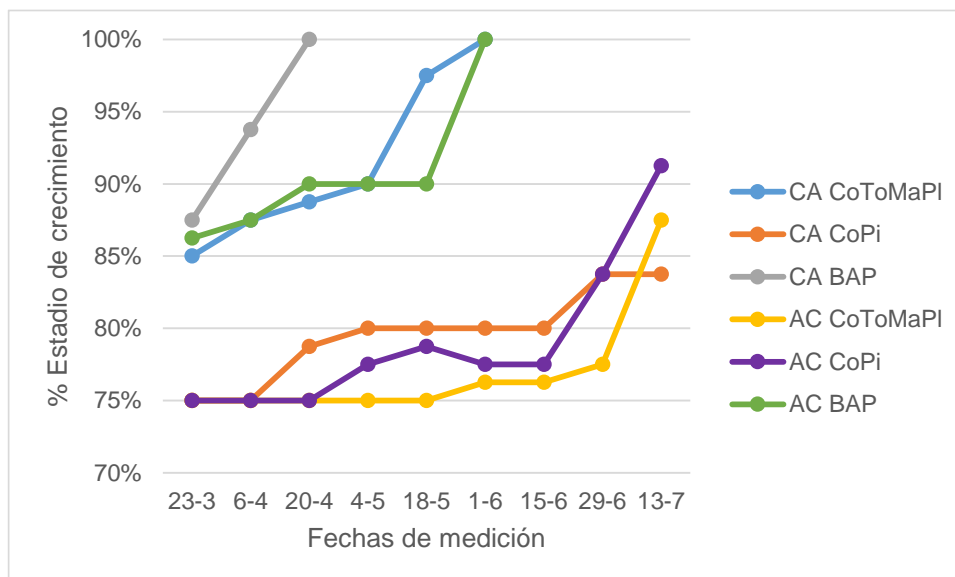
Tratamientos	Fechas de observación								
	23-3	06-4	20-4	04-4	18-5	01-06	15-6	29-6	13-7
CA CoToMaPI	6,8	7,0	7,1	7,2	7,8	8,0			
CA CoPi	6,0	6,0	6,3	6,4	6,4	6,4	6,4	6,7	6,7
CA BAP	7,0	7,5	8,0						
AC CoToMaPI	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,1	6,1	6,2	7,0
AC CoPi	6,0	6,0	6,0	6,2	6,3	6,2	6,2	6,7	7,3
AC BAP	6,9	7,0	7,2	7,2	7,2	8,0			

Fuente: Elaboración propia

Los estadios de crecimiento fueron evaluados en una escala de 1-8, en el que el 8 representa el máximo estado de desarrollo y en los tratamientos que alcanzaron esta fase las plántulas fueron llevadas para la siguiente fase (aclimatación) en cáscara de castaña.

Para representarlo en gráfico los resultados fueron expresados en porcentajes, como se observa a continuación.

Gráfico N°4. Estadio de crecimiento de la orquídea *Oncidium baueri* en los últimos dos meses



En la variable Estadio de crecimiento se observa en el gráfico N°4 que el antioxidante carbón activo y los reguladores de crecimiento (AIA) Acido Indolacético y (BAP) Benzilaminopurina, obtuvo el (100%) de desarrollo; es decir la etapa 8 (plántula apta para la aclimatación) en 6 meses y medio, alcanzando el menor tiempo a comparación de los otros; los tratamientos formados por el antioxidante carbón activo y reguladores de crecimiento coco, plátano, manzana y tomate; y ácido cítrico como antioxidante con reguladores de crecimiento (AIA) Acido Indolacético y (BAP) Benzilaminopurina, también obtuvieron resultados relevantes con (100%) de desarrollo en un tiempo de 7 meses; mientras que los tratamientos compuesto del antioxidante ácido cítrico con reguladores de crecimiento coco y piña obtuvieron (92%), el tratamiento formado por ácido cítrico y reguladores de crecimiento coco, plátano, manzana y tomate con (88%); y el tratamiento contenido de carbón activo y reguladores de crecimiento coco y piña con (83%) no llegaron a alcanzar el 100% en 9 meses, siendo los tres últimos tratamientos con menos desarrollo fenológico además de tardíos.

6.5. Altura de plántula de la orquídea *Oncidium baueri*

Cuadro N° 9. Análisis de varianza para altura de plántula de la orquídea *Oncidium baueri* en cultivo in vitro.

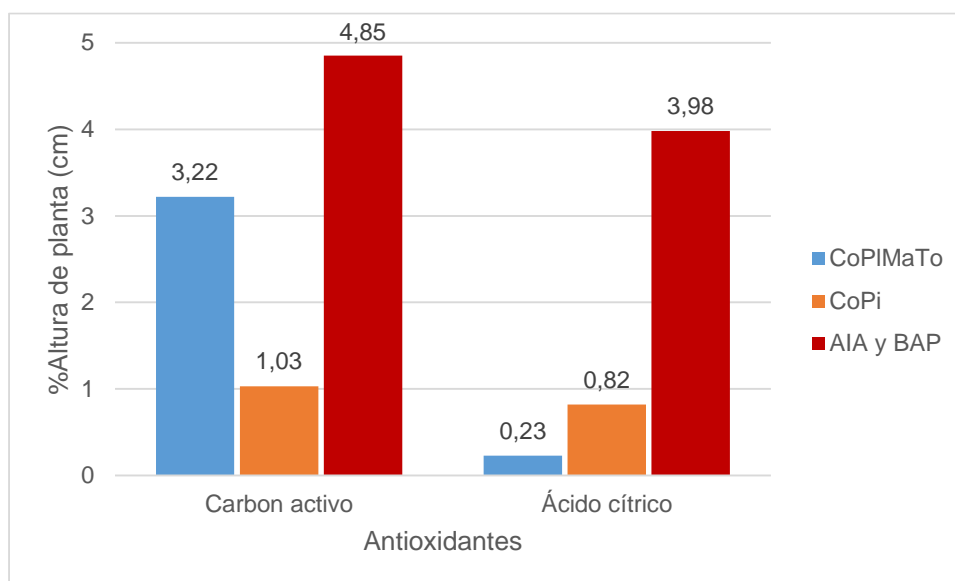
FV	GL	CM	F	
Antioxidantes		1	32.95367	36.30 **
Reguladores		2	80.34214	88.49 **
Interacción		2	12.63058	13.91 **
Error		66	0.90789	
C.V.%	40.49			

C.V.= Coeficiente de Variación **=Significativo al 95% ns= No Significativo

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo al análisis de varianza de la variable altura de plántula, indica en el Cuadro N° 9 que existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre factores y entre tratamientos. El coeficiente de variación (C.V.) fue 40.49%.

Gráfico N° 5. Altura de plántula de la orquídea *Oncidium baueri*.



El Gráfico N° 4 nos muestra que cuando realizamos la interacción de altura de plántula, entre reguladores de crecimiento y el antioxidante carbón activo observamos que el regulador de crecimiento (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina obtuvo mayor crecimiento con (4.85); mientras que el regulador de crecimiento 1 compuesto de coco, plátano, manzana y tomate obtuvo (3.22); y el regulador de crecimiento formado por coco y piña, estadísticamente inferior con (1.03). Al interactuar los reguladores de crecimiento y el antioxidante ácido cítrico, se pudo evidenciar que el regulador de crecimiento coco manzana plátano y coco fue estadísticamente superior (3.98) a diferencia del regulador de crecimiento 1 y 2; que obtuvieron menor altura de plántula con (0.23 y 0.82) respectivamente.

6.6. Número de hojas de la orquídea *Oncidium baueri*

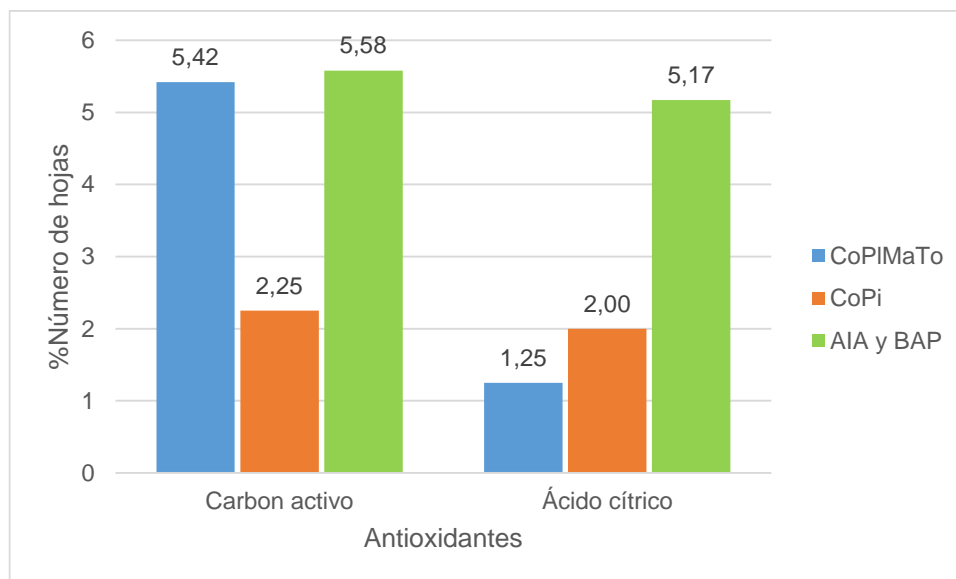
Cuadro N° 10. Análisis de varianza para número de hojas de la orquídea *Oncidium baueri*.

FV	GL	CM	F
Antioxidantes		1	37.55556
Reguladores		2	64.76389
Interacción		2	34.01389
Error		66	3.45455
C.V.%	51.47		

C.V.= Coeficiente de Variación **=Significativo al 95% ns= No Significativo

Observando la Cuadro N° 10 el análisis de varianza de la variable número de hojas, indica que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre factores, como también entre los seis tratamientos; teniendo como coeficiente de variación (C.V.) 51.47%.

Gráfico N° 6. Número de hojas de la orquídea *Oncidium baueri*.



El Grafico N° 6 nos indica que al realizar la interacción de la variable número de hojas con el antioxidante carbón activo, los reguladores de crecimiento: 1 que

constan de coco, plátano, manzana y tomate, y 3 conformado de (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina fueron los que obtuvieron mayor número de hojas con una media de (5.42 y 5.58) respectivamente; obteniendo el regulador de crecimiento 2 coco y piña un valor de (2.25). En el caso de la interacción del antioxidante ácido cítrico se observa que los reguladores de crecimiento 1 y 2 fueron estadísticamente inferiores con (1.25 y 2.25), por otra parte, el regulador de crecimiento 3 presento una media alta de (5.17).

6.7. Número de raíz de la orquídea *Oncidium baueri*

Cuadro N°11. Análisis de varianza para número de raíz de la orquídea *Oncidium baueri*.

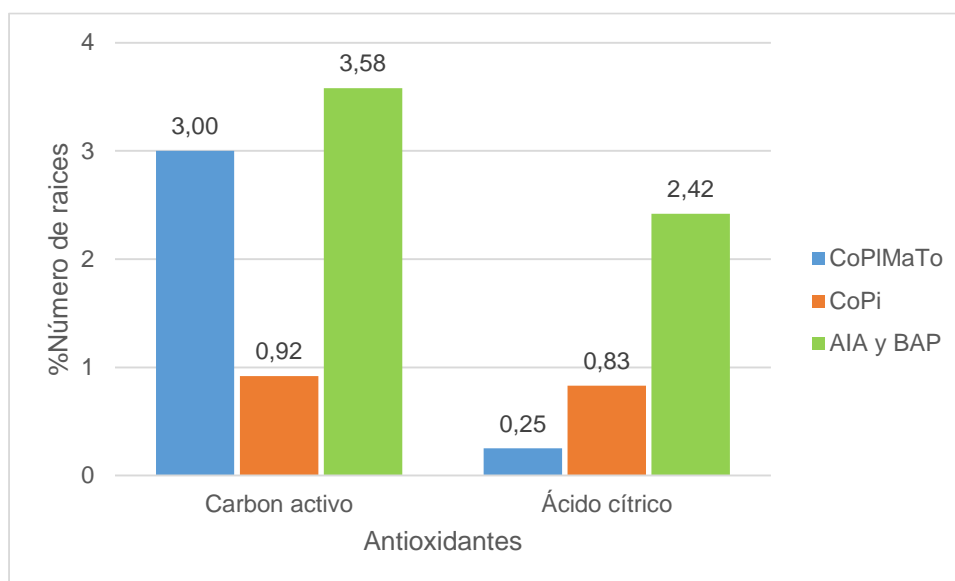
FV	GL	CM	F	
Antioxidantes		1	29.38889	34.22 **
Reguladores		2	27.87500	32.47 **
Interacción		2	12.09722	14.90 **
Error		66	0.85859	
C.V.%	20.54			

C.V.= Coeficiente de Variación **=Significativo al 95% ns= No Significativo

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza de la variable número de raíz (Cuadro N°11) nos indica que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre ambos factores así también entre tratamientos; teniendo como coeficiente de variación 50.54%.

Gráfico N° 7. Número de raíz de la orquídea *Oncidium baueri*



Cuando realizamos la interacción de número de raíz entre el antioxidante carbón activo podemos observar de acuerdo al Gráfico N°7 que los reguladores de crecimiento formados por: (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina y regulador compuesto de coco, platano, manzana y tomate, obtuvieron mayor número de raíces con las medias de (3 y 3.58) respectivamente siendo los valores más altos de los demás; a diferencia del regulador de crecimiento 2 estadísticamente inferior con (0.83). Al realizar la interacción del antioxidante ácido cítrico con el regulador de crecimiento 3 tuvo un valor intermedio de (2.42); mientras que los reguladores de crecimiento 1 y 2 presentaron medias estadísticamente inferiores con (0,25 y 0,83) respectivamente.

7. DISCUSIÓN

7.1. Germinación

Según López y Rangel (2018), afirman que la conservación de las orquídeas y su aprovechamiento sustentable sigue siendo un reto, ya que cada especie requiere de condiciones específicas para su germinación y desarrollo.

Precisamente un ejemplo de esto es que Moreno y Menchaca (2007) reportaron un 90% de germinación a los 30 días de la siembra de *Stanhopea tigrina*, en medio Murashige y Skoog enriquecido con aditamentos orgánicos como el agua de coco y el extracto de banana.

Porcentaje similar a los alcanzados en este trabajo en que se obtuvieron una mayor germinación usando AIA y BAP. En la presente investigación, la mayor germinación se observó en el regulador de crecimiento AIA (Ácido indolacético) y BAP (Bencilaminopurina) con 100% en presencia del antioxidante carbón activado y 83% en presencia del ácido cítrico.

Flores *et al* (2008) aporta que en el estudio de la orquídea *Oncidium stramineum* Lindl la germinación alcanzada fue de 47.69% adicionando 2 g/L de carbón activado, 40 g/L de extractos de manzana, plátano y jitomate los cuales fueron licuados en 100 ml/L de agua de coco en medio MS. En la presente investigación la menor germinación tuvo lugar en el regulador de crecimiento agua de coco y piña, con valores similares 33% tanto en presencia de carbón activado como en ácido cítrico.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con las referencias bibliográficas citadas en relación a la germinación de orquídeas en cultivo *in vitro*.

7.2. Contaminación

En la investigación de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*; se incorporó 1 mg/L de BA como regulador de crecimiento en la fase de establecimiento, realizado por Tiza (2010) observando la presencia de microorganismos a los 45 días después de la siembra, donde se obtuvo una contaminación del 5% debido a la acción de un hongo, obteniendo una asepsia del 95%. En la presente investigación se registró la contaminación más baja en el medio de cultivo que tenía incorporado el regulador de crecimiento AIA y BAP en ambos antioxidantes: carbón activo y ácido cítrico se observó un 0% y 17 % de contaminación, respectivamente.

Por otra parte Vargas (2012), menciona que en *Cattleya violácea*, se presentó un 53% de contaminación con bacterias especialmente en el medio Murashige y Skoog, incorporando agua de coco y plátano por lo que la asepsia debe ser mayor en medios con extractos de frutas. Así mismo en la presente investigación, la contaminación más alta se dio en los reguladores de crecimiento compuestos por agua de coco y piña 57% con carbón activo y 67% con ácido cítrico.

En consecuencia, los resultados de la presente investigación sobre la contaminación en cultivo in vitro de orquídeas concuerdan con la bibliografía citada.

7.3. Oxidación

De acuerdo a Tiza (2010) que utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) 50% en la fase de establecimiento adicionando BA 1 mg/L y carbón activado 2 g/L presentando un mínimo porcentaje de oxidación en el caso de *Dendrobium* y *Phalaenopsis*, en el caso de las orquídeas *Laelia anceps*, y *Sobralia xantholeuca* no hubo oxidación. En la presente investigación se evidencio que la oxidación se determinó por los reguladores de crecimiento; la

menor oxidación se dio en la presencia de ambos antioxidantes: 700 mg/L de ácido cítrico y con una mínima diferencia de oxidación 2 g/L de carbón activo y el regulador de crecimiento conformado por (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina).

Por otra parte en la composición: agua de coco, piña y ambos antioxidantes se registró la mayor oxidación.

Las referencias bibliográficas citadas concuerdan con los resultados de la presente investigación en relación a la oxidación de orquídeas en cultivo in vitro.

7.4. Estadios de crecimiento

Van Waes (1987) citado por George (1993), planteó que la adición de carbón activado (1-2 g/L) puede estimular la germinación y el crecimiento de las orquídeas, fundamentalmente en especies que liberan sustancias fenólicas al medio de cultivo. Así también Pedroza *et al* (2010) aporta que el desarrollo in vitro de la plántula de orquídea *Maxillaria nutans* se desarrolló favorablemente en el medio Murashige y Skoog adicionando carbón activado al 0,5% y (AIA) Acido Indolacetico 0,5 mg/L, en un tiempo de diez meses y medio, favorecieron la inducción y el desarrollo de las raíces de los protocormos. En la presente investigación el tratamiento compuesto por carbón activo, (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina) permitió completar el desarrollo fenológico en tiempo de siete meses, obteniendo plántulas vigorosas, color verde, con el número de hojas, raíces y altura de plántulas más altas a comparación de los otros tratamientos.

Cadavid & Salazar (2008) menciona que los protocormos en MS adicionado con jugo de piña sufrieron secamiento de hojas y raíces; además no hubo presencia de nuevos brotes como estructuras protocórmicas, ni de nuevas hojas. Las raíces que aparecieron fueron delgadas, de color café, de escasa longitud; también se observó pudrición del rizoma lo cual posiblemente se deba a una

acción inhibitoria del jugo de piña para la absorción de los nutrientes del medio de cultivo. En la presente investigación el tratamiento conformado por carbón activo, agua de coco y piña no logro desarrollarse hasta el último estadio, presentando plántulas pequeñas, con hojas amarillentas, por lo que se optó por extraer las plántulas del medio de cultivo para su respectiva evaluación en un tiempo de 9 meses.

En consecuencia, los resultados del presente trabajo concuerdan con la bibliografía citada en relación a los estadios de crecimiento del cultivo in vitro de orquídeas.

7.5. Altura de plántula

Según Francisco (2008); en el estudio de la orquídea *Trichocentrum carthagenense* se obtuvo mayor crecimiento en altura de plántula (2 a 4 cm) adicionando 2 g/L de carbón activo. En la presente investigación al combinar el antioxidante carbón activo y el regulador de crecimiento (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina se obtuvo mayor altura de plántulas con un promedio de 4,85 cm; así también la mezcla de ácido cítrico con (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina) dio un promedio de 3,98 cm

Los resultados de la presente investigación sobre la altura de plántulas de cultivo in vitro de orquídeas concuerdan con la bibliografía citada.

7.6. Número de hojas

De acuerdo a Vargas (2012), la orquídea *Cattleya violacea* presento un promedio de 5,67 hojas/plantas en el medio Murashige y Skoog agregando 2 ml/L de (ANA) Ácido naftalenacético y 3 ml/L de (BAP) Benzilaminopurina sin presencia de antioxidantes, en la fase de multiplicación; siendo el mejor medio para la variable número de hojas. En la presente investigación el mayor número de hojas se dio en el antioxidante carbón activo y los reguladores de

crecimiento (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina con una media de 5,58 hojas/planta.

Por otra parte Sardi y Guzman (2007) mencionan que en la orquídea *Epidendrum secundum* se obtuvo un promedio de 5 hojas/planta en el medio Murashige y Skoog adicionando 150 g/L de plátano verde licuado y 30 ml/L de agua de coco en siete y ocho meses a partir de la siembra; obteniendo el segundo lugar en la variable número de hojas. Así mismo en la presente investigación seguida con mínima diferencia la combinación de carbón activo y el regulador de crecimiento compuesto por agua de coco, manzana, plátano y tomate obtuvo un promedio de 5,42 hojas/planta.

La bibliografía citada se enmarca con los resultados de la investigación sobre el número de hojas en el cultivo in vitro de orquídeas.

7.7. Número de raíces

Pedroza (2009), reporta que el carbón activado con 0,5 y 1,0% estimuló los procesos de desarrollo morfogénico de raíces que potenciaron el efecto del AIA (Ácido Indolacético) con 0,5 mg/L, en la orquídea *Epidendrum elongatum*. En la presente investigación el mayor número de raíces se obtuvo en la combinación de carbón activo con (AIA) Acido Indolacetico y (BAP) Benzilaminopurina, obteniendo un promedio de 3,58 raíces/planta.

En un estudio de la orquídea *Brassia verrucosa* realizada por Flores *et al.* (2011); se obtuvo un promedio de 2,18 raíces/planta, utilizando: 1 g/L de carbón activado y extractos orgánicos obtenidos al licuar 40 g/L de manzana, plátano, jitomate y 100 ml/L de agua de coco; siendo un valor mayor. De acuerdo a la presente investigación; y en la composición de carbón activo, agua de coco, manzana, plátano y tomate se dio una media de 3 raíces/ planta.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con las citas bibliográficas mencionadas en relación al número de raíces de orquídeas en cultivo *in vitro*.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, el análisis y contrastación con la bibliografía, nos permite obtener las siguientes conclusiones:

- El regulador de crecimiento resultante de la mezcla entre Acido Indolacético (AIA) y Benzilaminopurina (BAP) dieron lugar a una mayor germinación de las semillas de la orquídea *Oncidium baueri* con un 100% en presencia del antioxidante carbón activo y 83% en presencia del antioxidante ácido cítrico. Mientras que el regulador de crecimiento compuesto por Coco + Piña resultaron obtener la menor tasa de germinación (33%) en presencia de ambos antioxidantes.
- En el establecimiento de la orquídea *Oncidium baueri*, se observó una menor oxidación en el antioxidante ácido cítrico, al ser combinado con el regulador AIA y BAP no registró oxidación y en combinación con el regulador Coco + Piña la oxidación fue de 83%. Mientras que en el antioxidante Carbón activo se observaron oxidaciones desde 17% con AIA y BAP hasta 100%, esta última en combinación con el regulador compuesto por Coco + Piña.
- El mejor desarrollo de la orquídea *Oncidium baueri* en cultivo *in vitro* se observó en la presencia del antioxidante Carbón activo y el regulador compuesto por AIA y BAP que alcanzó el estadio de crecimiento óptimo para su aclimatación en 90 días antes de los que demoraron más para alcanzar esta condición, estos tratamientos también dieron lugar a una mayor altura de planta, número de hojas y raíces por planta.
- Se acepta la hipótesis de investigación, toda vez que los antioxidantes y reguladores de crecimiento influyeron significativamente en el desarrollo para la propagación *in vitro* de la orquídea *Oncidium baueri*.

9. RECOMENDACIÓN

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, es posible efectuar las siguientes recomendaciones:

- Para la germinación de las semillas de la orquídea *Oncidium baueri*, usar como regulador de crecimiento el compuesto por Acido Indolacetico (AIA) y Benzilaminopurina (BAP) en combinación con el antioxidante carbón activo.
- Para evitar la oxidación del material vegetal de la orquídea *Oncidium baueri*, usar ácido cítrico como antioxidante en presencia del regulador de crecimiento AIA y BAP.
- Para lograr un mejor crecimiento y desarrollo del material vegetal *in vitro* de la orquídea *Oncidium baueri* se recomienda el uso del regulador AIA y BAP
- Finalmente, se recomienda efectuar nuevos estudios con el regulador de crecimiento resultante de la combinación de Coco+plátano+tomate+manzana, por haber obtenido el segundo mejor resultados favorable en la presente investigación; además de tener bajos costos comparados con AIA y BAP.

10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Ammirato, P.V., Evans, D.R. Sharp, W.R. y Baja, Y.P.S. ; 1990. Hybook of plant cell culture. Vol. 5 Ornamental Species. McGraw Hill.

Barbery R.y Morales I.; 2011. Manual para el cultivo in vitro de la orquídea "*Cattleya nobilior*". Santa Cruz – Bolivia.

Arditti J., Ernst R., 1993. Micropropagation of orchids. New York. John Wiley and Sons. Pg. 87 – 607.

Blasco G., Gómez F.; 2014. Propiedades funcionales del plátano (*Musa sp*) Functional properties of banana (*Musa sp*). Veracruz – México.

Cadavid - Salazar; 2008. Micropropagación de *Cattleya quadricolor*. Medellin – Colombia. Pg. 38 - 39.

Campos, D. M.; 1998. Orquídeas: Manual Práctico de cultura. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 143 p.

Condemarin *et al* 2007, cita a Salisbury & Ross 2000, Ascón Bieto & Talon 2001, Martínez; 2002. Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo in vitro de yemas axilares de *Encyclia microtos* (rchb.f.) hoehne (orchidaceae). Cartago, Costa Rica.

Chen W., Chen H. 2007. Orchid Biotechnology. World Scientific, Editorial: World Scientific. Pub Co Inc.

Darías, R. 1993. Recopilación de Temas sobre Técnicas de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Oruro, Bolivia U.T.O. y Universidad Cienfuegos de Matanzas. Cuba. s.e. p. 169.

Díaz L. P., Namur J .y Bollati S.A; 2007. Efecto del ácido cítrico y del carbón activado en la regeneración de plantas de orquídeas (*Laelia lundii*) por cultivo in vitro de semillas. Argentina.

Ferreiro M.; 2018. Propiedades y Beneficios del Tomate: Usos y Recetas.

Flores G., Legaria J., Gil I. y Colinas M.; 2008. Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. México.

Flores G., Gil I., Colinas M., Mata M., 2011. Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* BATEMAN EX. LINDL Veracruz – México.

Flores M.; 2014. Texto Guía del Participante Producción de Manzana. Sucre – Bolivia.

Francisco J.; 2008. Propagación in vitro y establecimiento en invernadero de las orquídeas *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw y *Laelia eyermaniana* Rchb. F., para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. Morelos – México; pg. 43.

Frid D.; 2009. Reproducción de plantas in vitro y sus beneficios para la agricultura.

Hágsater, E.; Soto A.; Salazar, Ch.; Jiménez, M.; López R. y Dressler, R. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.

Kitsaki C., Zygouraki S., Ziobora M., Chintzist S. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 23: 284-290.

Lara A.; 2001. Análisis de costos de producción in vitro y mercado de orquídeas en Zamorano. Honduras.

Lopez y Rangel; 2018. Propagación in vitro de *Galeandra greenwoodiana* y *Stanhopea hernandezii*. México.

Lorenzi, H.; Souza, H. M.; 2001. Plantas ornamentais no Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1088 p.

Mckendrick S.; 2000. Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ecuador.

Menchaca G. R.; 2011. Manual para la propagación de orquídeas; México.

Miller, D.; Warren, R.; 1996. Orquídeas do alto da Serra. Rio de Janeiro: Salamandra. Brasil.

Morales G., Vanegas L.; Ortega D.; Cano J.; Ramírez L.; 2009. Propagación in vitro de Orquídeas. Bogotá -Colombia

Moreira A.; 2009. Darwin alrededor de las orquídeas. Chile.

Moreno S. L.; 2005. Diversidad y Endemismo en Orquídeas. Convergencia de los sistemas vegetacionales hacia los Yungas de Bolivia. Bolivia.

Moreno D; Menchaca R. 2007. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de *Stanhopea Tigrina* Bateman (Orchidaceae) Foresta Veracruzana, vol. 9, núm. 2, 2007, pp. 27- 32 Recursos Genéticos Forestales Xalapa, México.

Mosqueda A., Cázares J., de la Cruz E., Hernández A.; 2010. Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco, México, p9 y p11.

Nagaraju, V.; Mani, S. K. 2005. Rapid in vitro propagation of Orchid *Zygopetalum intermedium*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 14: 27-32.

Neyoy; 2012. Definiciones de regulador de crecimiento vegetal (fitohormonas u hormonas vegetales).

Orozco R.; 1996. Las orquídeas. México.

Parra E. J.; 2013. Orquídeas y bromelias ¿plantas epifitas o parasitas? Yucatán- México.

Pedroza J. 2009. Efecto de carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. Colombia.

Pedroza, J., Micán, Y. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. (Orchidaceae) under in vitro conditions. Colombia.

Pedroza, J; Serrato, L.; Castaño, M.; 2010. Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. in vitro. Bogotá - Colombia. Pg.8.

Peñafiel V.; 2012. Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de *Cattleya violácea*; Ecuador. Pg. 5.

Pérez *et al* 2016 cita a Minea *et al.*, 2004; Moreno *et al* 2007; Flores *et al.*, 2008; Salazar *et al*, 2012. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. Bogotá - Colombia.

Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Trad. por Luis Syerbe 3 ed. Ediciones Mundi Prensa, España. Pg. 326.

Quiroga D., Martínez M. & Larrea D.; 2010. Sistemas de polinización de cinco especies de orquídeas creciendo bajo condiciones de invernadero. La Paz – Bolivia.

Roca L., Mroginski; 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura CIAT Centro de Investigación de Agricultura Tropical. Cali – Colombia. 1ra Edición. Pg. 696.

Rodríguez L., Valles J., González R., Alvarado K., Telles E., Díaz A. y Sánchez E. cita a George (1993); 2001. Germinación asimbiótica in vitro de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. Guantánamo. Cuba.

Ruiz, C., Laguna A., Iglesias L., Damon A., Marín N., Azpiroz H., Moreno J.; 2008. Germinación in vitro de semillas de *Encyclia adenocaula*. México.

Salazar, J.; Benavides, L.; Trespacios L. Pinzón. 2010. Informe sobre el Estado de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente, Componente de Biodiversidad Continental - 2009. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C., Colombia. 167

Salazar S. y Cancino G.; 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia

Salazar S., Amaya A., Barrientos F.; 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). Colombia.

Saldaña T., Juárez J., Villar C. 2014. Las plantas epífitas, su diversidad e importancia.

Santos, G.; Ordoñez, C.; y Morales, L. 2010. Colección viva de especies amenazadas. Contribución del jardín botánico José Celestino Mutis. (on-line).

Bogotá, Colombia: Jardín Botánico José Celestino Mutis. ISBN 978-958-8576-04-6.

Sardi L., Guzmán S.; 2007. Análisis de la variación de la tasa de germinación y crecimiento de las orquídeas *Epidendrum secundum* y *Oncidium excavatum* a través de los medios de cultivo convencionales combinados con los naturales. Cuenca – Ecuador. Pg. 50.

Segretín M., 2006. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Argentina

Sequeira, R. 1980. Algunos datos históricos sobre las orquídeas. En: Orquídeas: su cultivo. Ed. por la Asociación Peruana de Orquideología. Impresora Delta, S.A. Pg. 3-7.

Simpson, M. (2005). «Orchidaceae». Plant Systematics. Elsevier Inc. pp. 171-177.

Tiza G. 2010; Propagación in vitro de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*. Veracruz - México. Pg.8

Thorpe, T. A. y Yeung, E. C. 2011. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 710, DOI 10.1007/978-1-61737-988-8_20, © Springer Science+Business Media, LLC.

Ugarte C., Villaroel C., Aguirre G. & State M. 2010; Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos filogenéticos. Bolivia. Cap. 5. Pg. 67.

Vargas D.; 2012. Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de *Cattleya violácea*. Guayaquil – Ecuador. Pg. 32, 56, 61 y 64.

Vásquez R.; 1995. Las Orquídeas en Bolivia; Bolivia.

Vásquez, R. & Ibisch, P. 2004. Orquídeas de Bolivia, Diversidad y Estado de Conservación. Volumen II. Segunda edición. Editorial FAN. Santa Cruz, Bolivia.

10.1. Consulta en internet

- <https://www.eldeber.com.bo/santacruz/El-municipio-de-Concepcion-invita-al-Festival-de-la-Orquidea-20181003-9224.html>
- <https://boliviaemprende.com/noticias/deslumbrantes-orquideas-se-hallan-en-santa-cruz>
- http://m.lostiempos.com/vida-y-futuro/medio-ambiente/medio-ambiente/20141021/orquideas-que-encantan_278338_612479.html
- <http://solo-orquideas.blogspot.com.br/2010/12/biologia-de-la-germinacion-de-semillas.html>
- <http://www.infoagro.com/flores/flores/orquideas.htm>
- <https://es.wikipedia.org/wiki/Orchidaceae>
- <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Endemismo>
- http://www.canna.es/reguladores_del_crecimiento_vegetal
- <http://ijardineros.com/orquideas/biologia-de-la-germinacion-de-semillas-de-orquideas-el-protocormo>
- <http://solo-orquideas.blogspot.com/2010/08/propagacion-y-transplante-de-orquideas.html>
- <http://www.ecured.cu/index.php/Orchidaceae>