

UNIVERSIDAD AMAZÓNICA DE PANDO
ÁREA: CIENCIAS BIOLÓGICAS Y NATURALES
CARRERA: INGENIERIA AGROFORESTAL



**ACLIMATACION *IN VITRO-EX VITRO* DE ORQUIDEAS (*Orchidaceae*)
CON DISTINTOS NIVELES DE SACAROSA Y DIFERENTES TIPOS DE
SUSTRATOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL
ACBN-UAP.**

Tesis de grado para optar al grado Académico de Ingeniero Agroforestal

Presentado por: Univ. Jessica Viviana Oblitas Sito

Asesores: Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo
 Dr. Sc. Juan Carlos Gómez Gonzales

COBIJA – PANDO – BOLIVIA
2021

HOJA DE APROBACIÓN

La presente tesis fue revisada y aprobada por:

CARGO	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMAS
Presidente	Lic. Nancy Acuña Álvarez	_____
Tribunal 1	Ing. Dunia Calderón Vaca	_____
Tribunal 2	Ing. Armando Alcázar	_____
Tribunal 3	Ing. David Gómez Roca	_____
Asesor	Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo	_____
Asesor	Dr. Sc. Juan Carlos Gómez Gonzales	_____

Cobija, Noviembre de 2021

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis de grado a Dios, a mi padre, a mis hermanos y sobrinos. A Dios por que ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome, protegiéndome y dándome fortaleza para continuar, a mi padre, quien a lo largo de mi vida ha velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo incondicional en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. A mis hermanos y sobrinos por su constante apoyo y cariño. Es por ellos que soy lo que soy ahora.

A todos Uds. con amor.

Jessica V. Oblitas S.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque sin él nada de esto hubiera sido posible.

A mi padre amado, Reynaldo Oblitas Luque quien a lo largo de toda mi vida me apoyo y motivó en mi formación personal y académica, su amor infinito, tenacidad y lucha interminable ha hecho de él un gran ejemplo a seguir por mí y por mis hermanos y sin él jamás hubiera podido conseguir lo que hasta ahora logre.

A mis queridos hermanos Sandra, Bladimir y Rocío por su apoyo incondicional, constante cariño y palabras de aliento que me brindaron día a día para no rendirme, y a mis amados sobrinos Cielito Jhoan, Sayal Valentina, Kenia Dayanara, Daira Mishel, Kidian Alexsa y Mateito por el amor incondicional que me brindan.

A María Ángela, Pamela y a todos mis amig@s y compañer@s de la Universidad, quienes han compartido conmigo todos los sacrificios de esta vida universitaria.

A mis queridos asesores Ing. Gabriela Ancasi Espejo y Dr. S.c. Juan Carlos Gómez Gonzales por su paciencia, tolerancia y sobre todo por haber hecho posible que este proyecto de tesis sea exitoso, y también un agradecimiento especial al Lic. Israel Muñoz por su apoyo durante el proceso de ejecución del proyecto.

A mis estimados docentes de la carrera de Ingeniería Agroforestal que marcaron con sus enseñanzas el futuro de todos nosotros en especial el mío durante todo este tiempo de mi vida Universitaria que aportaron en mi formación académica con sus enseñanzas para lograr ser una excelente profesional en el futuro.

Un agradecimiento eterno a la casa superior de estudios UNIVERSIDAD AMAZÓNICA DE PANDO.

INDICE DE CONTENIDO

HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Identificación y planteamiento del problema.	3
1.2 Justificación.	4
1.3 Objetivos.	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos.	5
1.4 Hipótesis	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	6
2.1 Diversidad y Distribución	6
2.2 Ecología	7
2.3 Clasificación taxonómica.	8
2.4 Descripción morfológica de las orquídeas	8
2.5 Factores imprescindibles para el desarrollo de las orquídeas	9
2.6 Cultivo <i>in vitro</i>.	9
2.7 Dentro del proceso de micro propagación diferenciamos varias fases o etapas.	10
2.7.1 Fase 0: Selección y Preparación de la planta madre	10
2.7.2 fase 1: Desinfección del material vegetal	10
2.7.3 Fase 2: Introducción del material <i>in vitro</i>	11
2.7.4 Fase 3: Multiplicación de los brotes	11
2.7.5 Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantos	11
2.7.6 Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados	12
2.8 Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas.	12
2.9 Medio Murashige & Skoog	13
2.10 Sacarosa en el desarrollo vegetal	13

2.11 Características de las plantas <i>in vitro</i>	14
2.12 Aclimatación de Vitroplantas o explantes	15
2.13 Tipos de sustratos para las orquídeas (<i>Orchidaceae</i>).	16
2.13.1 Fibra de coco.	17
2.13.2 Cáscara de castaña.	17
2.13.3 Aserrín	17
2.13.4 Tierra vegetal.	19
2.13.5 Tierra negra.	19
2.14 Invernadero o vivero	20
3. MATERIALES Y METODOS	20
3.1 Ubicación del área de estudio	20
3.2 Materiales	21
3.2.1 Material vegetal	21
3.2.2 Materiales de trabajo	22
3.3 Metodología.	24
3.3.1 Fase de enraizamiento <i>in vitro</i> (Experimento 1)	24
3.4 Diseño experimental (Experimento 1)	26
3.5 Variables de respuesta para la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> (Experimento 1)	27
3.5.1 Contenido relativo de agua.	28
3.5.2 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos.	28
3.5.3 Características morfológicas de crecimiento	29
3.5.4 Presencia de estomas (cantidad)	30
3.6 Fase de aclimatación <i>ex vitro</i> de orquídeas (<i>Orchidaceae</i>) (Experimento 2)	30
3.7 Diseño experimental 2	31
3.8 Variables de respuesta. (Aclimatación <i>ex vitro</i>)	32
3.8.1 Características de crecimiento	32
3.8.2 Contenido relativo de agua (CRA).	33
3.8.3 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos	34
3.8.4 Presencia de estomas (Cantidad total, Abiertos y Cerrados)	35
3.9 Modelo Estadístico	35
3.10 Análisis Estadístico.	36
4.1 Análisis de varianza. Experimento 1- (Fase de Enraizamiento <i>in vitro</i>).	37
4.2 Análisis de varianza. Experimento 2- (Fase de Aclimatación <i>ex vitro</i>).	45

5. DISCUSION.	61
6. CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75
ANEXOS	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	25
<i>Soluciones skoog o soluciones madre.</i>	25
Tabla 2	27
<i>Diseño experimental 1.</i>	27
Tabla 3	32
<i>Diseño experimental 2.</i>	32
Tabla 4	37
<i>Análisis de varianza de las características morfológicas de explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase de enraizamiento in vitro en función de sistemas de tapas y niveles de sacarosa.</i>	37
Tabla 5	41
<i>Análisis de varianza para la variable Número de estomas en los explantes en fase de enraizamiento de orquídeas in vitro (Orchidaceae) en función de sistemas tapas y niveles de sacarosa.</i>	41
Tabla 6	41
<i>Análisis de varianza del contenido de agua en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase de enraizamiento in vitro en función de sistemas tapas y niveles de sacarosa.</i>	41
Tabla 7	43
<i>Análisis de varianza para los pigmentos fotosintéticos de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase de enraizamiento in vitro, en función de sistemas de tapas y niveles de sacarosa.</i>	43
Tabla 8	44
<i>Variable de Pigmentación fotosintética (Clorofila b y Carotenoides) en la fase de enraizamiento in vitro.</i>	44
Tabla 9	46
<i>Análisis de varianza para las características morfológicas de explantes de orquídeas (Orchidaceae) provenientes de la fase de enraizamiento con diferentes niveles de sacarosa en función de tipos de sustratos.</i>	46
Tabla 10	52
<i>Análisis de varianza para la variable presencia de estomas en los explantes de orquídeas (orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro en función de tipos de sustratos.</i>	52
Tabla 11	56
<i>Análisis de varianza para la variable del contenido de agua en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro en función de tipos de sustratos.</i>	56
Tabla 12	59
<i>Análisis de varianza para la pigmentación fotosintética de Clorofila en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro en función de tipos de sustratos.</i>	59
Tabla 13	60
<i>Variables de repuesta para pigmentos fotosintéticos en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro.</i>	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	21
<i>Croquis de ubicación del laboratorio de Biotecnología Vegetal.</i>	21
Figura 2	21
<i>Material Vegetal, explantes de orquidea (orchidaceae).</i>	21
Figura 3	26
<i>Preparacion de medio de cultivo.</i>	26
Figura 4	27
<i>Tasa de perdida de vapor de agua a. muestra con tapa barbijo; b Muestra con tapa parafilm.</i>	27
Figura 5	28
<i>Proceso de toma de muestras para determinar la cantidad de agua en los explantes de orquidea (Orchidaceae) en la fase de enraizamiento in vitro.</i>	28
Figura 6	29
<i>Proceso para toma de muestras para la lectura de los extractos de pigmentos fotosintéticos en el espectrofotómetro.</i>	29
Figura 7	29
<i>Muestra de explantes para caracterizacion morfologica en fase de enraizameinto in vitro. a. Explante para conteo de hojas predeterminadas; b. Explante para determinacion de longitud.</i>	29
Figura 8	30
<i>Procedimiento para toma de muestras para observar la presencia de estomas en la de enraizamiento in vitro. a. Activadores; b. Explante, c. Muestra tomada.</i>	30
Figura 9	31
<i>Sustratos para la aclimatacion ex vitro de explantes de orquideas. a Tierra negra comun; b Tierra vegetal; c Aserrin; d Cascara de castaña; e Fibra de coco.</i>	31
Figura 10	33
<i>Muestra de ejemplares de explantes de orquídeas (Orchidaceae) para su caracterización morfológica en fase de aclimatación. a Longitud de planta; b Numero de hojas; c Longitud de la raíz; d Volumen de la raíz.</i>	33
Figura 11	34
<i>Proceso para determinar el contenido relativo de agua en el explante en fase de aclimatación. a Masa fresca; b Masa de turgencia; c Masa seca.</i>	34
Figura 12	34
<i>Proceso de toma de muestras para observar la pigmentación fotosintética de la clorofila, a Muestras de explantes insertadas en 5 ml de acetona; b. absorbencia del extracto; c. Lectura de longitudes de onda en el espectrofotómetro.</i>	34
Figura 13	35
<i>Procedimiento para observar presencia de estomas en los explantes.</i>	35
Figura 14	38
<i>Variable Longitud del explante fase de enraizamiento in vitro.</i>	38
Figura 15	39
<i>Variable Numero de hojas en la fase de enraizamiento in vitro.</i>	39
Figura 16	39
<i>Variable Tasa de mortalidad en fase de enraizamiento in vitro.</i>	39
Figura 17	40
<i>Variable Tasa de mortalidad en fase de enraizamiento con niveles de sacarosa.</i>	40
Figura 18	45
<i>Variable perdida de vapor de agua en la fase de enraizamiento.</i>	45
Figura 19	47
<i>Variable de Longitud de planta en la fase de aclimatación ex vitro.</i>	47
Figura 20	48
<i>Variable de Longitud de raíz de explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro.</i>	48

Figura 21	49
<i>Variable Volumen de raíz de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase aclimatación ex vitro.</i>	49
Figura 22	50
<i>Variable independiente de Numero de hoja en fase de aclimatación ex vitro en función de tipos de sustrato.</i>	50
Figura 23	51
<i>Variable Número de hoja de los explantes provenientes de la fase de enraizamiento en función de nivel de sacarosa en la fase de aclimatación.</i>	51
Figura 24	53
<i>Variable de Estomas abiertos en los explantes de orquídea (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro.</i>	53
Figura 25	54
<i>Variable de estomas cerrados en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación.</i>	54
Figura 26	55
<i>Variable de Número total de estomas en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación</i>	55
Figura 27	57
<i>Variable del Contenido de agua en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro en función del tipo de sustratos</i>	57
Figura 28	58
<i>Variable de Contenido de agua en los explantes de orquídea en la fase de aclimatación ex vitro, en función del nivel de sacarosa.</i>	58
Figura 29	83
<i>Ejemplares de la primera fase del experimento de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) in vitro después de ser evaluados con diferentes niveles de sacarosa y tapa Parafilm</i>	83
Figura 30	83
<i>Ejemplares de la primera fase del experimento de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) In Vitro después de ser evaluados con diferentes niveles de sacarosa en combinación de tapa Barbijo.</i>	83
Figura 31	83
<i>Muestra de resultados de las estomas en la fase in vitro, con sistema de tapa Parafilm en combinación de diferentes niveles de sacarosa.</i>	83
Figura 32	84
<i>Muestra de resultados de las estomas en la fase in vitro, con sistema de tapa barbijo en combinación de diferentes niveles de sacarosa.</i>	84
Figura 33	84
<i>Resultados de la primera fase del experimento de pigmentación fotosintética de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) In Vitro con sistema tapa Barbijo en combinación de diferentes niveles de sacarosa.</i>	84
Figura 34	84
<i>Resultados de la primera fase del experimento de pigmentación fotosintética de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) In Vitro con sistema tapa Parafilm en combinación de diferentes niveles de sacarosa</i>	84
Figura 35	85
<i>Ejemplares de la segunda fase del experimento de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) Aclimatación Ex Vitro después de ser evaluados con diferentes tipos de sustratos.</i>	85
Figura 36	85
<i>Muestra de resultados de las estomas en la fase ex vitro con diferentes tipos de sustratos, vistos desde un microscopio.</i>	85
Figura 37	86
<i>Resultados de la segunda fase el experimento de pigmentación fotosintética de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) ex vitro con diferentes tipos de sustratos.</i>	86

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar los protocolos para la fase de enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de explantes provenientes de la fase de micropropagación *in vitro* de orquídea (*Orchidaceae*), el experimento se dividió en dos fases: 1 - fase de enraizamiento *in vitro* y 2 - fase de aclimatación *ex vitro*. El primer experimento fue bi-factorial que consto en diferentes niveles de sacarosa (20, 30-Testigo, 40 y 60 grL⁻¹) en combinación de sistema de tapas (Tapa Barbijo y tapa parafilm) donde se evaluó características de crecimiento, contenido de agua, pigmentación fotosintética, presencia de estomas y pérdida de vapor de agua. En la segunda fase del experimento, aclimatación *ex vitro* se evaluó diferentes tipos de sustratos orgánicos (Cascara de castaña, fibra de coco, aserrín, tierra vegetal y como testigo tierra negra). Las altas concentraciones de sacarosa provenientes de la fase de enraizamiento en combinación de tipos de sustratos, cascara de castaña y fibra de coco promueven mayor desarrollo de crecimiento y para las características fisiológicas el sistema de tapa barbijo promueve mejor pigmento fotosintético, movimiento estomático y mayor intercambio gaseoso.

Palabra clave: *Aclimatación, Cultivo in vitro, Cultivo ex vitro, Sacarosa*

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the protocols for the *in vitro* rooting phase and *ex vitro* acclimatization of explants from the orchid (Orchidaceae) *in vitro* micropropagation phase, the experiment was divided into two phases: 1 - in rooting phase *in vitro* and 2 - *ex vitro* acclimatization phase.

The first experiment was bi-factorial that consisted of different levels of sucrose (20, 30-Control, 40 and 60 gr L⁻¹) in combination of a lid system (Chinstrap lid and parafilm lid) where growth characteristics, content of water, photosynthetic pigmentation, presence of stomata and loss of water vapor. In the second phase of the experiment, *ex vitro* acclimatization, different types of organic substrates were evaluated (brazilian nutshell, coconut fiber, sawdust, topsoil and blacksoil as a control). The high concentrations of sucrose from the rooting phase in combination of types of substrates, brazilian nutshell and coconut fiber promote greater growth development and for the physiological characteristics the chinstrap cap system promotes better photosynthetic pigment, stomatal movement and greater gaseous exchange.

Keyword: *Acclimatization, In vitro culture, Ex vitro culture, Sucrose*

1. INTRODUCCIÓN

La familia de las orquídeas es considerada como una de las más abundantes en todo el reino vegetal, siendo poseedora de un gran potencial ornamental, expresado en una gran diversidad de formas y colores de sus flores, cuya belleza hace que este grupo adquiriera una gran importancia a nivel mundial (Vasquez et al., 2004).

Las orquídeas constituyen una de las familias más numerosas, fueron descubiertas aproximadamente 25.000 especies, pero aún hay regiones sin relevar Fitogeográficamente varias de ellas en el continente americano. Su diversidad se ve ampliada dado que, por ser un grupo muy joven en la evolución de las plantas, presenta gran facilidad para dar híbridos exitosos no solamente entre especies del mismo género si no también intergenéricos, se estima que hay aproximadamente 30.000 híbridos registrados (Freuler, 2006).

Según, Repositorio Institucional Universitaria, (2018) se confirmó que Holanda y Tailandia son los países que generan mayor exportación de orquídeas en el mundo, siendo la tecnología y la innovación su mayor atributo. No obstante, para Colombia y Ecuador la mayor ventaja es la diversidad que se posee no solo en orquídeas sino en las condiciones climáticas, tierra, y ubicación favorable para la producción de flores en general.

Estas flores son un grupo de plantas bastante diverso respecto a la gran cantidad de formas y colores que poseen, Colombia forma parte de los países de Suramérica con mayor riqueza y con más especies de orquídeas, con 4.270 especies registradas, de las cuales 1.572 son especies exclusivas del país (Nat. Geo., 2019).

Según Vasquez, (2004) De acuerdo a lista de especies identificados en Bolivia, se han registrado 1.500 especies de orquídeas, estas están debidamente descritas e identificadas. Por lo tanto, las orquídeas ya están superando, en la riqueza de especies a alguno de los grupos más diversos.

En el análisis de la información sobre ésta especie podemos afirmar sin lugar a dudas que existe muy poca información y conocimiento científico de las orquídeas que se encuentran contenidas en los bosques y lugares antropizados del ecosistema amazónico de Pando, sumados al deterioro de los recursos naturales por falta de alternativas de desarrollo de los pobladores y el cambio climático, actualmente la Amazonía Pandina está siendo deforestada a paso gigantesco, se viene realizando diferentes actividades; como la deforestación indiscriminada, extracción de madera, asentamientos de áreas verdes, preparación de terrenos para el desarrollo de sus cultivos y crianzas de animales, bajo el sistema de agricultura migratoria, con el fin de poder satisfacer parte de sus necesidades. Como consecuencia de este proceso se vienen destruyendo plantas forestales que serían sus hábitats de especies ornamentales de importancia ecológica y económica como las orquídeas, las cuales son extraídas de sus áreas naturales.

Por otro lado, las orquídeas presentan problemas serios para su propagación en forma natural debido a que la mayor parte de las semillas están escasamente diferenciadas por lo que no se les distinguen los cotiledones ni las radículas y carecen de endospermo (Pierik, 1990).

La Biotecnología Vegetal es una serie de técnicas y procesos que permiten el cultivo y modificación en el laboratorio de las plantas y de partes de ellas (Células, Tejidos u órganos). Esto con el fin de multiplicarlas masivamente, hacerlas mejores, más productivas u obtener productos útiles a partir de ellas. Las dos ramas más importantes dentro de la Biotecnología Vegetal son el cultivo de tejidos vegetales y la ingeniería Genética de plantas. La Biotecnología

Vegetal es una de las herramientas más valiosas que se tienen actualmente para el mejoramiento y conservación de las plantas que sostienen la vida humana (Perez & Castañeda, 2016).

Es así como las técnicas *in vitro* se presentan como una estrategia para la conservación *ex situ* de orquídeas debido a que facilita la germinación de todas las semillas de las cápsulas de las orquídeas que se encuentren bien maduras, permite la producción de un gran número de plantas en un corto periodo de tiempo y se logra reducir en un 85% aproximadamente el tiempo de germinación (Perez & Castañeda, 2016).

La aclimatación de plantas cultivadas “*In Vitro*” es la última fase del proceso de micropropagación y es considerada una etapa crítica donde se determina la sobrevivencia y establecimiento de plántulas. Es una etapa crítica ya que implica cambios drásticos en la condición de cultivo para las plantas, la cual puede provocar estrés y muerte. Gran parte de la bibliografía sobre aclimatación de orquídeas está basada en la utilización de distintos tipos y mezclas de sustratos inertes, condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. El proceso debe hacerse en forma gradual y tarda alrededor de dos a tres meses para que las plantitas puedan mantenerse en condiciones de invernáculo. (Lallana & Barsanti, 2019). La aclimatación de las plántulas *in vitro*, es una de las etapas importantes en el proceso de propagación *in vitro*.

Se busca la adaptación de las plántulas propagadas en laboratorio (*in vitro*) a condiciones de cultivo en vivero o su crecimiento en hábitat natural, buscando un mayor porcentaje de supervivencia (mortalidad mínima) y rápido crecimiento.

1.1 Identificación y planteamiento del problema.

La familia *Orchidaceae* es una de las especies de flora más diversas, pero también una de las más vulnerables, principalmente por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha

estado sujeta, las orquídeas son plantas ornamentales que generan un alto valor ecológico y económico, son plantas epífitas, de crecimiento simpodial que se desarrollan en los bosques tropicales, tienen una flor que cautiva con su belleza, forma, color y textura y se la considera como especie amenazada y en peligro de extinción a causa del deterioro ambiental. Por tal motivo es urgente su conservación, siendo las semillas el material de propagación más adecuado cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar la germinación. Por tal motivo, la aclimatación de las orquídeas micropropagadas *in vitro* en el laboratorio de biotecnología vegetal es importante para que las plantas puedan adecuarse al medio natural y sean resistentes a cualquier ataque de plagas, insectos o enfermedades y así poder aprovechar la conservación en primera instancia y promover su comercialización racional y sostenible en nuestro municipio, para fomentar ingresos económicos por su conservación.

1.2 Justificación.

En la actualidad existe una fuerte preocupación por el deterioro ambiental, debido a que la mayoría de los bosques están desapareciendo a ritmo acelerado. Algunas de las más importantes causas de este deterioro son el crecimiento demográfico, los incendios forestales, la tala indiscriminada de árboles para fines comerciales o energéticos. Al destruir los bosques también desaparece la flora epífita, entre ellas las orquídeas lo cual incluye plantas muy importantes por su valor como patrimonio natural, la belleza escénica y su posible comercio legal. Por esta razón la presente investigación tiene como objetivo tener protocolos de enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de orquídeas (*Orchidaceae*) para su conservación y aprovechamiento económico.

El mercado de plantas y flores ornamentales fue denominado como “industria de las flores” por mover millones de dólares. Países como Noruega, Suiza, Suecia, Dinamarca e Italia son los mayores consumidores con más de US\$ 100,00 per cápita por año, lo que muestra una importante perspectiva comercial de la industria de las flores en el mundo (Matsunaga, 1997)

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo general

Determinar protocolos para la fase de enraizamiento y aclimatación de explantes provenientes de micro propagación *in vitro* de la orquídea (*Orchidaceae*).

1.3.2 Objetivos específicos.

Determinar la concentración adecuada de sacarosa para el desarrollo de explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en la fase de enraizamiento *in vitro*.

Identificar el sustrato adecuado para un buen desarrollo de los explantes *ex vitro* de orquídeas (*Orchidaceae*) en fase de aclimatación.

Determinar los pigmentos fotosintéticos en la fase *in vitro* y *ex vitro* de los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*).

1.4 Hipótesis

Ha. Los niveles de sacarosa en combinación de sistemas de tapas y distintos sustratos influyen en el desarrollo de explantes en fase *in vitro* y *ex vitro* para la aclimatación de orquídeas (*Orchidaceae*).

Ho. Los niveles de sacarosa en combinación de sistemas de tapas y distintos sustratos no influye en el desarrollo de explantes en fase *in vitro* y *ex vitro* para la aclimatación de orquídeas (*Orchidaceae*).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

La orquídea es la flor más bella y enigmática del mundo vegetal, es una flor que, desde tiempos inmemoriales, ha despertado las inimaginables pasiones en las personas, pues ninguna familia de planta tiene una gama de flores tan diferentes y exquisitas, son coloridas, atractivas, estilizadas en formas cautivantes y extrañas a la vez. (Freuler, 2006)

Las orquídeas pueden ser reconocidas por sus flores de simetría fuertemente bilateral, en las que la pieza media del verticilo interno de tépalos llamada labelo está profundamente modificada, y el o los estambres están fusionados al estilo, al menos en la base. Las orquídeas constituyen un grupo de plantas de morfología extremadamente diversa. Su tamaño varía desde unos pocos milímetros de longitud (ciertas especies de los géneros y especies *Bulbophyllum* y *Platystele*) hasta gigantescas agregaciones que pueden pesar varios cientos de kilogramos (algunas especies de *Grammatophyllum*) o longitudes de hasta 13,4 m (como *Sobralia altissima*). Del mismo modo, varía el tamaño de sus flores, desde las diminutas del género *Platystele* menores de 1 mm pasando por las grandes flores de 15 a 20 cm de diámetro en muchas especies de los géneros *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* y *Cattleya*, hasta los 76 cm de las flores de *Phragmipedium caudatum*. La fragancia de sus flores no es menos variable, desde el delicado aroma de *Cattleya* hasta el repulsivo hedor de las flores de ciertas especies de *Bulbophyllum*.

2.1 Diversidad y Distribución

Las orquídeas constituyen la familia más grande de las Angiospermas y por lo tanto la más diversa. Son plantas herbáceas, perennes, cuyo tamaño oscila entre los 3 a 4 mm hasta varios metros de longitud. Se encuentran en los cinco continentes y únicamente las regiones polares y los grandes desiertos no presentan condiciones para su sobrevivencia. Crecen en las ciénagas, en los desiertos de poca extensión, en las selvas y en las sabanas. Sin embargo, el mayor número de

orquídeas se encuentra en las zonas tropicales, mencionándose la existencia de unas 20.000 especies distribuidas de 600 a 900 géneros (Vargas, (2012).

Las orquídeas están distribuidas geográficamente en un rango que va desde 72° Norte hasta 52° Sur, entre el 80% y el 90% de las especies de orquídeas se concentran cerca del Ecuador en la zona tropical o subtropical. La mayoría de estas plantas se localizan entre el Sureste de Asia hasta Indonesia y Australia. En segundo lugar, está la zona comprendida entre África y Madagascar y una tercera zona que va desde México hasta Brasil. (Gonzales, 2003)

2.2 Ecología

Las orquídeas epífitas son más diversas y abundantes en bosques húmedos, pero se encuentran algunas especies en bosques secos y estacionales. El bosque montano tropical de los Andes es uno de los ecosistemas más ricos del mundo en lo que se refiere al número de especies. Las epífitas vasculares como orquídeas, aráceas, bromeliáceas y helechos, entre otras, son un componente importante de estos bosques, tanto en lo que se refiere a la riqueza de las especies como a su rol en los ciclos de agua y nutrientes.

Actualmente estos bosques están desapareciendo rápidamente, como resultado de la creciente presión humana en la región. Las orquídeas presentan varios hábitos de crecimiento debido a su gran variabilidad morfológica. Crecen sobre los árboles (epífitas), o sobre las rocas (litofíticas) y en el suelo, pero una gran parte de la familia es epífita (Kromer et al., 2007).

Las orquídeas se las considera como las plantas más evolucionadas dentro del reino vegetal, ya que presentan una gran complejidad y especialización en su morfología floral y en sus tipos de polinización. Así mismo existen dentro de la familia muy diversas formas de vida y desde el punto de vista ecológico muchos de sus integrantes son componentes importantes en diversos

tipos de vegetación. La característica principal de la raíz principal una capa de tejido esponjosos llamado velamen, que se desarrolla en las especies terrestres, epífitas y litófilas (Espejo & Garcia, 2002).

2.3 Clasificación taxonómica.

Reino: Plantae

 División: Magnoliophyta

 Clase: Liliopsida

 Orden: Asparagales u Orchidales

 Familia: Orchidaceae

Comprende cinco subfamilias: Apostasioideae, Cypripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae, Vanilloideae (Calderon & Cevallos, 2001).

2.4 Descripción morfológica de las orquídeas

Las raíces son de color gris a blanco, presentando un ápice meristemático que absorbe la humedad y las pequeñas cantidades de nutrientes que la planta necesita. Este ápice tiene una coloración verde, la cual cumple la función de realizar la fotosíntesis de las plantas, las modificaciones y tipos de raíces que pueden presentarse en las orquídeas son: fibrosas, tuberosas, tipo bulbo, carnosas sin rizomas, carnosas con rizomas, raíces aéreas (Gil et al., 2007).

Las hojas de las orquídeas son las que más carácter herbáceo presenta de todas las plantas. Como todas las cotiledóneas las nervaduras de las hojas se distribuyen paralelas entre sí a lo largo de ella (Gil et al., 2007).

Las flores de las orquídeas tienen una alta variabilidad, puesto que han evolucionado en función de facilitar la fecundación. Pese a la gran variedad de flores en la familia, todas tienen un diagrama floral idéntico que consiste en: un labelo, esto es tres pétalos, dos laterales, tres sépalos, órganos sexuales fusionados formando una “columna” y ovario ínfero. Son hermafroditas, en el interior se encuentran las estructuras reproductivas de la orquídea (antera y pistilo) que se han unido en una estructura cerosa llamada columna o ginandria (Sociedad Colombiana De Orquideas, 1995).

El fruto de las orquídeas es una cápsula dehiscente, aunque en algunos casos puede ser una vaina, del mismo tipo de la vainilla (*Vainilla sp.*). Comúnmente las cápsulas son de forma ovoide, elíptica, cilíndrica o piriforme, pueden medir de 0,5 a 5 cm de diámetro y de 0,5 a 5 cm de largo dependiendo del género y la especie (Sheenhan, 1994).

2.5 Factores imprescindibles para el desarrollo de las orquídeas

Existen cinco factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las orquídeas: agua, luz (artificial o natural), temperatura, ventilación y fertilización. Cualquier alteración de uno de esos factores modifica la correlación entre ellos, afectando a más de un factor (Gutierrez et al., 1988).

2.6 Cultivo *in vitro*.

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *In vitro* de plantas.

2.7 Dentro del proceso de micro propagación diferenciamos varias fases o etapas.

2.7.1 Fase 0: Selección y Preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

2.7.2 fase 1: Desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluída durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

2.7.3 Fase 2: Introducción del material *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

2.7.4 Fase 3: Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la fase 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados.

Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

2.7.5 Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantos

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el

mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

2.7.6 Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Investigadora Unidad de Biotecnología , 2019).

2.8 Cultivo *in vitro* de orquídeas.

Estas técnicas de cultivo desempeñan un papel importante en los programas de conservación, preservación y mejoramiento genético de las especies, principalmente de aquellas que se encuentran en alguna categoría de amenaza o con capacidades limitadas de reproducción.

Comprendiendo cuatro estrategias complementarias para conservar la biodiversidad: reducción de la presión antropogénica, recuperación de las especies en peligro de extinción, y conservación *in situ* y *ex*, así podemos definir la propagación *in vitro* como la multiplicación de un genotipo a gran escala, a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. Siendo una herramienta

fundamental en los programas de propagación y mejora de especies vegetales, por su potencial para producir plantas de alta calidad a escala comercial, a partir de genotipos selectos y con amplias tasas de multiplicación. Por otra parte, estas técnicas de cultivo se basan en la totipotencialidad de las células vegetales, en consecuencia, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos (Vasquez, 2005).

En el caso de las orquídeas, la germinación in vitro es una alternativa eficiente para su producción y se ha convertido en una herramienta importante para la conservación y reintroducción de especies amenazadas o en peligro de extinción. La implementación de dicha tecnología ha permitido la propagación de especies de gran interés comercial desarrollando un aprovechamiento sostenible por medio de propagación de las especies por medio de semillas permitiendo germinar más de un 90% de plántulas con una sola capsula (Castellanos, 2018).

2.9 Medio Murashige & Skoog

Según Productos y Equipos Biotecnológicos (Probiotec P, 2017) “indica que Murashige & Skoog, se basa en la formulación de macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y micronutriente (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co), (Vitaminas x 100). Es rico en carbono (sacarosa) y nitrógeno esencialmente la sacarosa que ayuda grandemente en los medios in vitro en orquídeas se ha convertido en el medio más popular y usado en el cultivo in vitro de tejidos vegetales.

2.10 Sacarosa en el desarrollo vegetal

La sacarosa afecta tanto en el crecimiento como en la diferenciación de las plantas, dando lugar a cambios profundos en la forma de la planta. Un efecto notorio de sacarosa en el crecimiento de las plantas es el aumento en el tamaño de la planta después del suministro exógeno de este azúcar, que se ha encontrado para una gran variedad de especies.

La señalización de Sacarosa ha estado involucrada en la asimilación y transporte de carbono y nitrógeno. Aunque en la naturaleza el metabolismo del fructano se induce principalmente durante los períodos de baja temperatura, el efecto del frío no es directo sino a través de su papel en el aumento de la concentración de Sacarosa celular debido a una menor utilización de carbono (Pontis & Martínez, 2013).

2.11 Características de las plantas *in vitro*

Las plantas *in vitro* durante las primeras etapas no son necesaria la actividad fotosintética, puesto que a la planta se le suministran los elementos básicos para su desarrollo mediante un medio nutritivo, encontrándose así en un estado heterotrófico y pasándose a un estado autotrófico al ser trasplantado al suelo (Hurtado & Merino, 2009).

Se menciona que la alta humedad y baja luminancia que prevalecen durante el cultivo *in vitro* provocan que la cutícula de las hojas sea delgada, observaron que debido a ello las hojas presentan células empalizadas con grandes espacios intercelulares y baja frecuencia de estomas; esto hace que las plántulas producidas sean susceptibles a la desecación cuando se trasladan a condiciones externas (*ex vitro*). Los estomas de las plántulas *in vitro* son menos operativos y permanecen abiertos; por ello las plántulas al pasar a aclimatarse pueden presentar un importante estrés hídrico durante las primeras horas de la adaptación. Algunas veces las plantas cultivadas *in vitro* no sobreviven al ser trasladadas fuera del frasco hacia un medio ambiente de condiciones más rigurosas. Los principales cambios implican: disminución de la humedad, incremento de la intensidad luminosa, baja disponibilidad de nutrientes y la presencia de patógenos. Las plántulas sacadas de los frascos generalmente van de grandes hasta pequeñas y débiles, y muchas veces estas últimas mueren durante la aclimatación (Vasquez, 2005).

2.12 Aclimatación de Vitroplantas o explantes

La aclimatación de las vitroplantas a condiciones ambientales naturales (*ex vitro*), es un proceso lento, que debe hacerse muy gradualmente para llevar un material vegetal de una condición de 100% de humedad relativa a valores muy inferiores, como 40 - 50%. Inicialmente a la plántula se le mantiene cubierta con un plástico, en forma hermética para luego ir poco a poco permitiendo la entrada de aire externo. Las plántulas *In vitro* requieren de un periodo para adaptarse a las condiciones "*In Vivo*" y lograrse la aclimatación para ser trasplantadas a terreno definitivo (Pierik, 1990) y (Hurtado & Merino, 2009) refiere que la plántula dentro del tubo de ensayo o frasco se encuentra bajo condiciones de esterilidad y con alta humedad relativa, esta última deberá reducirse eliminando el papel parafilm o cinta selladora (si se usa) unos cinco días antes del trasplante al suelo lo que dará a la planta mayor tolerancia a la baja humedad relativa del medio ambiente, facilitándole su posterior adaptación a condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua. Para realizar el trasplante de plántulas de los tubos de ensayo se destapan totalmente y se sacan las plantas, debiendo lavarse cuidadosamente con agua deionizada, de manera que no quede agar adherido en las raíces.

Según Tombolato & Costa, (1998) la etapa de aclimatación está definida como la adaptación de un organismo, especialmente una planta, que es transferida a un nuevo ambiente *ex vitro*. Esta fase es muy delicada, debido básicamente a: stress hídrico, fotosíntesis, absorción de nutrientes y fitosanidad. Siendo necesario que una planta habite un sustrato que le propicie condiciones para su desarrollo.

Grattapaglia & Machado, (1998) consideran que existen varios factores abióticos que interfieren en el proceso de aclimatación como son: luminosidad, nutrientes y humedad relativa.

2.13 Tipos de sustratos para las orquídeas (*Orchidaceae*).

Por sustrato debemos entender todo material o combinación de diferentes componentes que, no siendo tóxico, provea sostén, adecuada capacidad de intercambio catiónico, así como una adecuada retención de humedad para la planta que en éste crecerá, pero con una porosidad que garantice una correcta aireación para un óptimo desarrollo radical. Componente de sustrato, por otro lado, es cualquier material individual, mezclado en proporciones volumétricas con otros componentes, para alcanzar un nivel adecuado de aireación, retención de agua y nutrientes para el crecimiento de plantas (Fonteno et al, 2000); (Silva, 1986) existen numerosos sustratos que pueden ser utilizados para el cultivo de orquídeas, como raíces de *Polypodium*, fibra de raíces de *Osmunda regalis*, cascara de pino, fibra de coco. Se suman a estas, otros sustratos con potencial de utilización como cascara de castaña, tierra vegetal, aserrín, etc.

Gutierrez et al., (1988) indica que el sustrato es el material sobre el cual la planta desarrollará sus raíces y eventualmente crecerá y florecerá. Un buen sustrato debe ser a la vez retentivo de humedad, proveer de buena ventilación a las raíces y ser inerte (tener poca o ninguna capacidad de liberar nutrientes en el medio). Los sustratos muy orgánicos se descomponen, vuelven muy ácidos al medio y se compactan, disminuyendo notoriamente la ventilación, lo que causa la pérdida de las raíces, pudriciones y muerte de la plántula. Castellanos, (2018)

Se considera al sustrato ideal aquel que proporciona a la planta las mejores condiciones para su crecimiento, que posea un bajo impacto ambiental y que la relación beneficio/costo sea adecuada para el sistema productivo, el mejor medio de cultivo en cada caso variará de acuerdo con numerosos factores: especie vegetal, condiciones climáticas, tamaño y forma del saco o contenedor, sistema de riego y fertilización, aspectos económicos, experiencia local, etc.

2.13.1 Fibra de coco.

Calderon & Cevallos, (2001) menciona que es un material orgánico de lenta descomposición que resulta como subproducto en las plantaciones de Coco. A pesar de ser un material orgánico, su descomposición es muy lenta debido a su elevado contenido de lignina (45 %). Es un material difícil de descomponer. La cáscara de coco contiene dos clases de material. Uno de aspecto parecido al corcho, pero de poro abierto, de gran capacidad de absorción de agua y de gran capilaridad y otro consistente de fibras de longitud variable que pueden llegar hasta 4 cm de longitud. La cáscara de coco dado su origen en regiones costeras suele ser un material rico en sales, especialmente Sodio y Cloruros.

2.13.2 Cáscara de castaña.

Es una enmienda orgánica, es decir, sus efectos son como los del estiércol, pero es de origen vegetal, en lugar de animal. Su función es acondicionar el suelo. Por ejemplo, equilibra la cantidad de agua o proporciona aireación, nutrientes y microorganismos que pueden tener un efecto beneficioso para la planta. Esta materia orgánica no se puede utilizar en fresco porque es "muy reactiva", con consecuencias negativas en el suelo como la disminución de oxígeno. Por eso, se compostea, es decir, se somete a un proceso donde se degrada y descompone, de forma lenta, por la acción de los propios microorganismos que la integran. En esta actividad de compostaje participa un grupo de hongos que se aprovechan de la cáscara de castaña para crecer (Cazorla, 2020).

2.13.3 Aserrín

Según (Ecosiembra.com, 2011) el aserrín es un conjunto de astillas finas mezcladas con polvo grueso que se desecha de las madereras o carpinterías, es decir, viene a ser parte de los residuos del proceso de cepillado de la madera, su costo es relativamente bajo e incluso se suele regalar o

botar a la basura, sin embargo, tiene varios usos: Como combustible (leña), piso para la crianza de animales y para el cultivo de plantas, en este último existen casos en los que su incorrecto uso ocasiona daños en el crecimiento de las plantas, también se puede utilizar el aserrín como cobertura sobre el suelo para evitar que este se seque más rápido, la ventaja del aserrín es que retiene gran parte de la humedad después de un riego y evita que la tierra que está debajo de este pierda humedad por los rayos del sol y el viento, por ello se logra disminuir la frecuencia de riego, se puede utilizar en capas de 3 – 5 cm. de espesor que rodeen el tallo o tallos de las plantas sobre todo el suelo de la parcela, pero siempre evitando mezclarlo con la tierra.

Así mismo menciona que se puede utilizar como sustrato para la elaboración de almácigos. Su bajo costo, la capacidad de retener humedad y la facilidad de desmoronarse al tacto lo convierten en un sustrato ideal. Antes de utilizarlo se debe remojar en agua por varias horas (4 – 6) y cambiar el agua varias veces, porque por ser un producto de la madera posee sustancias químicas (taninos) que en contacto con plantas (raíces) ocasionan quemaduras y la muerte de estas; la forma de eliminar estas sustancias es a través del lavado como ya se explicó. Las propiedades físicas del aserrín dependen del tamaño de sus partículas y se recomienda que del 20–40 % sean inferiores a 0.8 mm Es un sustrato ligero, con una densidad aparente de 0.1 a 0.45g·cm⁻³ (Google.com, 2020).

El aserrín es usado en forma común en sustratos hortícolas, y usualmente es compostada antes de emplearlo; sin embargo, debido a las diferencias inherentes entre maderas distintas por cuanto toca a propiedades químicas, la conveniencia del aserrín como componente orgánico de los sustratos es variable en extremo, (Landis et al., 1989) en los últimos años el aserrín se ha usado como sustrato generando buenos resultados, aunque estos dependen del tipo de material y los aditivos añadidos que se utilice (Bures, 1997).

2.13.4 Tierra vegetal.

Es un sustrato agrícola para plantas que está hecho con excelentes propiedades físico-químicas y está formado con fertilizante mineral específico que, en conjunto con el correcto manejo de irrigación, microclima y nutrición, proporcionan un óptimo desenvolvimiento de los cambios, resultando ser excelente y de buena calidad en el vivero.

2.13.5 Tierra negra.

Es de color oscuro y resulta de la descomposición de la materia orgánica, ya sea proveniente de los restos de animales o de los restos de hojas que cae de los árboles, los cuales son absorbidos como nutrientes. Cuando hablamos sobre las propiedades que tiene la tierra negra, podemos mencionar que contiene materia orgánica que se ha descompuesto en partículas muy pequeñas, que mejoran su textura dándole la capacidad de retener suficiente agua y que además proporciona una buena circulación entre las raíces de la planta, que es fundamental para el crecimiento de las mismas.

Propiedades de la tierra negra:

- Mejora la textura, dándole la capacidad de retener suficiente agua
- Proporciona una buena circulación entre las raíces de la planta, siendo fundamental para un desarrollo de la planta, ya que mejora las condiciones para la supervivencia de insectos provechosos y gusanos que también ayudan al flujo de aire, evitando un suelo compacto.
- Se vuelve abundante de nutrientes, ya que algunas bacterias son capaces de absorber el nitrógeno del aire y lo depositan en el suelo, lo que lo lleva a estar disponible para la planta.
- Posee un alto nivel de fertilidad, por lo que se considera una opción ideal para las plantas.

- Aporta textura al suelo, al descomponer la superficie va a permitir el drenaje del agua lo que a su vez va a proporcionar la capacidad de incorporar propiedades de retención de agua en los suelos con mucha arena (Portalfruticola, 2020).

2.14 Invernadero o vivero

Constituye el ambiente en el cual se termina el proceso de aclimatación del material vegetal para su pase definitivo a condiciones de campo y/o su mantenimiento y reproducción en el vivero (dependiendo de la especie). En este ambiente se debe mantener bajo un estricto control fitosanitario, particularmente en aquellos casos donde el objetivo fundamental es la obtención de plantas libres de patógenos (Girgebv, 1994).

3. MATERIALES Y METODOS

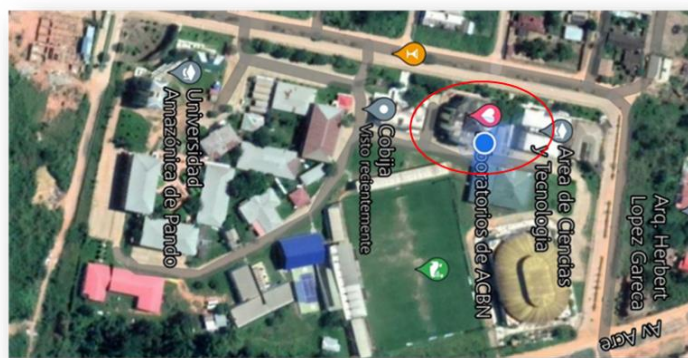
3.1 Ubicación del área de estudio

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

Geográficamente se encuentra ubicada a 11° 01' 59,20'' latitud Sur y 62° 45' 31,13'' de longitud Oeste, cuenta con una temperatura promedio de unos 23°C a 26°C. (Figura 1)

Figura 1

Croquis de ubicación del laboratorio de Biotecnología Vegetal.



Fuente: Google map.

3.2 Materiales

3.2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado en la presente investigación para la fase de enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de explantes de Orquídea (*Orchidaceae*) Figura 2 son provenientes de la fase de micropropagación y multiplicación del Laboratorio de Biotecnología vegetal perteneciente al Área de Ciencias Biológicas y Naturales - ACBN de la Universidad Amazónica de Pando.

Figura 2

Material Vegetal, explantes de orquidea (orchidaceae).



Fuente: Elaboracion propia.

3.2.2 Materiales de trabajo

Los materiales, equipos, reactivos, e insumos que se utilizaron para la investigación estaban a disposición del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando, Materiales como sustratos, materiales de escritorio y algunos implementos por parte de la tesista.

3.2.2.1 Equipos de laboratorio.

Agitador magnético

Autoclave

Balanza analítica.

Cámara de flujo laminar de aire.

Horno microondas.

pH metro.

Refrigerador.

Temporizador (Control de horas luz - oscuridad).

Termo-hidrómetro digital.

Vitrinas con reguladores de luz

Espectrofotómetro

3.2.2.2 Material de vidrio y plástico.

Mechero de Alcohol

Placas Petri

Probetas (10, 50, 100, 500 ml.).

Vasos de precipitación (25, 50, 800 y 1000 ml)

Frascos de vidrio para almacenar soluciones (250, 500 ml).

Pipeta

Vasos de polietileno

3.2.2.3 Material químico.

Sacarosa.

Carbohidratos

Cito quininas

Auxinas

Ácido clorhídrico (HCL 0,1 y 1 N)

Hidróxido de sodio (Na OH 0,1 y 1 N)

Alcohol etílico al 96% y 70%.

Hipoclorito de sodio.

Macronutrientes

Micronutrientes
Quelatos de hierro
Vitaminas
Reguladores de crecimiento
Fungicida (Ridomil)

3.2.2.5 Instrumentos e implementos de laboratorio.

Algodón
Bisturí
Mechero de alcohol o Bunsen
Papel aluminio
Pinzas
Espátula
Papel esterilizado

3.2.2.6 Materiales de escritorio.

Papel bond A4
Regla
Lapicero
Lápiz
Cámara fotográfica
PC Portátil
Impresora

3.2.2.7 Material vegetal.

Los explantes de Orquídea (*Orchidaceae*) fueron proporcionados por el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando, los explantes son provenientes de la fase de micropropagación de cultivos *in vitro*.

3.2.2.8 Material de sustrato.

Cascara de castaña: Este producto es fácilmente encontrado en la región Cobija-Pando, pues una de las actividades principales es la extracción de la nuez de la castaña, por lo que algunas empresas desechan la cáscara a la intemperie o lo queman. La cáscara de castaña recolectada para el trabajo es el residuo que se obtiene al extraer la nuez, vale decir es el tegumento leñoso que

protege la nuez el cual estuvo descomponiéndose en la intemperie, con la finalidad de homogenizar su descomposición, y luego se procedió al desmenuzado a un tamaño de 5mm a 1 cm.

Fibra de coco: Es un material abundante en la región y se puede encontrar en todos los hogares y se obtiene de forma gratuita, este material se lo desmenuza y se deja secando por un tiempo determinado.

Aserrín descompuesto: Este material, es el desecho de los aserraderos de los diferentes tipos de madera que ocupan. El aserrín colectado ha estado en descomposición a la intemperie por espacio de 5 meses, para luego ser compostado por espacio de 1 mes más, la característica principal de este aserrín es que son partículas muy finas con dimensiones menores a 1 mm.

Tierra vegetal: La tierra vegetal fue proporcionada por el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de ciencias Biológicas y Naturales.

Tierra negra común: La tierra negra se extrajo de los suelos donde se encuentran las plantas de cajú (*Anacardium occidentale*).

3.3 Metodología.

En la presente investigación se realizó dos experimentos, fase de enraizamiento *in vitro* y fase de aclimatación *ex vitro*.

3.3.1 Fase de enraizamiento *in vitro* (Experimento 1)

3.3.1.1 Medio de cultivo

Los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, gelificantes, carbohidratos y antioxidantes se utilizaron a concentraciones según Murashige y Skoog que se basa en la formulación de macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y micronutriente (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co),

(Vitaminas x 100) esto como medio base para los tratamientos establecidos. La marca de los reactivos fue SIGMA. Todos los reactivos que se utilizó se pesaron por separado y se disolvió por separado Tabla 1.

Tabla 1

Soluciones skoog o soluciones madre.

1 LITRO			
MACRONUTRIENTES	Mg/L	MICRONUTRIENTES	Mg/L
.NH ₄ NO ₃ (Nitrato de Amonio)	0,165	MnSO ₄ .4H ₂ O (Sulfato de manganeso tetrahidratado)	15,6
KNO ₃ (Nitrato de Potasio)	0,19	MnSO ₄ .H ₂ O (Sulfato de manganeso monohidratado)	8,45
CaCl ₂ .2H ₂ O (Cloruro de Cobalto Dihidratado)	0,44	ZnSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Zinc heptahidratado)	8,6
CaCl ₂ .6H ₂ O (Cloruro de Cobalto Hexahidratado)	0,665	H ₃ BO ₃ (Ácido trioxoborico)	6,2
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Magnecio Heptahidratado)	0,37	KI (Yoduro de Potasio)	0,83
KH ₂ PO ₂ (Floruro de Potasio)	0,17	NaMoO ₄ .2H ₂ O (Molibdato de sodio Dihidratado)	0,25
		CuSO ₄ .5H ₂ O (Sulfato de Cobre Pentahidratado)	0,025
		CoCl ₂ .6H ₂ O (Cloruro de Cobalto hexahidratado)	0,025
		FeSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de hierro Heptahidratado)	27,8

Fuente: Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

3.3.1.2 Preparación de medio de cultivo para fase de enraizamiento *in vitro*.

El medio de cultivo fue MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) constituidos de sales minerales y vitaminas, con suplemento de carbón activo 1 grL⁻¹, sacarosa en niveles de 20,30,40 y 60 grL⁻¹, y como gelificante con 8 grL⁻¹) de Carregenina, L. Cysteine 2 mL⁻¹), el pH fue ajustado para 5,7 ±, los frascos utilizados consistieron en vasos (10 cm x 7cm), con 50ml de medio de cultivo los

cuales fueron esterilizados en el autoclave a 120 °C y 1,3 atm de presión por 20 minutos. Así mismo en cada frasco fueron colocados los tratamientos, inmediatamente transferidos a la sala de crecimiento donde el fotoperiodo es de 16 horas, temperatura de 25 ± 3 °C y humedad relativa de 90%. Figura 3.

Figura 3

Preparacion de medio de cultivo.



Fuente: Elaboracion propia.

3.4 Diseño experimental (Experimento 1)

El diseño experimental que se empleó en la investigación es completamente al azar (DCA) con cinco repeticiones. Con un arreglo bifactorial distribuidos completamente al azar con un arreglo combinatorio (Tabla 2), donde los tratamientos fueron dispuestos en esquema factorial de 2 x 8, con 5 repeticiones, con factores de concentraciones de sacarosa (20;30;40;60 grL⁻¹) y sistemas de tapas Barbijo y Parafilm.

Tabla 2*Diseño experimental 1.*

FACTOR "A"	FACTOR "B"	TRATAMIENTOS
Sistema	Sacarosa grL ⁻¹	
Tapa Barbijo	20	t1 = r5
	30 (Testigo)	t2 = r5
	40	t3 = r5
	60	t4 = r5
Tapa Parafilm	20	t5 = r5
	30 (Testigo)	t6 = r5
	40	t7 = r5
	60	t8 = r5

Fuente: Elaboración propia.

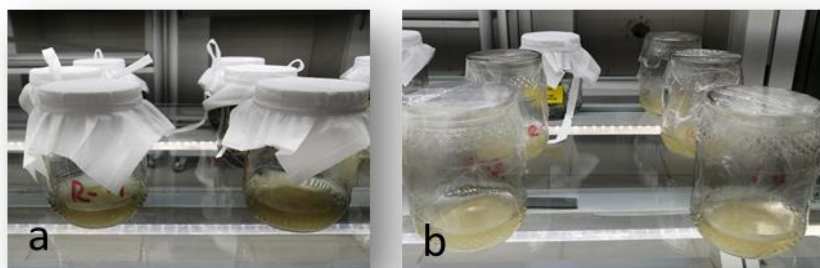
3.5 Variables de respuesta para la fase de enraizamiento *in vitro* (Experimento 1)

Después de los 25 días de establecimiento en la fase de enraizamiento *in vitro*, fueron evaluados las siguientes variables.

El método gravimétrico se utilizó para evitar la tasa de pérdida de vapor de agua. Para ello, los viales con tapa Barbijo y tapa Parafilm se pesaron durante los 25 días con la ayuda de una balanza analítica (0,0001 g). En ambos tratamientos, los viales contenían inicialmente 50 ml del medio de cultivo. Figura 4

Figura 4

Tasa de pérdida de vapor de agua a. muestra con tapa barbijo; b Muestra con tapa parafilm.



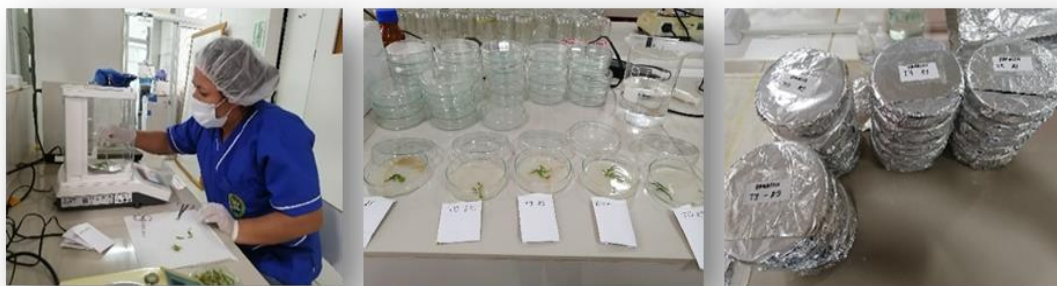
Fuente: Elaboración propia

3.5.1 Contenido relativo de agua.

Para evaluar el contenido relativo de agua (CRA), se eliminaron las hojas de la región mediana y ponderada para obtener masa fresca (MF). Luego las hojas fueron sumergidas en 20 ml de agua de ósmosis inversa durante 24 horas a 4 °C en la oscuridad. Después de este período, se pesaron de nuevo para obtener la masa turgida (TM). Luego, se secaron en un horno a 65 °C, con circulación de aire forzado, hasta obtener masa constante, para adquirir masa seca (DM). El CRA se obtuvo utilizando la fórmula $CRA = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$ (Cairo, 1995) Figura 5.

Figura 5

Proceso de toma de muestras para determinar la cantidad de agua en los explantes de orquídea (Orchidaceae) en la fase de enraizamiento in vitro.



Fuente: Elaboracion propia.

3.5.2 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos.

Para la determinación de pigmentos fotosintéticos, se trituraron muestras de 50 mg de hojas y se insertaron en 5 ml de acetona el 80 % (v/v), donde permanecieron durante 48 horas en la oscuridad bajo enfriamiento constante. Las absorbencias de los extractos se leyeron en espectrofotómetro en longitudes de onda de 664 nm, 646 nm y 470 nm, y el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b; y carotenoides) según (Lichtenthaler, 1987) Figura 6.

Figura 6

Proceso para toma de muestras para la lectura de los extractos de pigmentos fotosintéticos en el espectrofotómetro.



Fuente: Elaboración propia.

3.5.3 Características morfológicas de crecimiento

Previa limpieza de los explantes de orquideas (*Orchidaceae*) se realizó el conteo de las hojas predeterminadas y se midió la longitud desde la base hasta la punta de la hoja más larga, así como también se tomó en cuenta la tasa de mortalidad de los explantes fase de enraizamiento *in vitro*.

Figura 7.

Figura 7

*Muestra de explantes para caracterización morfológica en fase de enraizamiento *in vitro*. a. Explante para conteo de hojas predeterminadas; b. Explante para determinación de longitud.*



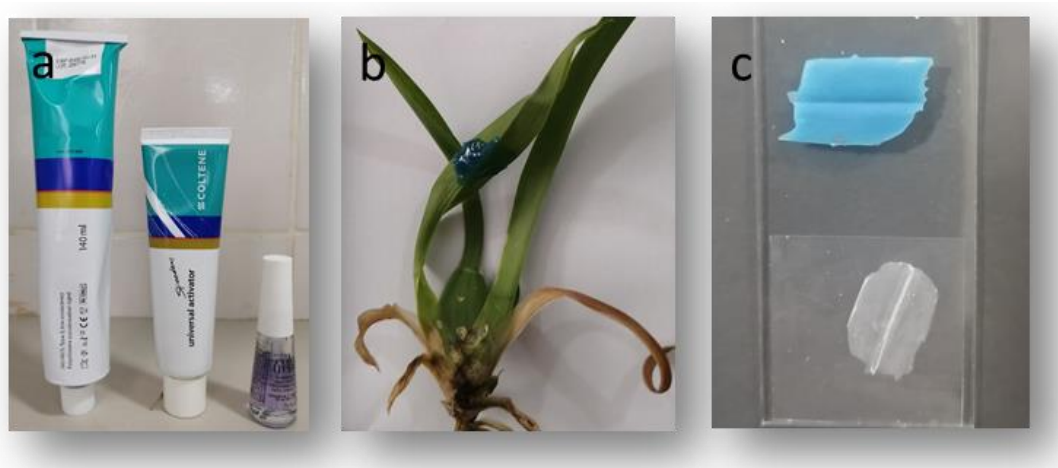
Fuente: Elaboración propia.

3.5.4 Presencia de estomas (cantidad)

Con la ayuda de los activadores y un esmalte transparente se tomó la muestra de una de las hojas del explante de orquídea (*Orchidaceae*), luego se procedió a observar la presencia de estomas y se contabilizó en un diámetro de 0.5 mm, en un microscopio. Figura 8

Figura 8

Procedimiento para toma de muestras para observar la presencia de estomas en la de enraizamiento in vitro. a. Activadores; b. Explante, c. Muestra tomada.



Fuente: Elaboración propia.

3.6 Fase de aclimatación *ex vitro* de orquídeas (*Orchidaceae*) (Experimento 2)

La aclimatación de las orquídeas consistió en 10 meses, (3 meses pre aclimatados en la sala de crecimiento, 3 en Invernadero y 4 meses en vivero). con sus respectivos sustratos, en vasos de polipropileno de 200 ml, los sustratos consistían en Tierra negra común como Testigo de la investigación, Tierra vegetal, Aserrín, Cascara de castaña y Fibra de coco, (Figura 9) todos los sustratos debidamente auto clavados. Fueron llevados a la sala de crecimiento donde permanecieron 3 meses a temperatura de laboratorio (27°C), una vez trasladados a Invernadero y Vivero estas permanecieron a temperatura promedio de la región, La temperatura promedio de la ciudad de Cobija es de 25,4 °C con variaciones medias de entre 23°C y 39°C. Durante la época

seca se presentan frentes fríos provenientes del sur, y la temperatura mínima llega alcanzar 19°C. por lo general se presentan dos estaciones: lluviosa (septiembre-abril) y seca (mayo-agosto), en el transcurso del tiempo se estuvo supervisando con riegos y desinfección de posibles contaminaciones.

Figura 9

Sustratos para la aclimatacion ex vitro de explantes de orquideas. a Tierra negra comun; b Tierra vegetal; c Aserrin; d Cascara de castaña; e Fibra de coco.



Fuente: Elaboracion propia.

3.7 Diseño experimental 2

El diseño empleado para este trabajo de investigación es el de completamente al azar con 5 repeticiones. Con un arreglo factorial distribuidos completamente al azar con un arreglo combinatorio Tabla 3.

Tabla 3*Diseño experimental 2.*

FACTOR "A"	FACTOR "B"	TRATAMIENTO
SACAROSA	SUSTRATO	
20	Fibra de coco	t1 = r5
	Cascara de castaña	t2 = r5
	Aserrín	t3 = r5
	T. Vegetal	t4 = r5
	T. Negra (Testigo)	t5 = r5
30 (Testigo)	Fibra de coco	t6 = r5
	Cascara de castaña	t7 = r5
	Aserrín	t8 = r5
	T. Vegetal	t9 = r5
	T. Negra (Testigo)	t10 = r5
40	Fibra de coco	t11 = r5
	Cascara de castaña	t12 = r5
	Aserrín	t13 = r5
	T. Vegetal	t14 = r5
	T. Negra (Testigo)	t15 = r5
60	Fibra de coco	t16 = r5
	Cascara de castaña	t17 = r5
	Aserrín	t18 = r5
	T. Vegetal	t19 = r5
	T. Negra (Testigo)	t20 = r5

Fuente: Elaboración propia.

El número de repeticiones 5 por lo tanto el número de unidades experimentales será de $1 \times 4 \times 25 = 100$

3.8 Variables de respuesta. (Aclimatación *ex vitro*)

Después de los 10 meses, (3 meses pre aclimatados en la sala de crecimiento, 3 en Invernadero 4 meses en Vivero), donde vivero será la última etapa para ser trasladado a su lugar definitivo, después de los 10 meses se evaluaron las siguientes variables.

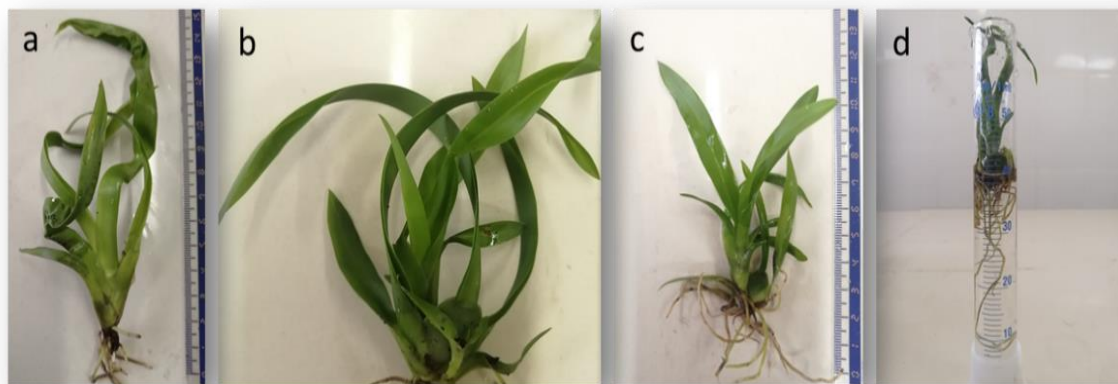
3.8.1 Características de crecimiento

Para tomar datos de la longitud de planta se procedió a una previa limpieza del explante, y con la ayuda de una regla se midió desde la base de la planta hasta la punta de la hoja más larga. De la misma manera se hizo con la longitud de la raíz, se midió la raíz pivotante de extremo a extremo, se tomó en cuenta cada hoja para la variable número de hojas y para el volumen de raíz, se tomó

una probeta de 50 ml se introdujo 40 ml de agua y se sumergió las raíces del explante y de esa manera se obtuvo el dato para el volumen Figura 10.

Figura 10

Muestra de ejemplares de explantes de orquídeas (Orchidaceae) para su caracterización morfológica en fase de aclimatación. a Longitud de planta; b Numero de hojas; c Longitud de la raíz; d Volumen de la raíz.



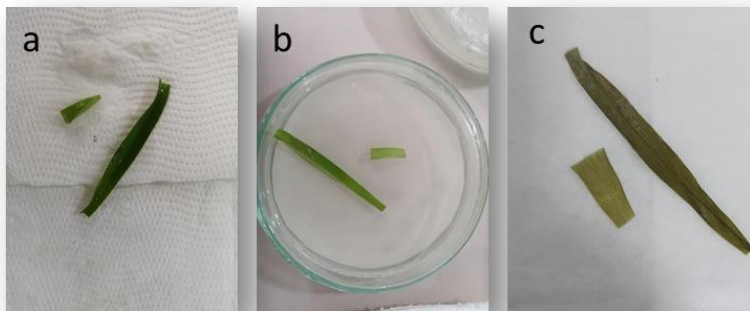
Fuente: Elaboración propia.

3.8.2 Contenido relativo de agua (CRA).

Para evaluar el contenido relativo de agua (CRA), de la misma manera que en el experimento 1 se eliminaron las hojas de la región mediana y ponderada para obtener masa fresca (MF). Luego las hojas fueron sumergidas en 20 ml de agua de ósmosis inversa durante 24 horas a 4 °C en la oscuridad. Después de este período, se pesaron de nuevo para obtener la masa turgida (TM). Luego, se secaron en un horno a 65 °C, con circulación de aire forzado, hasta obtener masa constante, para adquirir masa seca (DM) Figura 11.

Figura 11

Proceso para determinar el contenido relativo de agua en el explante en fase de aclimatación. a Masa fresca; b Masa de turgencia; c Masa seca.



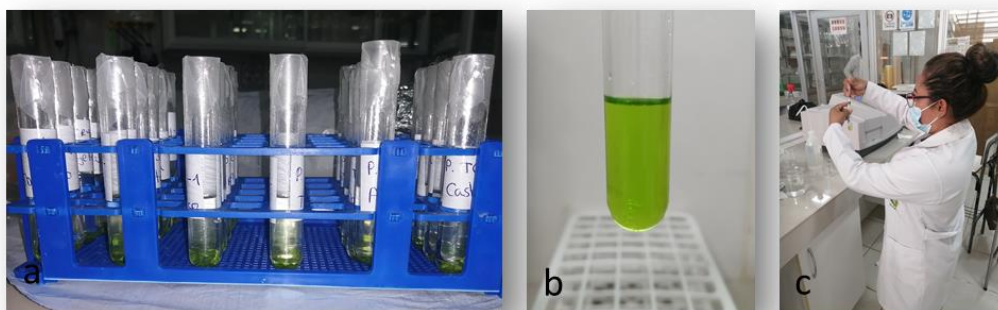
Fuente: Elaboración propia.

3.8.3 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

Para la determinación de pigmentos fotosintéticos, se trituraron muestras de 50 mg de hojas y se insertaron en 5 ml de acetona el 80 % (v/v), donde permanecieron durante 48 horas en la oscuridad bajo enfriamiento constante. Las absorbencias de los extractos se leyeron en espectrofotómetro en longitudes de onda de 664 nm, 646 nm y 470 nm, y el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b; y carotenoides) Figura 12.

Figura 12

Proceso de toma de muestras para observar la pigmentación fotosintética de la clorofila, a Muestras de explantes insertadas en 5 ml de acetona; b. absorbencia del extracto; c. Lectura de longitudes de onda en el espectrofotómetro.



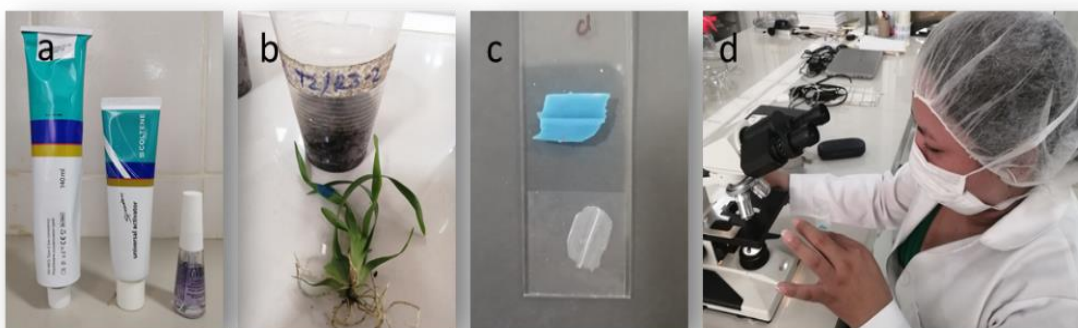
Fuente: Elaboración propia.

3.8.4 Presencia de estomas (Cantidad total, Abiertos y Cerrados)

Se tomó la hoja más vigorosa del explante de orquídea (*Orchidaceae*) y se colocó los activadores previamente preparados para tomar el molde, luego de tomar el molde se pasó con el esmalte transparente, luego se llevó al lente óptico del microscopio para observar el movimiento estomático figura 13.

Figura 13

Procedimiento para observar presencia de estomas en los explantes.



Nota. a Activadores y esmalte; b Toma de muestra del explante; c Molde de la muestra del explante; d Observación de estomas en el microscopio.

Fuente: Elaboración propia.

3.9 Modelo Estadístico

Los datos de las variables de respuesta fueron sometidos a los diseños para los dos experimentos, se analizaron según el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + T_j + E_k + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

B_i = Efecto del i-ésimo repetición

T_j = Efecto de la j-esima de niveles de sacarosa –tipos de sustrato

E_k = Efecto del k-ésimo tipos de tipos de tapa

I. j. k = Efecto de la interacción

ϵ_{ijkl} = Error experimental

3.10 Análisis Estadístico.

De acuerdo al modelo estadístico definido se realizaron análisis para probar hipótesis acerca de los efectos fijos y comparaciones de medias mediante contrastes, para determinar protocolos en fase de enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro*, adecuados según las concentraciones.

Posteriormente, se realizó el análisis de varianza mediante la prueba F, indicó que hubo una diferencia entre los tratamientos, una comparación de sus medias por la prueba de Tukey (1949).

Para los datos cuantitativos, se realizó un análisis regresión polinómica. Los análisis se llevaron a cabo utilizando los programas estadísticos de ASSISTAT Y SISVAR.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de varianza. Experimento 1- (Fase de Enraizamiento *in vitro*).

Para el análisis de variancia en la propagación *in vitro* de las orquídeas (*Orchidaceae*), se observó que entre los factores de sistemas de tapas (Barbijo y Parafilm) y nivel de Sacarosa (20:30:40:60 grL⁻¹) existe interacción en la variable de Longitud de planta (cm) ($p < 0,01$). Así mismo se observa que para las variables Numero de hojas y Tasa de mortalidad existe diferencia significativa en las independientes Tabla N 4.

Tabla 4

Análisis de varianza de las características morfológicas de explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase de enraizamiento in vitro en función de sistemas de tapas y niveles de sacarosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)		
	Longitud de planta	Numero de hoja	Tasa de mortalidad
Sistema tapas	6,27**	17,05ns	0,53**
Sacarosa	2,15*	0,98**	0,11*
Sistema*Sacarosa	2,37**	0,62 ns	0,94 ns
C.V(%)	27,78	22,73	16,41

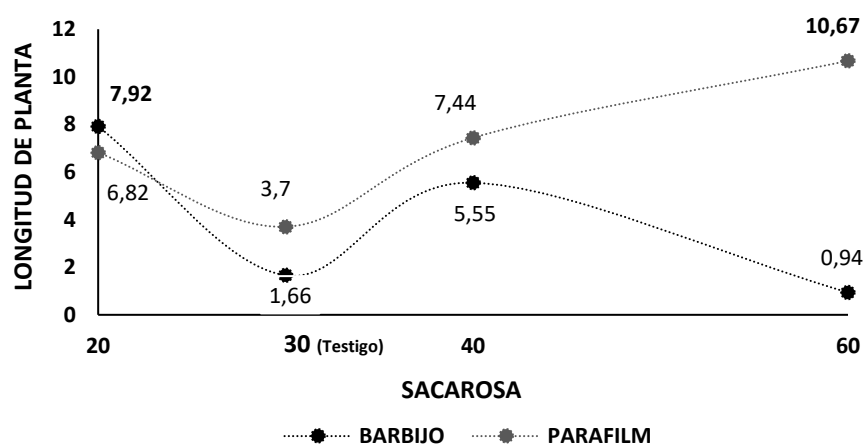
Notas: ns no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable longitud de planta, entre los factores Sistema de tapa (barbijo y parafilm) y nivel de Sacarosa en condiciones *in vitro* de orquídea (*Orchidaceae*), se observó que 20g/L⁻¹ de sacarosa en combinación de tapa barbijo se obtuvo mayor longitud de planta (7,92 cm), así como también para el sistema de tapa parafilm en combinación de 60 g/L⁻¹ de sacarosa se observa

mayor longitud de planta (10,67 cm) siendo los dos los mejores a comparación de los demás tratamientos (Figura 14).

Figura 14

Variable Longitud del explante fase de enraizamiento *in vitro*.

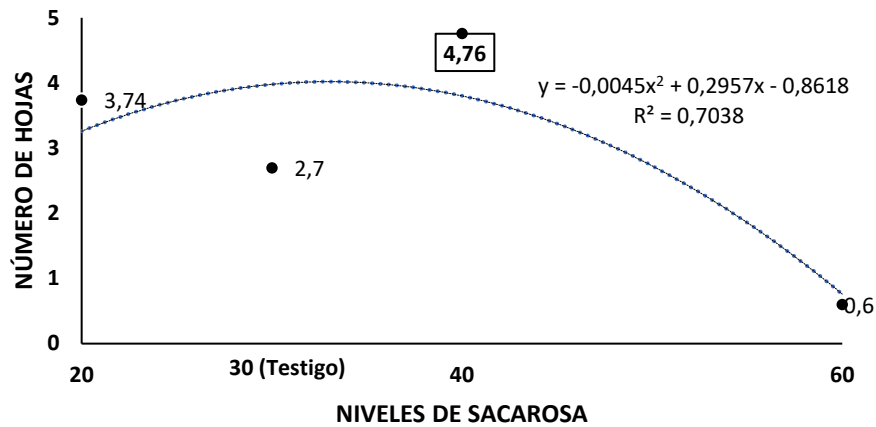


Fuente: Elaboración Fuente propia.

Para la variable independiente número de hoja en la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes de orquídea (*Orquidacea*), se observó que 40gL^{-1} de sacarosa promovió mayor número de hojas estadísticamente (4,76), independientemente del tipo de tapa, a diferencia de los demás tratamientos estadísticamente menores. Figura 15

Figura 15

Variable Numero de hojas en la fase de enraizamiento *in vitro*.

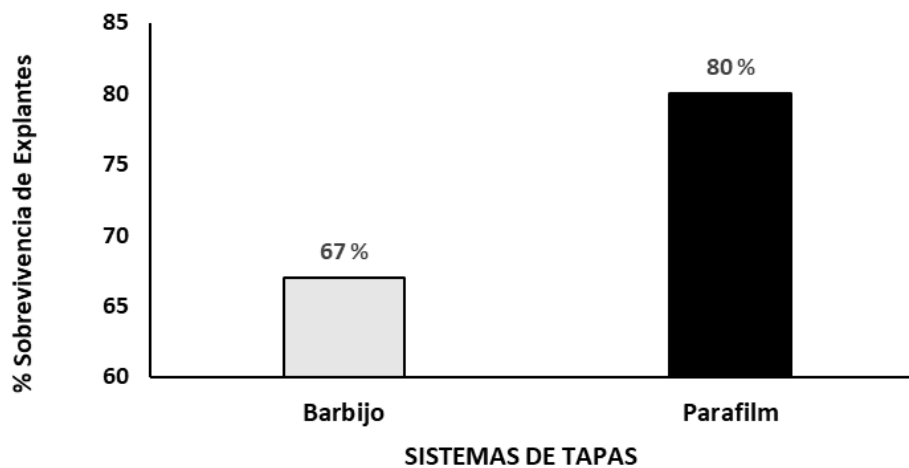


Fuente: Elaboración propia.

Para la variable tasa de mortalidad en los independientes de sistemas de tapas (Parafilm y Barbijo), se observó que, con el sistema de tapa parafilm se obtuvo mayor sobrevivencia de explantes en la fase de enraizamiento *in vitro* con un 80 % a diferencia del sistema de tapa Barbijo que obtuvo un 67% Figura 16.

Figura 16

Variable Tasa de mortalidad en fase de enraizamiento *in vitro*.

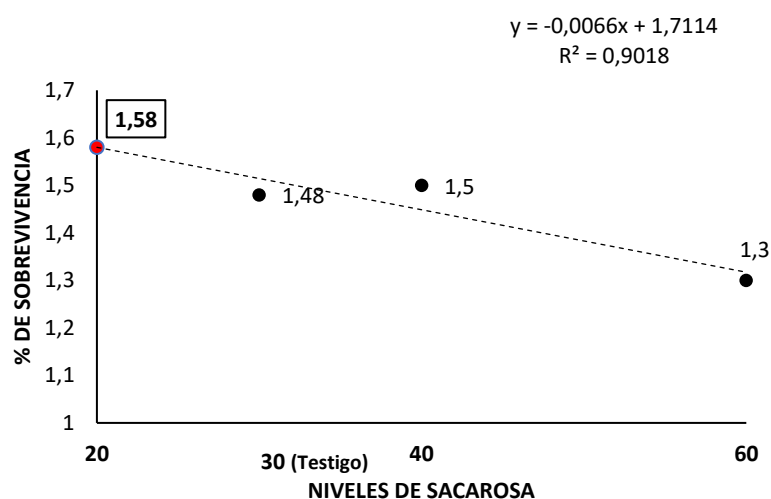


Fuente: Elaboración propia.

En la variable tasa de mortalidad o porcentaje de sobrevivencia de los explantes de orquídea (*Orchidaceae*) en fase de enraizamiento en la independiente de diferentes concentraciones de sacarosa se obtuvo mayor sobrevivencia de explanes *in vitro* con la concentración de 20gL^{-1} de Sacarosa con (1,58) Figura 17.

Figura 17

Variable Tasa de mortalidad en fase de enraizamiento con niveles de sacarosa.



Fuente: Elaboración propia.

En el análisis de variancia de número de estomas de la fase de enraizamiento *in vitro* de las orquídeas (*orchidaceae*), se observa que entre los factores sistemas de tapas (Barbijo y Parafilm) y nivel de sacarosa ($20:30:40:60\text{grL}^{-1}$) no existe interacción, sin embargo, su coeficiente de varianza (CV) es menor a 30 % significa que el modelo estadístico es el adecuado para esta investigación Tabla 5.

Tabla 5

Análisis de varianza para la variable Número de estomas en los explantes en fase de enraizamiento de orquídeas in vitro (Orchidaceae) en función de sistemas tapas y niveles de sacarosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)
	Número de estomas
Sistema tapa	1,42 ns
Sacarosa	1,14 ns
Sistema*Sacarosa	1,31 ns
C.V(%)	27,72

Notas: ^{ns} no significativo ($p>0,01$); * significativo a 5% ($p<0,05$); ** significativo a 1% ($p<0,01$)

En la fuente de variación de contenido de agua en los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en fase de enraizamiento *in vitro* existe interacción entre los factores sistemas de tapas (Barbijo y Parafilm) y nivel del de sacarosa ($20:30:40:60\text{grL}^{-1}$), así mismo se puede observar que el coeficiente de varianza (CV) es menor a 30%, que significa que el modelo estadístico de esta variable es adecuado para la investigación Tabla 6.

Tabla 6

Análisis de varianza del contenido de agua en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase de enraizamiento in vitro en función de sistemas tapas y niveles de sacarosa.

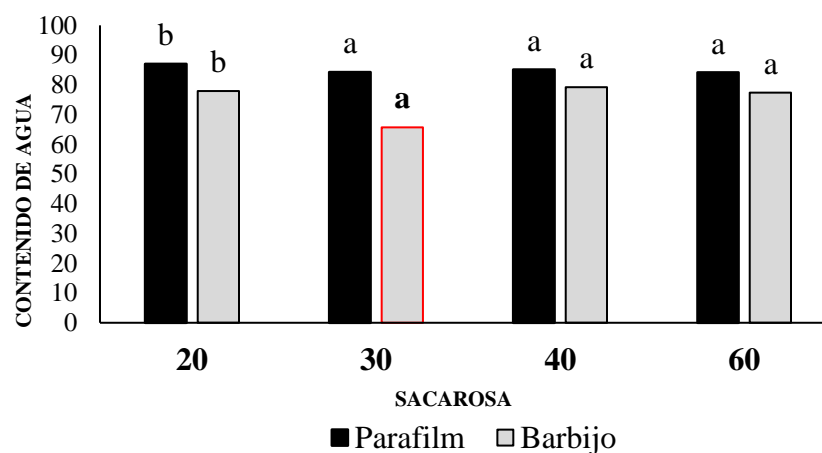
FUENTE DE VARIACION	CUADRADO MEDIO (CM)
	Contenido de agua
Sistema tapa	505,52 **
Sacarosa	121,02 ns
Sistema*Sacarosa	255,65 *
C.V(%)	10,58

Notas: ^{ns} no significativo ($p>0,01$); * significativo a 5% ($p<0,05$); ** significativo a 1% ($p<0,01$).

En la variable independiente de contenido de agua se observa que existe menor porcentaje de contenido de agua con el sistema de tapa barbijo, así mismo se observa que en la interacción de

sistema de tapa (Barbijo) y concentración de sacarosa (30 grL¹) existe menor cantidad de agua, alcanzando un 65,7% estadísticamente, a diferencia de otros tratamientos que fueron estadísticamente iguales entre niveles de concentración de sacarosa y sistemas de tapas Figura 19.

Figura 19. Variable de Contenido de agua fase de enraizamiento *in vitro*.



Fuente: Elaboración propia.

Para la fuente de variación de pigmentos fotosintéticos se observa que en las variables carotenoides y clorofila b existe interacción entre los factores nivel de sacarosa (20:30:40:60grL⁻¹) y sistemas de tapas (Barbijo y Parafilm), así mismo muestra que en la variable de Clorofila a no existe diferencia significativa siendo los tratamientos iguales, el coeficiente de variación (CV) está en el rango de 30%, significa que el modelo estadístico es adecuado para las variables de estudio Tabla 7.

Tabla 7

Análisis de varianza para los pigmentos fotosintéticos de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase de enraizamiento in vitro, en función de sistemas de tapas y niveles de sacarosa.

FUENTE VARIACIÓN	DE	CUADRADOS MEDIOS (CM)		
		Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
Sistema	0,99 ns	0,00 ns	0,74 ns	
Sacarosa	0,72 ns	0,28*	0,71 ns	
Sistema*Sacarosa	0,16 ns	0,25 *	0,80 *	
CV. %	29,54	32,73	22,46	

Notas: ^{ns} no significativo ($p>0,01$); * significativo a 5% ($p<0,05$); ** significativo a 1% ($p<0,01$).

Para la variable de respuesta en la pigmentación fotosintética de clorofila b se observó que independientemente del nivel de sacarosa, el sistema tapa parafilm es el mejor en este experimento, así mismo muestra que la interacción entre sistema de tapa (Barbijo) y el nivel de sacarosa (20grL^{-1}) obtuvo mayor pigmentación fotosintética. Por otro lado, en la variable de Carotenoides se observa que independientemente del nivel de sacarosa el sistema de tapa Barbijo obtuvo mejor pigmentación fotosintética, de la misma manera se observó que $30:40:60\text{ grL}^{-1}$ de sacarosa en combinación del sistema tapa parafilm brinda resultados favorables en este experimento Tabla 8.

Tabla 8

Variable de Pigmentación fotosintética (Clorofila b y Carotenoides) en la fase de enraizamiento in vitro.

		VARIABLES DE RESPUESTA	
SISTEMA	NIVEL DE	Clorofila "B"	Carotenoides
TAPA	SACAROSA		
Tapa Barbijo	20	1,27 AA	0,93 AA
	30	0,92 Ab	0,20 AA
	40	0,75 Ab	0,33 AA
	60	0,66 Ab	0,39 AA
Tapa Parafilm	20	0,69 AA	0,23 bA
	30	1,03 AA	0,80 AA
	40	0,82 AA	0,42 AA
	60	1,09 AA	0,75 AA

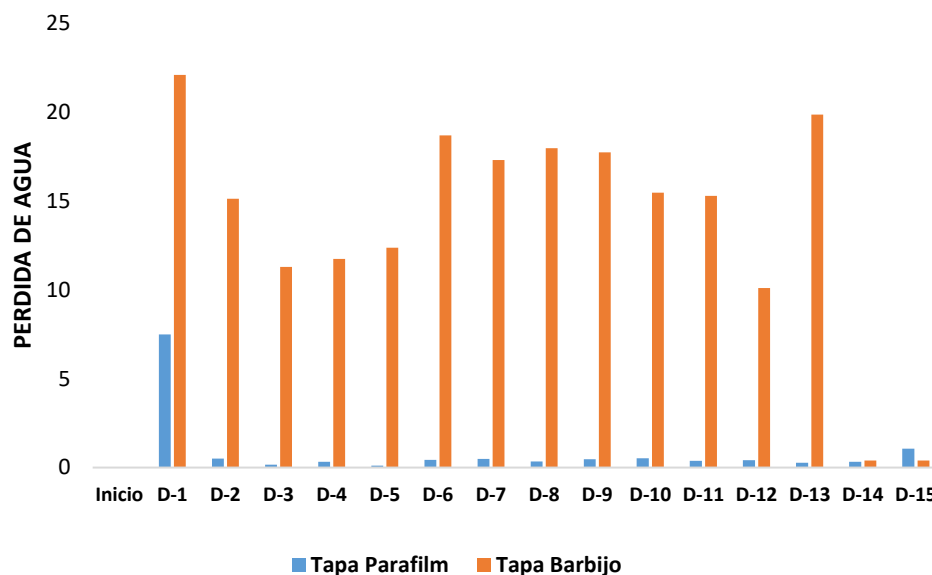
Nota*Valores con letras minúsculas son estadísticamente iguales por la prueba de Tukey

Fuente: Elaboración propia.

Para la variable Perdida vapor de agua en la fase de enraizamiento *in vitro* de orquídeas (*Orquidaceae*) se observa que hay un gran intercambio gaseoso de agua con el sistema de tapa barbijo a comparación del sistema de tapa parafilm. Figura 18.

Figura 18

Variable perdida de vapor de agua en la fase de enraizamiento.



Fuente: Elaboración propia.

4.2 Análisis de varianza. Experimento 2- (Fase de Aclimatación *ex vitro*).

En el análisis de Varianza para la fase de aclimatación *ex vitro* muestra que hubo interacción $p < 0,01\%$ en las variables longitud de planta, longitud de raíz y volumen de raíz. Así mismo se puede observar que en la variable número de hoja existe diferencia significativa en las independientes, el Coeficiente de variación está por debajo de 30% para todas las variables, esto quiere decir que el modelo estadístico es el adecuado para la presente investigación Tabla 9.

Tabla 9

Análisis de varianza para las características morfológicas de explantes de orquídeas (Orchidaceae) provenientes de la fase de enraizamiento con diferentes niveles de sacarosa en función de tipos de sustratos.

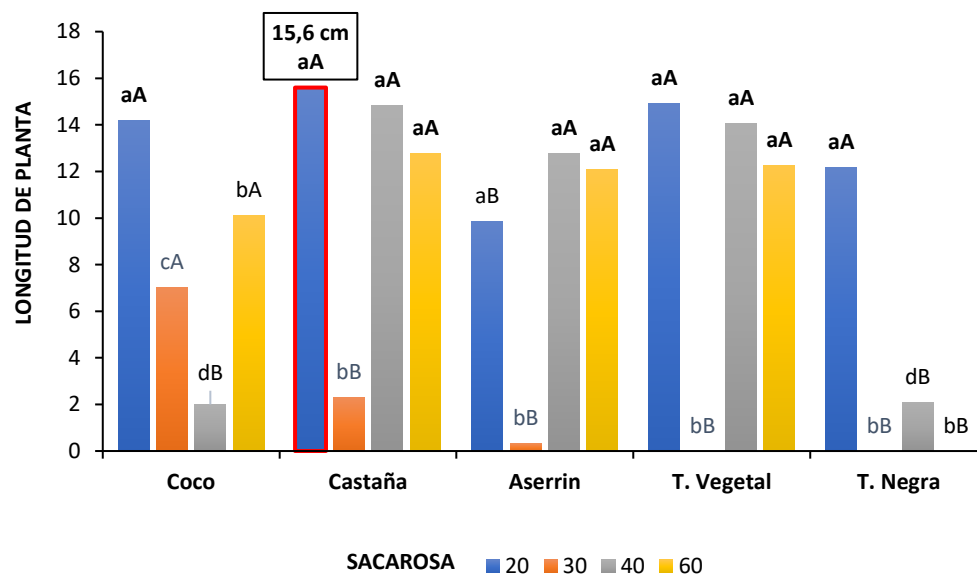
FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)			
	Longitud de planta	de Numero de hoja	de Longitud de raíz	Volumen de raíz
Sacarosa	36,29**	5,92**	7,54**	0,48**
Sustrato	10,06*	2,39*	3,14*	0,33**
Sacarosa * Sustrato	7,31**	1,26 ns	1,32**	0,11**
C.V. (%)	28,77	42,53	26,49	10,72

Notas: ^{ns} no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable longitud de planta se observa que existe interacción entre los explantes provenientes de la fase de enraizamiento bajo experimento con diferentes niveles de sacarosa y tipos de sustratos en fase de aclimatación, también se puede observar que los explantes provenientes con 20 grL^{-1} de sacarosa en combinación de sustrato de cascara de castaña muestra estadísticamente mayor elongación del explante (15,6cm) a comparación de todos los demás tratamientos. Así mismo se puede observar que los explantes enraizados con 20 grL^{-1} de sacarosa en combinación de sustrato fibra de coco muestra resultados favorables para la elongación de los explantes, siendo estadísticamente igual al mejor tratamiento (20 grL^{-1} de sacarosa con cascara de castaña). Figura 19

Figura 19

Variable de Longitud de planta en la fase de aclimatación ex vitro.

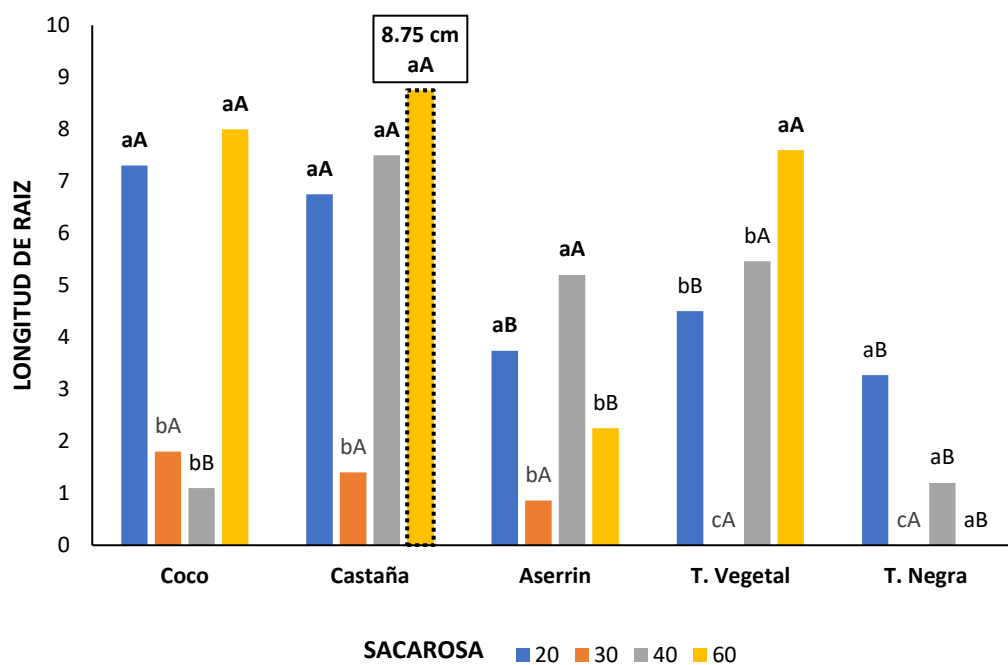


Fuente: Elaboración propia.

Para la variable longitud de raíz en la interacción entre los explantes provenientes de la fase de enraizamiento con diferentes niveles de sacarosa y tipo de sustrato para la fase de aclimatación, se observó que 60 grL⁻¹ de sacarosa en combinación de sustrato cascara de castaña, estadísticamente muestra mayor longitud de raíz (8,75cm). Así mismo, el nivel de sacarosa 60grL⁻¹ es la mejor concentración para mayor longitud de raíz independientemente del tipo de sustrato. De la misma manera se puede observar que la fibra de coco es estadísticamente igual al sustrato de cascara de castaña para el desarrollo de longitud de raíz. Figura 20

Figura 20

Variable de Longitud de raíz de explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación *ex vitro*.

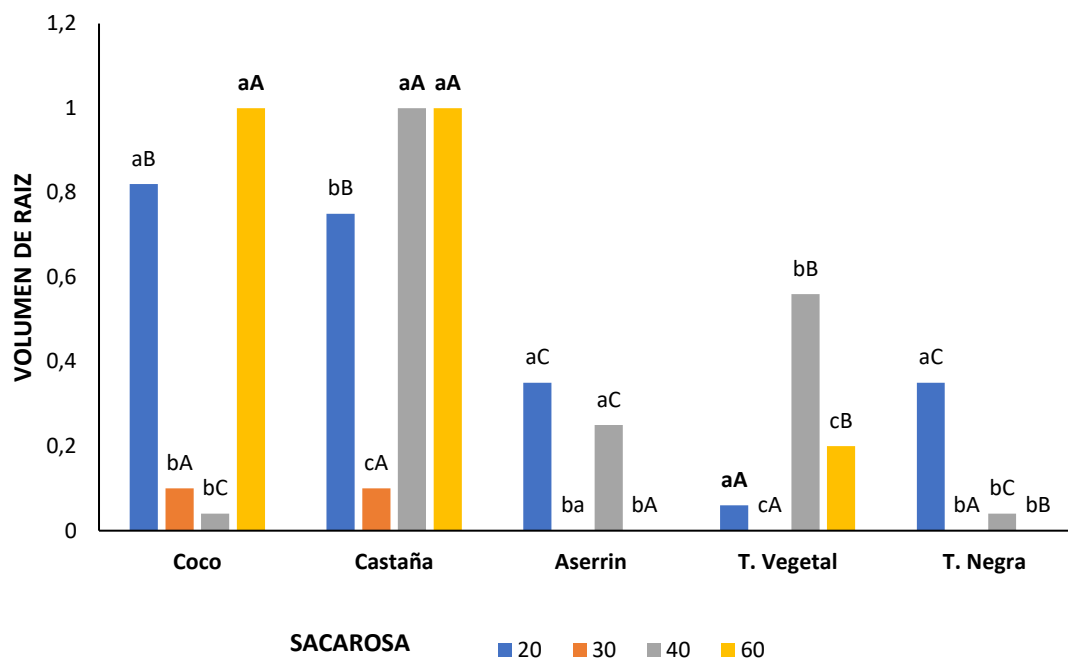


Fuente: Elaboración propia.

Para la variable volumen de raíz los explantes enraizados en concentración de 60gr/ L⁻¹ sacarosa en combinación con los sustratos cascara de castaña y fibra de coco obtuvieron mejores resultados. Así mismo se puede observar en el grafico que estadísticamente los explantes enraizados con 40gr L⁻¹ de sacarosa en combinación de cascara de castaña es igual al mejor tratamiento Figura 21.

Figura 21

Variable Volumen de raíz de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en fase aclimatación *ex vitro*.

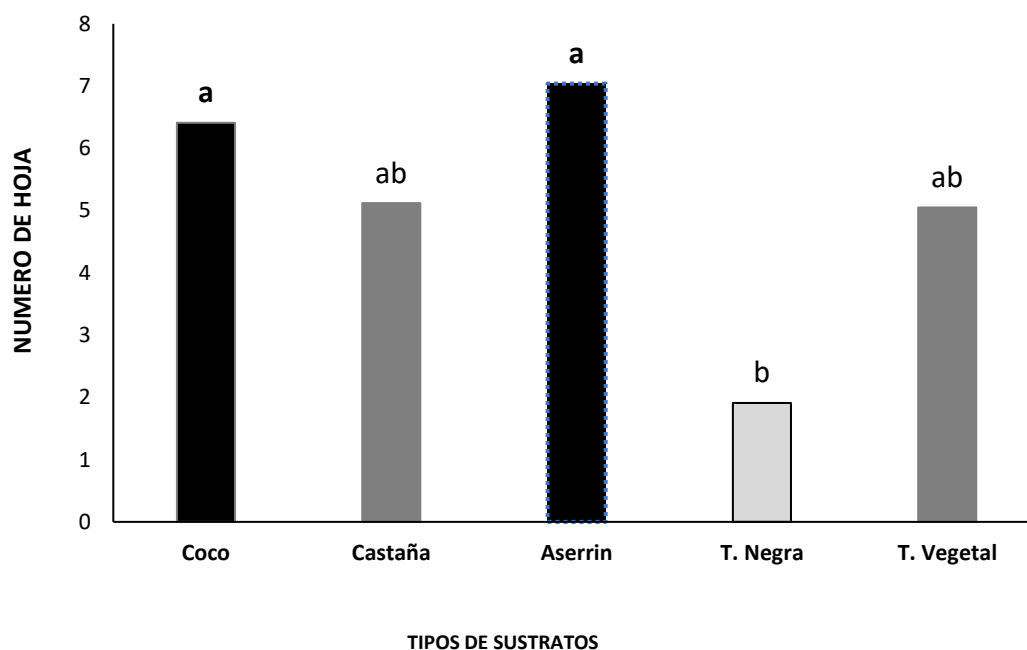


Fuente. Elaboración propia.

En la variable independiente número de hojas en fase de aclimatación *ex vitro* en función de tipos de sustrato, podemos observar que con el sustrato de Aserrín se obtuvo mayor número de hojas (7.04), seguido del sustrato fibra de coco (6.41) Figura 22.

Figura 22

Variable independiente de Numero de hoja en fase de aclimatación *ex vitro* en función de tipos de sustrato.

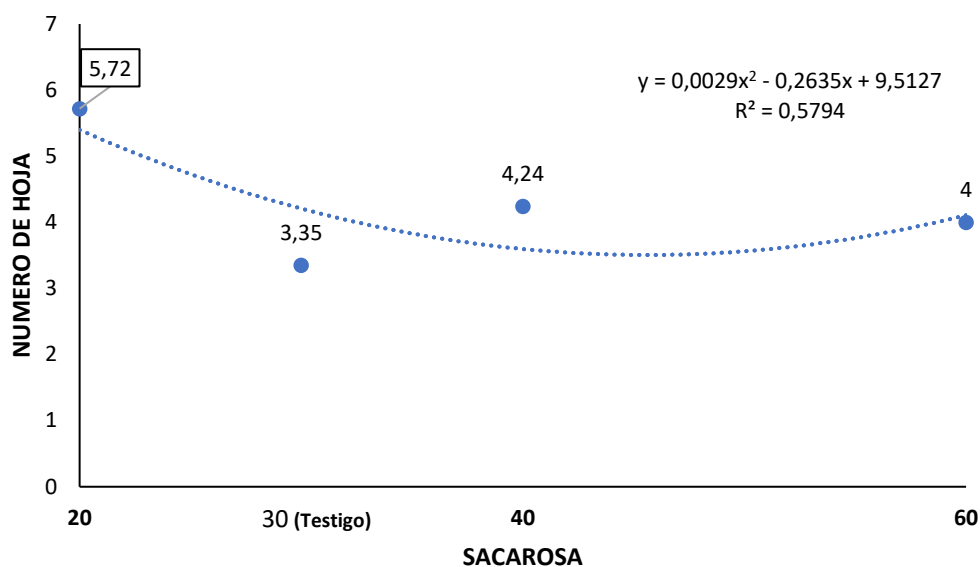


Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente número de hojas en la fase de aclimatación *ex vitro* de orquídea (*Orquidacea*), en función del nivel de concentración de sacarosa de los explantes provenientes de la fase de enraizamiento, se observó que 20grL^{-1} de sacarosa promueve mayor número de hojas en la fase de aclimatación *ex vitro* estadísticamente (5,72) a diferencia de los otros tratamientos estadísticamente menores sin influir el tipo de sustrato. Figura 23.

Figura 23

Variable Número de hoja de los explantes provenientes de la fase de enraizamiento en función de nivel de sacarosa en la fase de aclimatación.



Fuente: Elaboración propia.

En el análisis de Varianza para la variable presencia de estomas en los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en la fase de aclimatación *ex vitro* se observa que hubo interacción entre los explantes de la fase de enraizamiento con diferentes niveles de sacarosa (20:30:40:60grL⁻¹) y tipos de sustrato (Fibra de coco: Cascara de castaña: Aserrín: Tierra vegetal: Tierra negra - testigo). Así mismo muestra que en las variables de estomas abiertos, estomas cerrados y número total de estomas se puede observar que el coeficiente de varianza (CV) es menor a 30 % esto quiere decir que el modelo estadístico es adecuado para la presente investigación. Tabla 10.

Tabla 10

Análisis de varianza para la variable presencia de estomas en los explantes de orquídeas (orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro en función de tipos de sustratos.

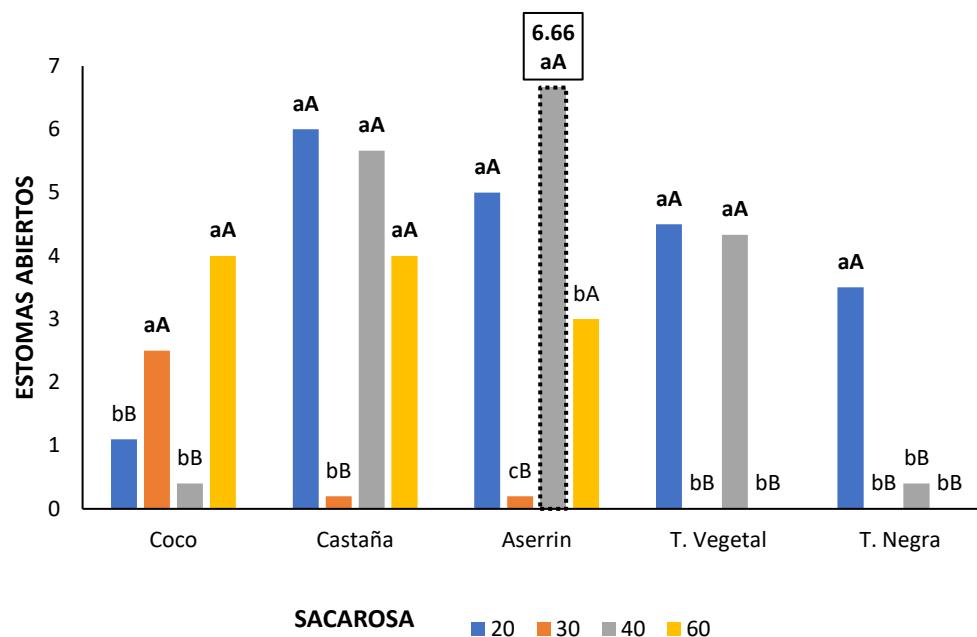
FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)		
	Estomas abiertos	Estomas cerrados	Total estomas
Sacarosa	5,53**	5,17**	11,41**
Sustrato	2,83*	5,60*	11,26*
Sacarosa * Sustrato	1,85**	2,89**	5,27**
C.V. (%)	23,06	27,64	23,59

Notas: ^{ns} no significativo ($p>0,01$); * significativo a 5% ($p<0,05$); ** significativo a 1% ($p<0,01$).

Para la variable independiente de número de estomas abiertos, se observa que estadísticamente los explantes enraizados con 40grL^{-1} de sacarosa en combinación de sustrato aserrín (6,66) se encontró mayor número de estomas abiertos en la fase de aclimatación, así mismo las concentraciones de 20grL^{-1} y 40grL^{-1} de sacarosa promovieron mayor apertura de estomas, independientemente del tipo de sustrato. Los niveles de sacarosa influyen en el número de estomas abiertos sin importar el tipo de sustrato Figura 24.

Figura 24

Variable de Estomas abiertos en los explantes de orquídea (*Orchidaceae*) en la fase de aclimatación *ex vitro*.

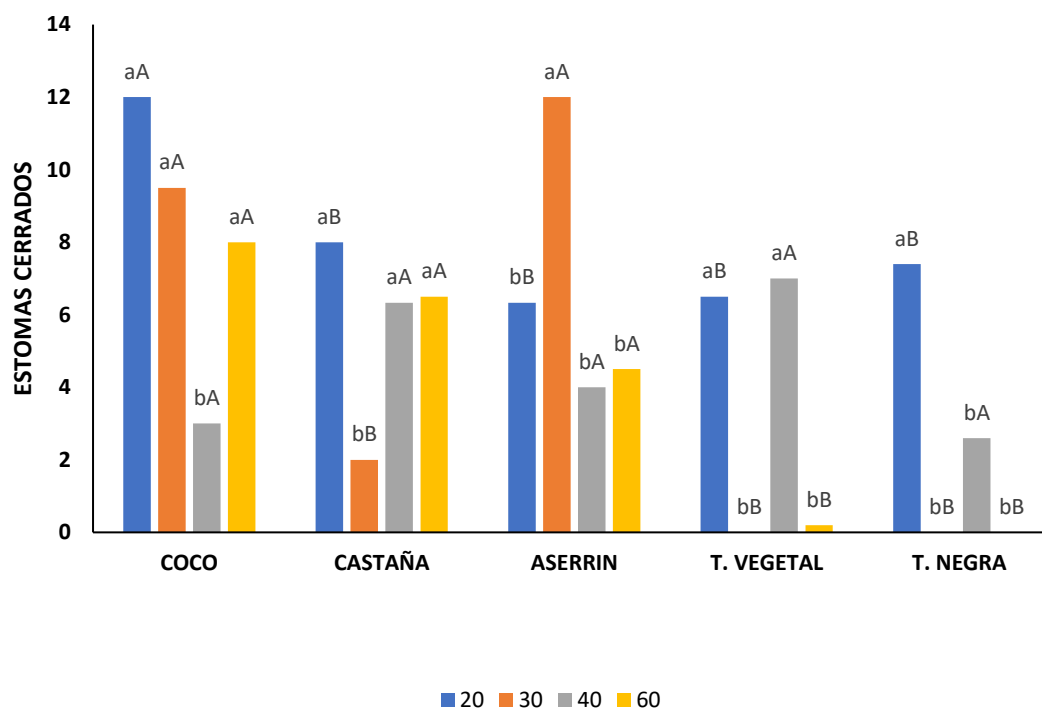


Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente número de estomas cerrados en los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en la fase de aclimatación *ex vitro* se observa que estadísticamente los explantes enraizados en las concentraciones de 30gr/L⁻¹ y 20 grL⁻¹ de sacarosa en combinación del sustrato Aserrín (12) y fibra de coco (12) respectivamente se observó mayor movimiento de estomas cerrados en la fase de aclimatación. Figura 25.

Figura 25

Variable de estomas cerrados en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación *ex vitro*.

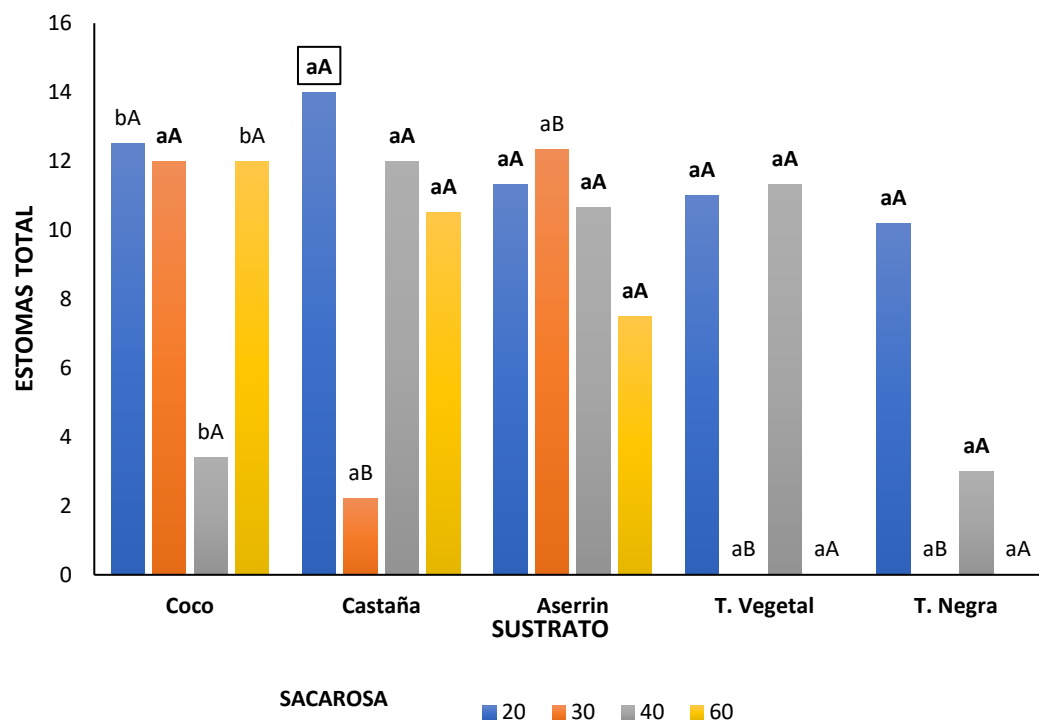


Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independientemente sobre la presencia del número total de estomas se observa que los explantes enraizados en concentraciones de 20 grL⁻¹ de sacarosa en combinación de cascara de castaña muestra mayor movimiento de estomas. Así mismo se observa que independientemente del tipo de sustrato, estadísticamente los explantes enraizados con 20 grL⁻¹ de sacarosa son tratamientos que muestran mejor resultado. Figura 26.

Figura 26

Variable de Número total de estomas en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación *ex vitro*.



Fuente: Elaboración propia.

En el análisis de Varianza de contenido de agua en la fase de aclimatación *ex vitro* muestra que no existe interacción entre explantes provenientes de la fase de enraizamiento con diferentes concentraciones de sacarosa y tipos de sustrato, así mismo se puede observar que existe diferencia significativa en los independientes de explantes enraizados en diferentes concentraciones de sacarosa al $p < 0,01$ % y tipo de sustrato al $p < 0,05$ %, por otra parte se observa que el coeficiente de varianza (CV) está en el rango de 30% esto indica que el modelo estadístico es adecuado para la presente investigación. Tabla 11.

Tabla 11

Análisis de varianza para la variable del contenido de agua en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro en función de tipos de sustratos.

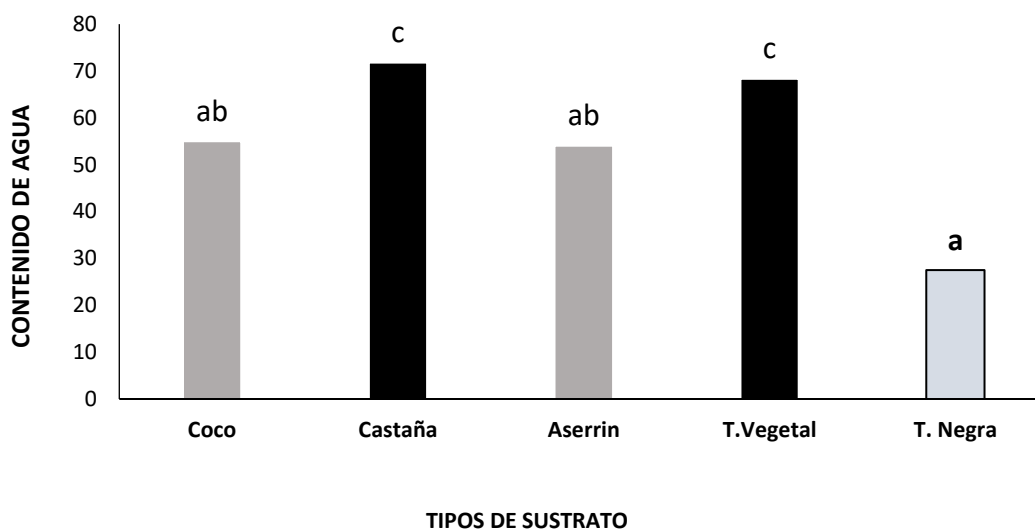
FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)
	Contenido de agua
Sacarosa	250,75**
Sustrato	105,12*
Sacarosa*Sustrato	2,74ns
C.V. (%)	33,26

Notas: ^{ns} no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable independiente de contenido de agua en los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en la fase de aclimatación *ex vitro* se observa que el sustrato tierra negra (Testigo) promueve menor contenido de agua para la aclimatación de explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) seguido del sustrato Aserrín y fibra de coco. Figura 27.

Figura 27

Variable del Contenido de agua en los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en la fase de aclimatación *ex vitro* en función del tipo de sustratos



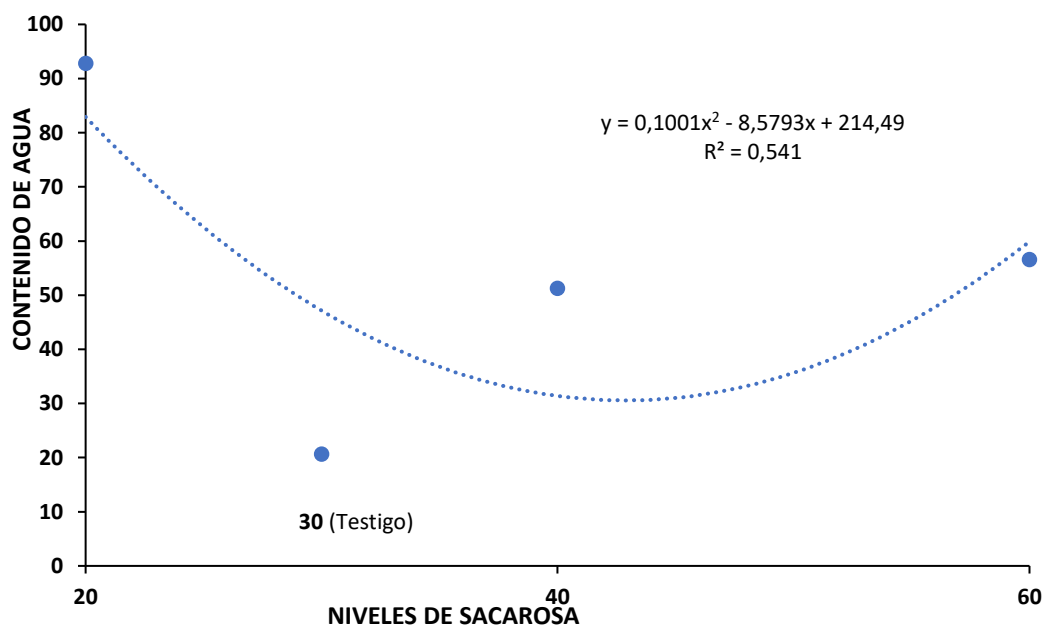
Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente contenido de agua en los explantes de orquídea (*Orchidaceae*) en la fase de aclimatación *ex vitro* en función del nivel de sacarosa (Fase de enraizamiento) se observa que con 30 grL^{-1} de sacarosa se promueve menor cantidad de agua en los explantes.

Figura 28.

Figura 28

Variable de Contenido de agua en los explantes de orquídea en la fase de aclimatación *ex vitro*, en función del nivel de sacarosa.



Fuente: Elaboración propia.

En el análisis de Varianza para pigmentación fotosintética de los explantes de orquídea (*Orchidaceae*) en la fase de aclimatación *ex vitro*, muestra que existe interacción en todas las variables (Clorofila a, Clorofila b y Carotenoides) así mismo se puede observar que el coeficiente de varianza (CV) se encuentra en un rango de 30% esto indica que el modelo estadístico es el adecuado para la presente investigación Tabla 12.

Tabla 12

Análisis de varianza para la pigmentación fotosintética de Clorofila en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro en función de tipos de sustratos.

FUENTES DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
Sacarosa	7,72**	2,7**	0,82**
Sustrato	2,1*	0,75*	0,26*
Sacarosa*Sustrato	1,84**	0,57**	0,26**
C.V. (%)	30,5	23,03	20,78

Notas: ^{ns} no significativo ($p>0,01$); * significativo a 5% ($p<0,05$); ** significativo a 1% ($p<0,01$).

Para las variables de pigmentos fotosintéticos, podemos observar que en la variable de clorofila a existe pigmento fotosintético en los explantes provenientes de la fase de enraizamiento en concentraciones de 40 grL^{-1} de sacarosa, en la variable de clorofila b se observa mayor movimiento de pigmento fotosintético con 20 grL^{-1} seguido de 40 gr/L^{-1} de sacarosa, y para la variable de carotenoides se puede observar que 20 grL^{-1} y 40 grL^{-1} de sacarosa promueve mayor pigmentación fotosintética, demostrando así que los explantes provenientes de la fase de enraizamiento con altos niveles de sacarosa son los que contienen mayor pigmentación fotosintética, así mismo los sustratos cascara de castaña y fibra de coco aportaron para el resultado del pigmento fotosintético en los explantes. Tabla 13.

Tabla 13

Variables de respuesta para pigmentos fotosintéticos en los explantes de orquídeas (Orchidaceae) en la fase de aclimatación ex vitro.

		VARIABLES DE RESPUESTA					
SACAROSA	SUSTRATO	Clorofila A		Clorofila B		Carotenoides	
20	<i>F. de coco</i>	3,28	Bb	2,02	AA	0,54	bB
	<i>Castaña</i>	7,05	AA	2,4	AA	1,69	AA
	<i>Aserrín</i>	4,67	aB	2,26	AA	0,94	aB
	<i>T. Vegetal</i>	4,51	aB	1,92	AA	1,12	aB
	<i>T. Negra</i>	4,03	aB	1,8	AA	0,88	aB
30	<i>F. de coco</i>	1,17	cA	0,45	bA	0,29	bA
	<i>Castaña</i>	0,98	bA	0,35	bA	0,25	bA
	<i>Aserrín</i>	1,38	bA	0,71	bA	0,27	bA
	<i>T. Vegetal</i>	0	bA	0	bA	0	bA
	<i>T. Negra</i>	0	bA	0	bA	0	bA
40	<i>F. de coco</i>	0	cC	0	bC	0	bB
	<i>Castaña</i>	3,49	bB	2,68	AA	0,33	bB
	<i>Aserrín</i>	5,33	AA	2,3	AA	1,13	AA
	<i>T. Vegetal</i>	6,85	AA	3,13	AA	1,53	AA
	<i>T. Negra</i>	2,35	aB	1,07	aB	0,47	aB
60	<i>F. de coco</i>	6,17	AA	2	AA	1,47	AA
	<i>Castaña</i>	2,25	bB	0,99	bB	0,5	bB
	<i>Aserrín</i>	1,45	bB	0,5	bB	0,38	bB
	<i>T. Vegetal</i>	6,85	AA	2,84	AA	1,44	AA
	<i>T. Negra</i>	0	bB	0	bB	0	bB

Nota*Valores con letras minúsculas son estadísticamente iguales por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Fuente: Elaboración propia.

5. DISCUSION.

La sacarosa es el carbohidrato más común utilizado para propagación en cultivos *in vitro* Segretin, (2006); Leifert et al.,(1995); Nicoloso et al., (2003) indican que, debido a la baja capacidad fotosintética de plantas cultivadas *in vitro*, estas requieren la adición de carbohidratos para satisfacer sus necesidades metabólicas, ya sea participando en la generación de energía o como fuente de esqueletos de carbono para varios procesos biosintéticos como el crecimiento y la diferenciación celular.

En el presente estudio se utilizó diferentes concentraciones de sacarosa para el crecimiento morfológico y fisiológico de explantes *in vitro* de orquídeas (*Orchidaceae*), Galiba & Erdei, (1986) indican que la concentración de sacarosa en el medio de cultivo es importante, porque contribuye en la formación de cloroplastos y en la inducción de brotes, las diferentes concentraciones de sacarosa pueden producir alteraciones en el desarrollo de las plantas, los cuales pueden afectar tanto su metabolismo como las condiciones osmóticas del medio. Sin embargo, Cardenas & Villegas, (2002) afirman que son muchos los investigadores que apuntan hacia la baja concentración de sacarosa para inducir el enraizamiento *in vitro*.

Assy-Bah et al., (1989) mencionan que las concentraciones entre 20 grL⁻¹ y 30 grL⁻¹ de sacarosa el crecimiento morfológico es lento en las especies ornamentales. Sin embargo, Marchat et al., (2007) menciona que la suplementación del medio de cultivo con 10 grL⁻¹ y 20 grL⁻¹ de sacarosa proporciona mayor crecimiento morfológico de los explantes en la fase de enraizamiento. En el presente experimento de investigación se observó mayor desarrollo morfológico aplicando 20 grL⁻¹ y 40 grL⁻¹ de sacarosa, esta cantidad de dosis promovió mayor longitud de explante (7,92 cm), y mayor número de hoja (4,76) en la fase de enraizamiento *in vitro*, tal como lo destaca Trigiano & Gray, (2011) que una concentración de 20-60 grL⁻¹ de sacarosa es comúnmente utilizado como

fuerza de carbono y energía para el desarrollo de las plantas. De igual manera, Grout & Millan, (1985); Wainwright & Scrace, (1995) señalan que las altas concentraciones de sacarosa incrementa la cantidad de carbohidratos almacenados en los brotes y aumenta también la energía disponible para plántulas con hojas formadas *in vitro* que actúan como órganos de reserva de carbohidratos que servirán para desarrollar hojas más eficientemente fotosintéticas, también afirman que la sacarosa tiene un efecto favorable sobre las plántulas durante el período de aclimatación.

Así mismo se pudo observar que la concentración de 40 grL^{-1} de sacarosa en el medio de cultivo durante la fase de enraizamiento demuestra un buen desarrollo morfológico en las variables número de hojas, y porcentaje de sobrevivencia de los explantes de orquídea, esta teoría coincide con lo manifestado por Olivera et al., (2000) que la concentración de 40 grL^{-1} de sacarosa en el medio de cultivo, en la fase de enraizamiento *in vitro* es adecuado, de tal manera que el incremento de su concentración mejora el desarrollo de los explantes. Los resultados alcanzados en esta investigación tienen relación con lo observado por Koroch et al., (2007) quienes mencionan que al incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de 0 a 45 grL^{-1} aumenta desarrollo de la especie ornamental. Asimismo, estos resultados coinciden con lo encontrado por Andrade & Lopez, (1994) y Olivera et al., (2000) quienes señalan que el incremento en la concentración de sacarosa causa un aumento en el número de hojas y longitud de explantes de otras especies ornamentales, tal como se pudo observar en los resultados de esta investigación.

Al respecto Franck et al., (2006) señalan que la sacarosa juega un papel fundamental en el mecanismo que media en el control de la regulación por disminución de la fotosíntesis provocando su caída. Según Abdelnour & Vicent, (1994) Mencionan que la fotosíntesis es el

proceso por el cual las plantas convierten el dióxido de carbono y agua en carbohidratos (Azúcares-Sacarosa), en el presente estudio se observó que el pigmento fotosintético aumenta en una aplicación de 40 grL^{-1} de sacarosa en clorofila B y Carotenoides. Vijay, (2017) señala que las plantas con poca luz (sombra) contienen más clorofila b por cloroplasto que clorofila a. Asimismo Merino & Hurtado, (1994) mencionan que la sacarosa es la fuente de carbono ampliamente usada en concentraciones de 2 a 3 %, sin embargo en las especies ornamentales se emplean concentraciones elevadas de 5 a 12 % ya que ayuda al proceso de la fotosíntesis; según los resultados obtenidos en la presente investigación (Fase de enraizamiento) muestra pigmentación fotosintética en la variable clorofila b en todos los niveles de sacarosa en combinación con tapa parafilm, sin embargo en la variable de carotenoides solo con las concentraciones más altas de sacarosa (30 grL^{-1} , 40 grL^{-1} y 60 grL^{-1}), independientemente del tipo de tapa. En cuanto al sistema de tapa en la presente investigación se experimentó con dos tipos de sellado (Tapa parafilm y tapa barbijo), con el sistema de tapa parafilm se obtuvo mayor número de sobrevivientes y mejor desarrollo morfológico los explantes (Número de hojas y altura de planta) y fisiológico. Iarema et al., (2012) indica que los sistemas de tapa o sellado de los recipientes o frascos de cultivos *in vitro*, que permiten un mayor intercambio gaseoso a través de la apertura parcial, favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas reduciendo la humedad relativa, evitando la acumulación de gases y aumentando la concentración del dióxido de carbono (CO_2) en el interior de los frascos. Tradicionalmente los envases para el cultivo *in vitro* son diseñados para prevenir la entrada de contaminantes, ocasionando una restricción en el intercambio gaseoso entre el interior y exterior del envase; este bajo intercambio disminuye la concentración de CO_2 en el frasco durante el fotoperíodo como resultado de la fijación del mismo por el cloroplasto de los tejidos fotosintéticos; la baja concentración de CO_2 ocasiona poca fotosíntesis neta *in vitro* Desjardins, (1995). La concentración de gases especialmente el CO_2 en

los envases, tiende a cambiar rápidamente en el tiempo, dependiendo de la tasa de ventilación del mismo y de otros factores (Niu & Kosai, 1997).

Los tipos de sellos más utilizados incluyen papel de aluminio, cubierta de acero inoxidable, cubierta de polipropileno, tapas de algodón, espuma de poliuretano, película de PVC (policloruro de vinilo), entre otros Saldanha et al., (2012); Riveiro et al., (2007); Gao et al., (2017) y Rodriguez et al, (2012).

En la presente investigación se experimentó con dos sistemas de tapas (Tapa barbijo y Tapa parafilm). El sistema de tapa barbijo promovió el intercambio gaseoso con mayor absorción de dióxido de carbono (CO₂) externo, aumentando la actividad fotosintética y generando condiciones que pueden favorecer el fotoautotrofismo, el sistema de tapa parafilm nos permitió observar la presencia de estomas no funcionales a causa del poco intercambio gaseoso y a consecuencia de esto también se observó una baja pigmentación fotosintética. De acuerdo a los resultados en esta etapa, el uso de film plástico (tapa Parafilm) como material de sellado de frascos de cultivo resultó ser lo más adecuado para la conservación en crecimiento y enraizamiento., en los envases sellados con envoltura plástica (Tapa parafilm) transparente los explantes presentan crecimiento irregular, alto porcentaje de vitrificación, así como, alta condensación debido a la alta humedad relativa dentro del envase, McClelland & Smith, (1990) indican que, como consecuencia de esta situación es evidente que existe una respuesta del crecimiento de las vitroplantas con relación al sellado. En estas condiciones, hay aumento del número de hojas, elongación del explante, el aumento de la actividad fotosintética y la prevención de trastornos morfofisiológicos Pinheiro et al., (2013). Además, se observa un aumento en el flujo de transpiración y la probabilidad de una mayor supervivencia de las plantas

en la fase de aclimatación, ya que mejoran el control de la transpiración (Nepomuceno et al., 2009).

En condiciones *in vitro* las plantas son autotróficas, y debido al tipo de sellado de la tapa del frasco, evita el intercambio gaseoso y aumenta la concentración de agua en el explante, de tal manera el tipo de cierre del frasco de cultivo afecta a la composición gaseosa interna Lentini et al., (2007) y al crecimiento de las plantas en el cultivo, como la elongación y proliferación de los brotes, el aumento del peso fresco y los procesos de degradación hiperhidráulica McClelland & Smith, (1990) los tejidos de plantas cultivadas *in vitro* producen compuestos gaseosos (dióxido de carbono (CO₂), etileno, etano, etanol y acetaldehído) que pueden acumularse en sistemas de cultivo semicerrados y cerrados (herméticos). (Kumar et al., 1998) menciona que el micro entorno gaseoso en particular, el tipo de cierre del frasco puede afectar fuertemente la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de los explantes Marino & Noferini, (2013), así como la fisiología y morfología de brotes Zobayed et al., (1999). En el presente trabajo de investigación se observó que en el tipo de sellado barbijo hubo mayor intercambio gaseoso a consecuencia se observó degradación hiperhidráulica causando la pérdida de explantes.

Según Sosa-Rodriguez et al., (2009) y Noe, (1996) mencionan que la regulación estomática efectiva de la transpiración que conduce a la estabilización del estatus de agua en las plantas, se afecta debido a la presencia de estomas no funcionales, la densidad estomática disminuye y su forma cambia de circular a elíptica, presentan células en empalizada más pequeñas y más espacios aéreos entre el mesófilo, hay ineficiencia de la fotosíntesis, y el mal funcionamiento del transporte hídrico. Según (Leifert et al., 1995). Menciona que en condiciones *in vitro* los explantes son heterotrófico del tejido vegetal, ya que la producción de energía y carbohidratos por fotosíntesis son bajas.

Según Wook et al., (2006) la luz y la respuesta morfológica de las plantas, las condiciones ambientales, como la humedad relativa, temperatura y la luz, comúnmente influyen el crecimiento y desarrollo de las plantas. La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. Entre estos factores, la calidad espectral de la luz afecta a la elongación del tallo, ramificación lateral, la extensión de la hoja y la pigmentación.

En la presente investigación para la fase de aclimatación *ex vitro* de los explantes de orquídea (Orchidaceae), se utilizó cinco tipos de sustratos orgánicos (Cáscara de castaña, fibra de coco, tierra vegetal, aserrín y tierra negra como testigo), demostrando que la cascara de castaña seguido de fibra de coco son los sustratos con aportes favorables en su desarrollo morfológico y fisiológico durante la aclimatación, ya que estos sustratos suministran a las raíces la cantidad necesaria de agua y el oxígeno suficiente para la respiración de las raíces, así como para la absorción de nutrientes. Los ejemplares con un buen desarrollo morfológico y fisiológico son los explantes provenientes de la fase de enraizamiento *in vitro* donde se experimentó diferentes concentraciones de sacarosa, siendo exitosos los niveles de 20 grL^{-1} y 40 grL^{-1} de sacarosa, en esta etapa de aclimatación se observó que conforme se incrementó la concentración de la misma, la apariencia de las plantas fue mejor. Esto coincide con los resultados obtenidos por Langford & Wainwright, (1987), quienes afirman que la sacarosa tiene un efecto favorable sobre las plántulas durante el período de aclimatación, el uso de sacarosa durante la micropropagación *in vitro* cumple como fuente de carbono.

Las condiciones *in vitro* consisten en una alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, baja concentración de CO_2 , altas concentraciones de azúcar (Sacarosa) como fuente de carbono, presencia de reguladores de crecimiento en el medio así como el uso de frascos cerrados para la

prevención de contaminación microbiana Pospisilová et al., (1999) y Hazarika, (2006), mientras que durante su trasplante al medio *ex vitro*, los explantes de orquídea deben adaptarse a diferentes condiciones ambientales tales como, baja humedad relativa, alta intensidad de luz, fluctuaciones de temperatura y estrés por ataque de patógenos. Por lo que la transferencia de las plantas obtenidas *in vitro* al ambiente externo debe realizarse de forma gradual para preparar a los explantes y así tolerar las nuevas condiciones y lograr una aclimatación exitosa.

Faria et al., (2000) menciona que las orquídeas al ser plantas epifitas (raíces aéreas) deben estar en un sustrato adecuado que les proporcione sostén y drenaje. El sustrato ideal para el cultivo de plantas ornamentales debería estar disponible en una gran cantidad y ser fácil de manejar, la selección y manejo adecuado de los sustratos durante la aclimatación son de gran importancia para obtener una mayor tasa de sobrevivencia y alta calidad de plantas (Quisen et al., 2013). Según Morales et al., (2013) la elección de un sustrato con buenas características físicas, es indispensable para el éxito de esta etapa de la aclimatación, para el trasplante, se debe elegir un sustrato suelto, poroso, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces, los sustratos se pueden utilizar solos o combinados, en esta fase de aclimatación se utilizaron los sustratos de forma independiente, destacando los tratamientos cascara de castaña y fibra de coco como los sustratos viables para la aclimatación de las orquídeas ya que ofreció mejores condiciones al explante en el desarrollo morfológico (Número de hojas, altura del explante, presencia de raíces, volumen de raíz) y fisiológico (Clorofila a, clorofila b, carotenoide y presencia de estomas abiertos y cerrados) este efecto está afirmado por Calderon & Cevallos, (2001) donde mencionan, que un buen sustrato debe ser retentivo de humedad, proveer de buena ventilación a raíces y ser inerte, al mismo tiempo dar disponibilidad de agua y nutrientes.

Generalmente durante la etapa de aclimatación, las plantas enraizadas *in vitro* son sembradas en mezclas de sustratos con buen drenaje y llevados a un invernadero bajo condiciones de alta humedad Trigiano & Gray, (2011) El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta Infoagro, (2007). En la presente investigación los explantes fueron trasplantados en diferentes tipos de sustrato y en envases de plástico, ya que el sustrato y los envases o macetas dentro de los cuales se van a trasplantar las plántulas *in vitro* son importantes para una mayor sobrevivencia, por lo tanto, el porcentaje de sobrevivencia de los explantes en la fase de aclimatación *ex vitro* depende de un protocolo que considere factores como el tipo de sustrato, y como resultado el sustrato de cascara de castaña y fibra de coco presentaron mayor desarrollo morfológico. La fibra de coco es uno de los sustratos que recomienda Dominguez et al., (1998) que de acuerdo a Solis, (2013) y Viveros Mogan, (2014), la fibra de coco otorga un excelente almacenamiento de humedad y facilita la aireación de la raíz de la planta. En el caso del sustrato cascara de castaña se obtuvo resultados favorables para el desarrollo morfológicos como lo mencionan (Jimenez et al., 2000) la cáscara de castaña es una alternativa de sustrato o componente de sustratos para el cultivo de plantas en contenedor, además indican que es un sustrato con potentes beneficios para los explantes, según su grado de descomposición.

Los explantes en condiciones *in vitro* son heterotróficas debido a las condiciones controladas en laboratorio, durante la aclimatación, los explantes deben pasar de una nutrición heterotrófica a una autotrófica bajo las nuevas condiciones *ex vitro* Valero-Arcama et al., (2008) y Kutas & Ogorodyk, (2015). Los explantes transferidos del medio *in vitro* al *ex vitro*, pasan por modificaciones graduales de anatomía foliar, morfología, y los estomas empiezan a funcionar (mecanismo de apertura y cierre). (Iliev et al., 2010)

El logro de la actividad de fotosíntesis durante la fase de aclimatación constituye una etapa decisiva en la adaptación a las condiciones naturales, de lo contrario ocurre la muerte de las plantas fundamentalmente por deshidratación. Los estudios acerca del comportamiento del sistema radical de las vitroplantas se han basado fundamentalmente en el análisis de la dinámica de crecimiento de las variables número de raíces, longitud de las raíces, masa fresca y seca Ortiz, (2000) y Ramirez, (2010) Por ello, la aclimatación es una etapa fundamental de la micropropagación (Hazarika, 2006).

Koch, (2004) menciona que la ruta y el sitio del metabolismo de la sacarosa en las plantas, son altamente sensibles a las señales internos y externos del ambiente por lo que se puede alterar el desarrollo y la aclimatación de las plantas y Morales, (2013) indica que algunas de las técnicas que se deben utilizar para modificar el ambiente externo son la reducción paulatina de la humedad relativa y el aumento gradual en la luminosidad.

La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis Jiang et al., (2015) y presenta funciones en el mantenimiento del potencial osmótico y además existen evidencias que sugieren que este azúcar participa como molécula señalizadora en conjunto con algunas hormonas vegetales en procesos metabólicos y de desarrollo de las plantas Rolland et al., (2006); Tognetti et al., (2013); Mason et al., (2014). Por otro lado, Gago et al., (2014) menciona que cuando la concentración de sacarosa es muy elevada, tiende a disminuir la capacidad fotosintética en la etapa *in vitro* y cuando las concentraciones de sacarosa son más bajas, se incrementa la capacidad fotosintética y con ello se reducen las anormalidades fisiológicas de las plantas *in vitro*, en el presente estudio se observó que los explantes que se encontraban con bajas concentraciones de sacarosa permitieron mayor actividad fotosintética en la fase de aclimatación. La aclimatación es un periodo de

desarrollo transicional en el cual las plantas deben corregir las características anatómicas y fisiológicas causadas por la influencia de las condiciones *in vitro* (Ahuja, 1993).

En el presente experimento de investigación se observó más contenido de pigmentación fotosintética en la clorofila a y clorofila b en los explantes provenientes de la fase de enraizamiento en combinación de 20 g/L¹ y 40 g/L¹ de sacarosa, este resultado coincide con lo mencionado por Trigiano & Gray, (2011) que la concentración de 20-60 g L⁻¹ de sacarosa (un disacárido formado por d-glucosa y d-fructosa) es comúnmente utilizado como fuente de carbono y energía para el desarrollo de las plantas. El transporte de sacarosa a través del floema es esencial para la distribución de carbohidratos en las plantas y las células de las plantas producen carbohidratos mediante la fijación de dióxido de carbono durante la fotosíntesis Truernit, (2001). Los principales carbohidratos en cuanto a su importancia estructural y funcional en las plantas son la sacarosa, el almidón y la celulosa (Murphy, 2011).

En los resultados de la presente investigación muestra mayor número de estomas en los explantes de orquídea provenientes de la fase de enraizamiento, que se encontraban bajo experimento con diferentes niveles de sacarosa, resultando más viable 20 grL⁻¹ de sacarosa independientemente del tipo de sustrato, así mismo se observó mayor movimiento de estomas abiertos con 20 grL⁻¹ y 40 grL⁻¹ de sacarosa., los estomas se encuentran en órganos aéreos incluyendo hojas y se desarrollan gradualmente durante el crecimiento de órganos de tal manera que los órganos jóvenes presentan un menor número de estomas que un órgano maduro Vatén Y Bergmann, (2012). En el presente estudio se observó que en condiciones *in vitro* el movimiento de los estomas era menor y se encontraban en su mayoría cerrados, en la fase de aclimatación observamos lo contrario ya que existe mayor actividad estomática., Meister & Bolhar-Nordenkamp, (2003) indican que la frecuencia y disposición de los estomas en las hojas son específicos de órganos, y estos son

afectados por factores ambientales como la disponibilidad de agua, intensidad lumínica, temperatura y concentración de CO₂. La importancia de los estomas radica en que a través del poro estomático, las plantas intercambian CO₂, vapor de agua, y otros constituyentes con la atmosfera (Royer, 2001). Por lo tanto, presentan una función fundamental en el control de dos procesos importantes en las plantas: la fotosíntesis y la transpiración mediante el cierre y apertura del poro estomático (Willmer & Fricker, 1996). El grado de apertura del poro estomático es regulado por una compleja interacción entre condiciones ambientales externos y los factores internos de las plantas. Por ejemplo, Salisbury & Ross, (1992) indican que altas temperaturas (30-35° C) generalmente causan el cierre de estomas, el cual podría ser una respuesta indirecta al estrés hídrico. Por otra parte, Pham & Desikan, (2009) mencionan que en concentraciones bajas de CO₂, la apertura estomática tiende a incrementar, mientras que concentraciones altas resultan en el cierre de los estomas.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento llegamos a las siguientes conclusiones:

Las altas concentraciones de sacarosa proporcionan mayor característica de crecimiento morfológico de los explantes de orquídea (*Orchidaceae*) en la fase de enraizamiento *in vitro*.

Para los pigmentos fotosintéticos en condiciones *in vitro* promovió mayor pigmento fotosintético de clorofila B con tapa Parafilm y Carotenoides con tapa Barbijo y tapa parafilm.

La aplicación de 30 gL^{-1} de sacarosa en combinación de tapa barbijo reduce el contenido de agua en los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*), en la fase de enraizamiento.

Para mayor intercambio gaseoso en explantes de orquídea (*Orchidaceae*) en la fase de enraizamiento *in vitro*, el sistema de tapa barbijo fue óptimo.

La aplicación de 20 gL^{-1} de sacarosa en los explantes de orquídea (*Orchidaceae*) provenientes de la fase de enraizamiento *in vitro* en combinación de cascara de castaña para la fase de aclimatación promueve mayor longitud de explantes.

Las cantidades altas de sacarosa provenientes de la fase de enraizamiento *in vitro* para la fase de aclimatación de explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en combinación de cascara de castaña promueve mayor longitud y mayor volumen de raíz.

La utilización del sustrato de aserrín promueve mayor número de hojas, así mismo los explantes provenientes de la fase de enraizamiento con aplicación de 40 gL^{-1} de sacarosa en combinación de aserrín promueve mayor apertura de estomas en explantes de Orquídeas (*Orchidaceae*) en fase de aclimatación *ex vitro*.

El sustrato de tierra negra promueve menor contenido de agua en la aclimatación de orquídeas (*Orchidaceae*), así mismo muestra que independientemente del tipo de sustrato los explantes provenientes de la fase de enraizamiento con la aplicación de 30 gL^{-1} de sacarosa es el que menor cantidad de agua promueve.

Los explantes provenientes de la fase de enraizamiento *in vitro* con la aplicación de 20 gL^{-1} y 60 gL^{-1} de sacarosa en combinación de sustrato cascara de castaña y fibra de coco promueven mayor contenido de pigmento fotosintético (clorofila A; B; Carotenoides) en los explantes de orquídeas (*Orquidaceae*) en la fase de aclimatación.

7. RECOMENDACIONES

Para la propagación *in vitro* de orquídea en la fase de enraizamiento se recomienda hacer estudios de investigación, en el tipo de sellado, experimentando el sistema de tapa barbijo con diferentes diámetros para el intercambio gaseoso.

Se recomienda la aplicación de reguladores de crecimiento para la elongación de los explantes de orquídeas (*Orchidaceae*) en la fase de enraizamiento *in vitro*.

Para la aclimatación *ex vitro* de orquídeas (*Orchidaceae*) se recomienda investigaciones físico-químicas de los sustratos cascara de castaña y de fibra de coco.

Para la aclimatación de orquídeas (*Orchidaceae*) se recomienda hacer estudios de intercambio gaseoso en diferentes tiempos.

Se recomienda desarrollar una evaluación económica en la producción de plantas de orquídeas (*Orchidaceae*) de cultivos *in vitro* con sustratos orgánicos producidos en la región con fines de conservación y comercialización.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdelnour, A., & Vicent, J. (1994). Conceptos basicos del cultivo de tejidos vegetales. En A. A. Vicent. Costa Rica: CATIE.
- Ahuja, M. R. (1993). *Micropropagation of Woody plants*. (A. M.R., Ed.) Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers.
- Andrade, R., & Lopez, P. (1994). Propagacion in vitro de gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Memorias de 11° Congreso Latinoamericano de Genetica y XV Congreso de Fitogenetica*.
- Assy-Bah et al. (1989). En C. i. Nucifera), *Metode, revisee et simpliffee, d'obtention de plants de cocotier transferables au chaps* (Vol. 44, págs. 15 - 523). Oleagineux.
- Bures. (1997). Sustratos. En S. Bures, *Sustratos* (pág. 342). Madrid: Ediciones Aerotecnicas.
- Calderon, F., & Cevallos, F. (16 de Marzo de 2001). *Los sustratos*. Obtenido de <http://www.drcalderonlabs.com/index.html>
- Calderon, F., & Cevallos, F. (2001). *Los sustratos*. Recuperado el 08 de 09 de 2021, de Los sustratos: <http://www.drcalderonlabs.com/index.html> Calderón y Cevallos
- Cardenas, M., & Villegas, M. A. (2002). Potencial osmotico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagacion in vitro. En *M. Cardenas y M. A. Villegas* (págs. 25. 213-217). Mexico: Rev. Fitotec.
- Castellanos. (2018). Orquideas de Cun dinamarca: Conservacion y aprovechamiento sostenible. En C. C. Castellanos. Bogota , Colombia: Investiagcion agropecuaria Corpoica - Gobernacion de Cundinamarca.
- Cazorla, F. M. (2020). *Adecuacion y transferencia de un protocolo para la prevencion de enfermedades postcosecha en frutos de mango y aguacate*. Obtenido de Departamento de Microbiologia: <https://www.uma.es/departamento-de-microbiologia/info/57510/francisco-cazorla-lopez/>
- Desjardins, Y. (1995). *Photosynthesis in vitro- on the factors regulating CO2 assimilation in micropropagation systems*.
- Dominguez et al. (Septiembre de 1998). (redivia.gva.es, Ed.) Recuperado el 05 de 09 de 2021, de Google: http://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/7266/1998_Dom%C3%ADnguez_Comparaci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ecosiembra.com. (2011). *Ecosiembra.com*. Obtenido de Sustratos organicos: <https://www.google.com.bo/ecosiembra&source>
- Espejo , A., & Garcia, J. (2002). *Orquideas*. ztapalapa - México: Herbario AMO-UAM.
- Faria et al. (2000). Aplicacao dos fitoreguladores enraizadors em mudas de orquideas em diferentes concentracoes. En B. c. A. Faria, & M. A. (MATA) (Ed.). Londrina, Brasil.

- Fernandez, R. (23 de Junio de 2011). *Composicion de medios de cultivo*. Obtenido de Google académico: <https://es.scribd.com/doc/58589856/Composicion-Medios-deCultivo>)
- Fonteno, & et al. (2000). Procedures for determining physical properties of horticultural substrates using the NCSU porometer. En H. C. Fonteno W., *Procedures for determining physical properties of horticultural substrates using the NCSU porometer* (pág. 26). North Carolina: State University.
- Franck et al. (2006). Soluble Sugars mediate sink feedback down. En P. V. N. Franck, *Regulation of leaf Photosynthesis in field-grown coffea arabica* (págs. 517-525). Tree physiol.
- Freuler. (2006). Orquideas. En M. J. Freiler, *Orquideas*. Buenos Aires, Argentina: Albatros.
- Gago et al. (2014). *Modeling the effects of light and sucrose on in vitro propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology*. (J. L. Gago, M. Martinez-Nuñez, J. Landin, & Flexas & P.P. Gallego, Edits.) Plos One.
- Galiba, G., & Erdei, L. (1986). *Dependence of weat callus growth, diferentation and mineral content on carbohydrate suply* (Vol. 45). Plant Sci.
- Gao et al. (2017). *AgNO3 prevents the occurrence of hyperhydricity in Dianthus chinensis L. by enhancing water loss and antioxidant capacity. In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* (Vol. 53). (H. Gao, p. Xu, J. Li, H. Ji, L. Na, & X. Xia, Edits.)
- Gil et al. (2007). Reproducción y manejo de Orquideas. En T. B. V. Gil, & U. A. Chapingo (Ed.). México D C, Mexico.
- Girgebv. (1994). *Resumen del primer curso nacional de propagacion In Vitro de especies ornamentales*. Recuperado el 13 de Septiembre de 2021, de LABORATORIO DE GENETICA-UNIDAD DE CULTIVO DE TEJIDOS ORNAMENTALES-PERU: https://www.syngentaornamentales.co/sites/g/files/zhg1071/f/rotafolio_cartilla_1.pdf
- Gonzales, K. (2003). *Vol. 1 Orquideas de Costa Rica y su cultivo Cattleya y generos relacionados*. Costa Rica: Editorial LIL.
- google.com. (10 de 2020). *Propiedades fisicas y quimicas del asserin*. Obtenido de Googlee : <https://www.google.com.bo/propiedadesquimicasyfiscasdelaserrindemaderaforestal>
- Grattapaglia, D., & Machado, M. (1998). *Micropropagacion. Cultura de Tejidos y transformacion genetica de plantas*. (T. & Caldas, Ed.) Brasilia, Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria.
- Grout, B., & Millan, S. (1985). *Photosyntetic debelopment of micropropagated Strawberry plantlets following transplanting* (Vol. 55). Ann. Bot.
- Gutierrez et al. (1988). Manual de cultivo de Orquideas. En M. L. L. Gutiérrez. Lima, Lima, Peru.
- Hazarika, B. N. (2006). *Morphophysiological disorders in in vitro culture of plants*. (108 ed.). Scientia Horticulturae.
- Hurtado , M., & Merino, A. (2009). *Plants Tissue Culture*. Mexico.

- Iarema et al. (2012). Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. En L. Iarema, A. C. Cruz, C. W. Saldanha, L. L. Dias, E. J. Oliveira, R. F. Vieira, & W. C. Otoni. *Plant cell Tissue and Organ Culture*.
- Iliev I. et al. (2010). *Plant micropropagation*. (I. G. Iliev, Ed.) Wiley-Blackwell.: In M.R. Davey & P. Anthony. *Plant cell culture*. Singapore.
- Infoagro. (15 de Octubre de 2007). *Tipos de sustratos de cultivo*. . Obtenido de Infoagro Systems, S.L Madrid, España.: www.infoagro.com
- Investigadora Unidad de Biotecnología , I. (11 de 2019). *Propagacion de plantas por cultivo in vitro*. Obtenido de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34431273/Propagacion_de_plantas_por_cultivo_in_vitro.pdf
- Jiang et al. (2015). *Sucrose metabolism gene families and their biological functions*. (S. Y. Jiang, Ed.) *Scientific Reports*.
- Jimenez et al. (2000). *Caracterización de sustratos con cáscara de almendra para uso en cultivos ornamentales*. (R. Jimenez , M. J. Robles, M. T. Lao, & S. Jimenez, Edits.) *Acta. hort*.
- Koch, K. (2004). *Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development*. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Koroch et al. (2007). En R. J. A. R. koroch, *Micropropagation and acclimatization of Hedeoma multiflorum*. (págs. 213-217). *Plant cell, Tiss. Org. Cult*.
- Kromer et al. (Abril de 2007). *Diversidad y ecología de epífitas vasculares en bosques montanos primarios y secundarios de Bolivia*. Recuperado el 11 de 2019, de *Ecología en Bolivia*: <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1605-252820070004>
- Kumar et al. (1998). *Regulation of morphogenesis in plant-tissue culture by ethylene*. *In Vitro* (Vol. 34). (P. T. P. Kumar, Ed.) *Cell Dev. Biol Plant*.
- Kutas, E., & Ogorodyk, L. (2015). *Acclimatization results of micro-propagated plantlets*. *African Journal of Plant Science*.
- Lallana, V. H., & Barsanti, M. V. (16 de 10 de 2019). *CULTIVO IN-VITRO Y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE UN HÍBRIDO*. Obtenido de XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores.: http://www.fca.uner.edu.ar/files/investigacion/Publicaciones/AUGM/BARSANTI_UNER_2
- Landis et al. (1989). Containers growing media. En R. T. T. D. Landis, & F. S. Department of Agriculture (Ed.), *The Container Tree Nursery Manual* (Vol. 2, pág. 674). Washington D.C., U.S.: *Agric. Handbook*.
- Langford, P. J., & Wainwright, H. (1987). *Effects of sucrose concentration on the Photosyntetic ability of rose shoots in vitro*. *Ann Bot*.
- Leifert C. et al. (1995). En K. M. C leifert, *Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures*. (págs. 14 (2), 83-10). *Critical reviews in plant sciences*.

- Leifert et al. (1995). Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. En P. K. C. Leifert. Boca Raton: Critical Reviews in Plante Sciences.
- Lentini Z. et al. (2007). *Etylene generation and reversal of etylene effects durung development in vitro of rapid cycling Brassica campestris*. (Z. Lentini, H. Mussell, M. Mutschler, & E. Earle, Edits.) Plant Sci.
- Marchat et al. (2007). Echanges d'elements mineraux et carbones en culture in vitro p. caus du bananier. En C. T.-M. J. Marchat. Paris, Francia: Fruits.
- Marino, G., & Noferini, M. (2013). *Effect of the type of closure for culture bottles on micropropagation efficiency of apricot*. Sci Hort.
- Mason et al. (2014). *Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance*. (M. G. Mason, J. J. Ross, B. N. Babst, Wienclaw, & C. A. Beveridge, Edits.) Proceedings of the National Academy of Sciences.
- Matsunaga. (1997). En M. Matsunaga, *A industria da flor no mundo e o comercio internacional do brasil* (Vol. 3, págs. 1- 4). Sao Paulo , Sao Paulo, Brasil: Revista de Horticultura Ornamental.
- McClelland, M. T., & Smith, M. L. (1990). *Vassel type, closure, and explant orientation influence in vitro performance of five woody species*. (Vol. 25). Horticultura.
- McClelland, M., & Smith, M. (1990). *Vessel type, closure, and explant orientation influence in vitro performance of five woody species* (Vol. 25). HortScience.
- Meister, M. H., & Bolhar-Nordenkampf, H. R. (2003). *Stomata imprints. A new and quick metod to count stomata and epidermis cells*. In M.J. Reinoso-Roger. *Handbook of plant ecophysiology techniques*. United States of America: Kluwer Academic Publishers.
- Merino, M. E., & Hurtado, D. V. (1994). Medio de Cultivo. En M. M. V., *Cultivo de tejidos Vegetales* (págs. 67-84). Trillas, Mexico.
- Min-Wha Jeon, et al. (2005). *Efectos de densidad de flujo de fotones en la morfología, fotosíntesis y crecimiento de una orquídea Cam, doritaenopsis durante la aclimatación post-micropropagación*. (M. B.-J.-Y. Min-wha Jeon, Ed.) Cheong-ju: Chungbuk National University. Obtenido de Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology.
- Morales. (2013). *Aclimatization of Micropropagated `plants to the Greehouseand field* . Recuperado el 03 de 09 de 2021, de Micropropagation: Tecnology an Application. Kluwer Academic Publishers Dordrecht Pp 71-94 : http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-009-2075-0_5#page-1
- Morales et al. (2013). *Tecnology an application Kluwer Academic Plublishers*. Obtenido de Aclimatization of micropropagate plants to the greehouseand field: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-009-2075-0_5#page-1
- Murashige, T., & Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid grow than bioassays with tabacco tissue culture. En *Physiologia Plantarum* (págs. 473-497). Copenhagen.
- Murphy. (2011). *Plants biotechnology and agriculture*. UK. CABI Publishing.

- National Geographic en español. (12 de 08 de 2019). *¿Qué país cuenta con la mayor diversidad de orquídeas en el mundo?* Obtenido de Obtenido de National Geographic en español: <https://www.ngenespanol.com/dato-dia/que-pais-cuenta-con-la-mayor-diversidad-de-orquideas-en-e>
- Nepomuceno et al. (Mayo - Junio de 2009). Respostas morfofisiológicas in vitro de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. (C. F. Nepomuceno, A. P. Rios, S. O. Queiroz, C. R. Pelacani, & J. R. Santana, Edits.) *Revista Arvore*, 481- 490.
- Nicoloso et al. (2003). Efeito de concentracoes e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas in vitro. En C. A. F. Nicoloso, *Ciencia y Agrotecnologia* (Vol. 27, págs. 84-90). Brasil: Lavras.
- Niu, G., & Kosai, T. (1997). *Simulatition of CO2 concetration in the culture vassel and growth of plantlests in micropropagation*. (Vol. 467). Acta Hort.
- Noe N. , e. a. (1996). *Springer.com*. Obtenido de Leaf anatomy of high bush blueberry grow in vitro and during aclimatization ex vitro condition: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02879626>
- Olivera et al. (2000). En M. A. Victoria Z. Olivera Ortega, *Cultivo un vitro de Gerbera (Gerbera jamesonii H. Bolus) y su aclimatación en invernadero*. BIOAGRO. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=> <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=>
- Olivera et al. (2000). Cultivo in vitro de Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatacion en invernadero. En E. G. O.V.Z. Olivera. BIOAGRO.
- Ortiz R., e. a. (2000). *Google academic.com*. Obtenido de Factores que afectan el desarrollo de vitroplantas de caña de azucar en la fase adaptativa: http://ediciones.inca.edu.cu/files/folletos/factores_afectan.pdf
- Perez, M. A., & Castañeda. (16 de julio de 2016). *Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Obtenido de Obtenido de Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución: <http://www.micropropaciondeorquideas.pdf.com>
- Pham, J., & Desikan, R. (2009). *Signalling in stomata*. In L.A. del Río & A. Puppo. *Reactive oxygen species in plant signalling*. Heidelberg,: Springer-Verlag.
- Pierik, M. R. (1990). *Cultivos in vitro de las plantas superiores*. España: ediciones MUNDI.
- Pinheiro et al. (Febrero de 2013). Trocas gasosas influenciaram na morfogenese in vitro de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). (M. V. Pinheiro, F. B. Martins, A. Xavier, & W. C. Otoni, Edits.) *Revista Arvore*, 37(1), 19-29.
- Pontis, H., & Martínez, G. N. (18 de 01 de 2013). *Señalización de sacarosa en plantas*. Obtenido de Google académico: <https://www.tandfonline.com/doi/abs>
- Portalfruticola. (2020). *Sustratos Orgánicos* . Obtenido de www.portalfruticola.com: www.jardineriaon.com, blog.gardencenterejea.com
- Pospíšilová et al. (1999). *Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions*. (42 ed.). (J. I. Pospíšilová, Ed.) *Biologia Plantarum*.

- Probiotek P, 2. (2017). *Google académico*. Obtenido de Productos y equipos Biotecnologicos S.A de C.V:
<https://www.probiotek.com>
- Quisen et al. (2013). *Acclimatization of micropropagated plantlets of Heliconia Sexy Pink*. (R. M.-M. Quisen, Ed.) *Revista Ciencia Agraria*.
- Ramirez R., e. a. (2010). *Google.com*. Obtenido de Efecto del sustrato y fertiriego en el crecimiento inicial de vitroplantas de musa sp.:
http://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol8num2/N atyDes_Vol-8-2-Art3.pdf
- Repositorio Institucional Universitaria, A. (18 de 11 de 2018). *Extrategias para aumentar la exportacion de orquideas en Colombia y Ecuador segun las identificadas en holanda y tailandia*. Obtenido de Repositorio Institucional Universitaria Agustiana:
<http://Repositorio.uniagustiana.edu.co/handle/>
- Riveiro et al. (Julio de 2007). Concentrações de Sacarose e tipos de vedação no cultivo in vitro de *Melissa officinalis* L. (M. V. Riveiro, C. S. Lima, J. D. Bamdeira, S. Rubin, L. C. Benitez, J. A. Peters, & E. J. Braga, Edits.) *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2), 843-845.
- Rodriguez et al. (2012). *Effects of flask sealing and growth regulators on in vitro propagation of neem (Azadirachta indica A. Juss.)*. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. (M. Rodriguez, T. H. Costa, R. A. Festucci-Buselli, L. C. Silva, & W. C. Otoni, Edits.) Minas Gerais, Brasil.
- Rolland et al. (2006). *Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanism*. (F. Rolland, E. Baena-Gonzalez, & J. Sheen, Edits.) *Annual Review of Plant Biology*.
- Royer, D. L. (2001). *Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO2 concentration*. *Review of Palaeobotany and Palynology*.
- Saldanha et al. (2012). *low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen]*. (Vol. 110). (C. W. Saldanha, C. G. Otoni, J. L. Azevedo, L. L. Dias, M. M. Rego, & W. C. Otoni, Edits.) Brasil: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,.
- Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1992). *Plant physiology*. (4. Ed., Ed.) California.: Wadsworth Publishing Company.
- Segretin. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II. En M. Segretin, *Cultivos de células vegetales* (Vol. 1, págs. 1-6). Argentina: Biotecnología.
- Sheenhan, T. (1994). *An Illustrated survey of orchid genera*. Portland Oregon: Timber press.
- Silva. (1986). Cultivo de Orquideas no Brasil. En W. Silva, *Cultivo de Orquideas no Brasil* (pág. 96). Sao Paulo- Brasil: Nobel.
- Sociedad Colombiana de Orquideas, S. (1995). *Manual de cultivo de orquideas*. (4ta, Ed.) Impresiones Graficas Ltda.

- Solis, R. R. (2013). *Evaluación de sustratos para la propagación de la orquídea Dendrobium nobile L. por medio de pseudobulbos*. Veracruz - Mexico: tesis de grado - Facultad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y agropecuarias.
- Sosa-Rodriguez et al. (2009). *Scielo.com*. Obtenido de Propagacion in vitro de Heliconia : <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000400004&lng=es&nrm=iso>.T
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5ta ed.). USA: Sinauer Associates.
- Tognetti et al. (2013). *Sucrose signaling in plants*. (J. A. Tognetti, H. G. Points, & G. A. Martínez-Noel , Edits.) A world yet to be explored. *Plant Signalling & Behavior*.
- Tombolato, A., & Costa, A. (1998). Micropropagacion de plantas ornamentales. En A. T. Costa, *Micropropagacion de plantas ornamentales* (Vol. 174, págs. 1-72). Campiñas, Brasil: Boletín Tecnico.
- Torrez P.M. et al. (2010). *Cultivos in vitro del mortiño*. Obtenido de Avances en ciencias e ingeniería: http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo_de_contenidos/Documents/volumen_2/Avan ces_2010_vol2_B9-B15.pdf
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (2011). *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. United States of America.: CRC Press.
- Truernit, E. (2001). *Plant physiology: The importance of sucrose transporters*. *Current Biology*.
- Valero-arcama et al. (2008). *Comparative growth, morphology, and anatomy of easy-and difficult-to-acclimatize sea oats (Uniola paniculata) Genotypes during in vitro culture and ex vitro acclimatization*. (C. Valero-Arcama, C. M. Kane, & N. p. Wilson, Edits.) *Journal of the American Society for Horticultural Science*.
- Vargas, P. D. (2012). *ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO in vitro DE SEMILLAS DE Cattleya violacea*. Obtenido de Tesis de Grado: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug>
- Vasquez. (2004). *Orquideas en Bolivia*. Santa Cruz de la Sierra: FAN.
- Vasquez et al. (2004). En R. V. Ibsch, *Orquideas de Bolivia* (pág. 14). Santa Cruz de la Sierra: FAN.
- Vasquez, J. (15 de junio de 2005). *Aclimatacion de Plantulas (Orchidaceae) propagadas in vitro*. Obtenido de Google académico: <http://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle>
- Vasquez, P. J. (2005). *Aclimatacion de plantulas de Epidendrum schomburgkii (Orchidaceae) Propagadas in vitro*. Obtenido de Google académico: <http://Repositorio.unsm.edu.pe>
- Vijay, P. e. (2017).) *Manual of ICAR Sponsored Training Programme for Technical Staff of ICAR Institutes on "Physiological Techniques to Analyze the Impact of Climate Change on Crop Plants"*. (P. Vijay, P. Rakesh, & P. Mandan, Edits.) New Delhi, New Delhi, India: ICAR-Indian Agricultural Research Institute.
- Vilchez J., e. a. (2007). *Google.com*. Obtenido de Aclimatacion de vitroplantas de zabila (Aloe vera) y efectos del sustrato: http://revfacagronluz.org.ve/PDF/supl_mayo_2007/v24supl10.pdf

- Villasmil, M. (2008). *Google academico*. Obtenido de Uso de desechos Organicos compostados en mezclas para la produccion de dos plantas de temporada (Tesis) Maestria en Horticultura:
https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=M+Villasmil+-+2008+-+Tesis+de+Maestr%C3%ADa.+Postgrado+de+Uso+de+desechos+org%C3%A1nicos+compostados+en+mezclas+para+la+producci%C3%B3n+de+dos+plantas+de+temporada&btnG=
- Viveros Mogan. (2014). *youtube*. Recuperado el 05 de 09 de 2021, de ¿que es la fibra de coco?:
https://youtu.be/_BucGrISbK
- Wainwright, H., & Scrace, J. (1995). *Influence of in vitro preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on in vivo establishment* (Vol. 38). Sci. Hort.
- Willmer, C., & Fricker, M. (1996). *Stomata*. London: Chapman & Hall.
- Wook J. et al. (2006). *Influence of mixed Led radiation on the growth of annual*. (J. Wook, C. Lee, & K. paek, Edits.) Obtenido de Plants jurnal of plants Biology:
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF03031157>
- Zobayed S. et al. (1999). *Evaluation of a closed system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower in vitro*. (Vol. 59). (S. Zobayed, J. Armstrong, & W. Armtrong, Edits.) Plant Cell Tissue and Organ Cult.

ANEXOS

Figura 29

Ejemplares de la primera fase del experimento de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) in vitro después de ser evaluados con diferentes niveles de sacarosa y tapa Parafilm

**Figura 30**

Ejemplares de la primera fase del experimento de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) In Vitro después de ser evaluados con diferentes niveles de sacarosa en combinación de tapa Barbijo.

**Figura 31**

Muestra de resultados de las estomas en la fase in vitro, con sistema de tapa Parafilm en combinación de diferentes niveles de sacarosa.

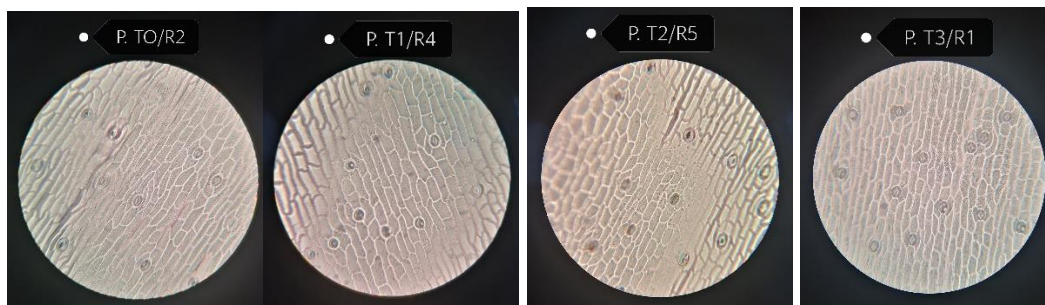
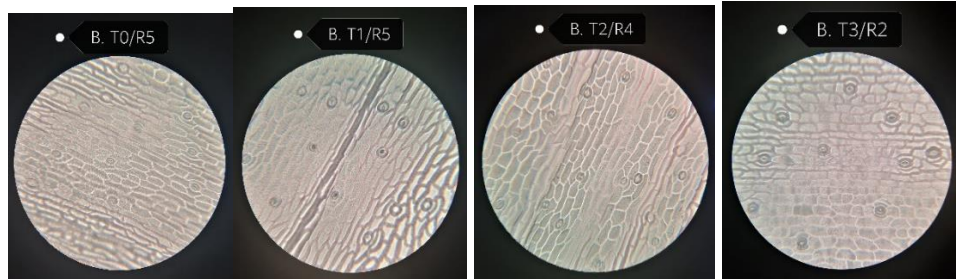
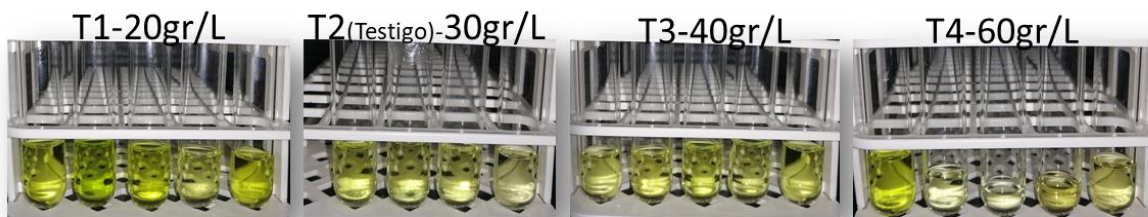


Figura 32

Muestra de resultados de las estomas en la fase in vitro, con sistema de tapa barbijo en combinación de diferentes niveles de sacarosa.

**Figura 33**

Resultados de la primera fase del experimento de pigmentación fotosintética de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) In Vitro con sistema tapa Barbijo en combinación de diferentes niveles de sacarosa.

**Figura 34**

Resultados de la primera fase del experimento de pigmentación fotosintética de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) In Vitro con sistema tapa Parafilm en combinación de diferentes niveles de sacarosa.

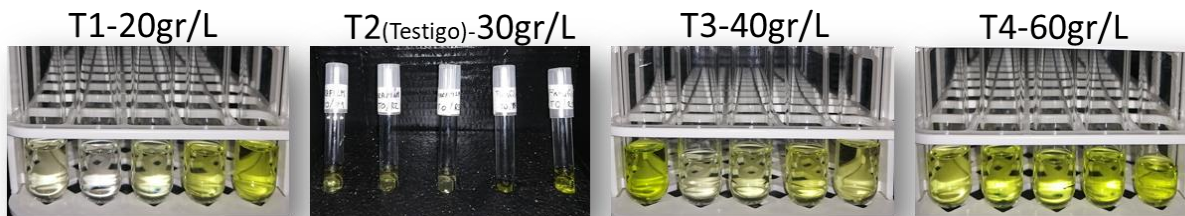


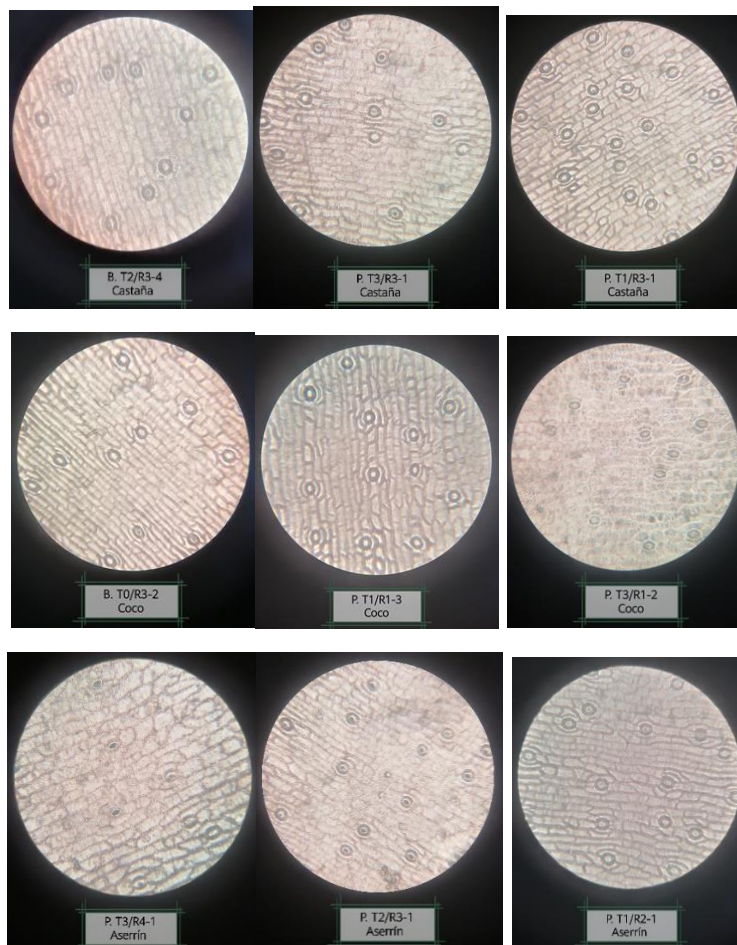
Figura 35

*Ejemplares de la segunda fase del experimento de los explantes de orquídeas (Orchidaceae)
Aclimatación Ex Vitro después de ser evaluados con diferentes tipos de sustratos.*



Figura 36

Muestra de resultados de las estomas en la fase ex vitro con diferentes tipos de sustratos, vistos desde un microscopio.



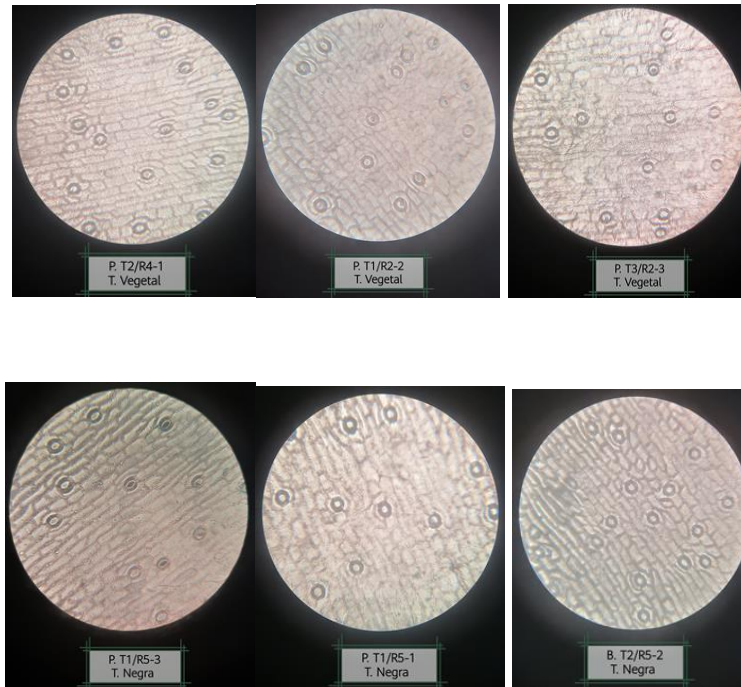


Figura 37

Resultados de la segunda fase el experimento de pigmentación fotosintética de los explantes de orquídeas (Orchidaceae) ex vitro con diferentes tipos de sustratos.

