

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACIÓN IN VITRO Y EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE *Phragmipedium kovachii*

Optimization of a culture medium for in vitro preservation
in vitro and establishment of a germoplase bank of phragmipedium kovachii

Wilmar Murrieta Vela¹ , Julio Alfonso Chía Wong² , Vicente Serapio Pocomucha Poma³ 

1. Ingeniero Agrónomo ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8501-3657>
Universidad Nacional de San Martín – San Martín – Perú Correo: wimuve2015@gmail.com.pe. Teléf.: 943469449
2. Dr. Julio Alfonso Chía Wong, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0947-9949>
Universidad Nacional Agraria de la Selva – Tingo María – Perú Correo: julio.chia@unas.edu.pe. Teléf.: 930235755
3. Dr. Vicente Serapio Pocomucha Poma, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1292-6583>. Universidad Nacional Agraria de la Selva – Tingo María – Perú Correo: vicente.pocomucha@gmail.com. Teléf.: 950631965

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue optimizar un medio de cultivo para conservación in vitro y el establecimiento de un banco de germoplasma de una orquídea utilizando un inhibidor (Manitol) con la finalidad de comparar tres medios de cultivo y evaluar diferentes parámetros fisiológicos y validar un protocolo integral de cultivo in vitro para *Phragmipedium kovachii*. El desarrollo del ensayo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín (UNSM), asegurando la conservación del germoplasma. Se optimizaron medios de cultivo y condiciones de crecimiento para mejorar la supervivencia, el desarrollo de explantes y el establecimiento de plántulas in vitro, contribuyendo a la creación de un banco de germoplasma. Se utilizó un DCA de 3 x 4, con 12 tratamientos por 10 repeticiones por tratamiento, donde se evaluaron diferentes medios de cultivo y la adición de manitol como inhibidor de crecimiento. El análisis estadístico reveló que el medio M&S fue el más adaptable, mostrando 0,94 cm de altura, 20 hojas en promedio, 1,78 cm de longitud de hojas, 1,38 tallos, 1,12 raíces y 0,86 cm de longitud de raíces por plántula. Hubo variaciones significativas en el crecimiento de las plántulas según el medio de cultivo y la concentración de manitol. El uso de manitol afectó el desarrollo vegetativo, con resultados diversos en los parámetros de crecimiento a lo largo del estudio. Este enfoque puede mejorar la conservación y cultivo de *Phragmipedium kovachii*, una

contribución importante para su preservación y estudio futuro.

Palabras clave: *Phragmipedium kovachii*, Murashige & Skoog, Gamborg, manitol.

ABSTRACT

The study focused on developing and validating a comprehensive in vitro culture protocol for *Phragmipedium kovachii*, ensuring germplasm conservation. Culture media and growth conditions were optimized to improve survival, explant development and in vitro seedling establishment, contributing to the creation of a germplasm bank. Different culture media and the addition of mannitol as a growth inhibitor were evaluated. Statistical analysis revealed that the M&S medium was the most adaptable, showing 0.94 cm height, 20 leaves on average, 1.78 cm leaf length, 1.38 stems, 1.12 roots and 0.86 cm root length per seedling. There were significant variations in seedling growth according to growth medium and mannitol concentration. The use of mannitol affected vegetative development, with varying results in growth parameters throughout the study. This approach may improve the conservation and cultivation of *Phragmipedium kovachii*, an important contribution to its preservation and future study.

Key words: *Phragmipedium kovachii*, Murashige & Skoog, Gamborg, manitol.

I. INTRODUCCIÓN

En Perú, las orquídeas constituyen una colección de plantas muy variada. Se cree que existen entre 2600 y 3000 especies en nuestro país. Además, a nivel mundial, la familia Orchidaceae es una de las familias de plantas con mayor diversidad, con aproximadamente 28000 especies, (Marín et al., 2020). Según (Alzate-Guarín et al., 2021) la familia Orchidaceae es difícil de categorizar y evaluar debido a la diversidad de especies que la componen, las cuales se presentan en una amplia gama de tamaños, formas y colores. Su gran susceptibilidad a los cambios ambientales, así como la calidad de su hábitat, contrastan con esta gran variedad. En términos de riqueza de especies, la familia Orchidaceae es una de las más importantes superada sólo por Asteraceae y Fabaceae, (Fortanelli-Martínez et al., 2021).

En cuanto a la última cuestión, la desaparición del hábitat del que dependen estas especies para sobrevivir puede ser uno de los mayores riesgos. La sobreexplotación es un problema claro, ya que el tremendo impacto de la explotación comercial de orquídeas en su hábitat ha llevado en algunos casos a la extinción de poblaciones enteras de la especie. Cascante-Marín & Hernández (2019), Realizaron un estudio donde se subraya la importancia de preservar la diversidad de orquídeas e identificar especies en peligro de extinción, subrayando la necesidad de realizar esfuerzos de conservación para salvaguardar su hábitat natural. Los anexos de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) incluyen a las orquídeas como consecuencia de ello.

Según Álvarez (2021), menciona la importancia de la simbiosis de las orquídeas con hongos en su entorno natural, destacando la fragilidad de estas plantas ante cambios en su hábitat. También Mastretta-Yanes et al. (2019) enfatizan la importancia de preservar y aprovechar la diversidad genética de las plantas cultivadas y sus contrapartes silvestres, enfatizando la relevancia de vincular la variación genética con estrategias de manejo para capitalizarla. Las especies de semilla, poco vigorosas, se encuentran en bancos de germoplasma in vitro, al respecto Soler & Valverde (2023), realizan un estudio donde se subraya el valor de los bancos de germoplasma y la propagación in vitro para la conservación genética y la preservación de especies amenazadas, el estudio analiza la aplicabilidad de diversos métodos para garantizar la supervivencia de especies vegetales, incluso de aquellas con semillas poco robustas.

Se presta especial atención a los cultivos que se propagan vegetativamente y son extremadamente

heterocigóticos, por lo que requieren la duplicación clonal para preservar su integridad genética. Por su enorme diversidad genética y gran importancia económica comercial, valoradas y queridas a nivel mundial por su variedad en tamaño, forma, color, aroma, y sin embargo sufren extracción descontrolada. Para crear un banco de germoplasma mediante la conservación in vitro, es necesario un medio de cultivo (Hernández-Mendoza et al., 2021). Estudios previos mencionan el valor de la duplicación clonal y la propagación vegetativa para mantener la integridad genética de las plantas, sobre todo en cultivos heterocigóticos y de propagación vegetativa e incide en que los agricultores propagan las plantas vegetativamente y que es fundamental crear nuevas variedades mediante la aplicación de métodos eficaces tanto de micropropagación como de inducción de mutaciones, además, la producción in vitro, destacan la importancia de las técnicas de cultivo para la conservación de orquídeas (Salgado & Peñaranda, 2019). En este contexto, el objetivo de la investigación fue optimizar un medio de cultivo para conservación in vitro y el establecimiento de un banco de germoplasma de *Phragmipedium kovachii*, (orquídea) utilizando un inhibidor (Manitol) y comparación de parámetros fisiológicos para validar un protocolo integral del cultivo in vitro.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del estudio.

El estudio se realizó en el distrito de Morales, provincia y región de San Martín en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto.

2.2. Materiales, equipos e instrumentos

En la presente investigación se han utilizados equipos como: aire acondicionado de 36 000 BTU, olla autoclave, destilador de agua, cámara de flujo laminar, incubadora, refrigeradora, peachimetro, balanza analítica; en materiales se han utilizado los siguientes: frascos de vidrio de 15 onzas, tubos de ensayo de 25 x 150 mm, matraz Erlenmeyer de 250 y 500 ml, placas Petri de 10 x 100 mm, pipetas de 1, 5, 10, y 25 ml, mechero, bisturí N° 10 y 11, espátula, pinza; en reactivos e insumos químicos se han utilizado los siguientes: sales minerales (macro y micronutrientes), hipoclorito de sodio al 5.25 %, alcohol de 96° , carbón activado, agar, manitol, tiamina, ácido nicotínico, agua destilada estéril.

2.3. Metodología

2.3.1. Componentes en estudio (medios de cultivo)

- a. Medio de cultivo M&S concentración total
- b. Medio de cultivo M&S media concentración
- c. Medio de cultivo de GAMBORG B5

2.3.2. Concentración de Manitol

- a. Concentración 0 g/l
- b. Concentración 10 g/l
- c. Concentración 20 g/l
- d. Concentración 30 g/l

2.4. Diseño estadístico

Un diseño completamente al azar (DCA) con permutaciones factoriales 3 x 4, donde el factor A es el tipo de medio (M & S total, M & S medio y solución Gamborg b5) y el factor "B" es la concentración de Manitol (0,10, 20 y 30 g/l). Se realizaron un total de 12 tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento, y cada repetición fue una unidad experimental (1 plántula de *Pragmipedium kovachii*), totalizando de 120 unidades experimentales (Tabla 4). Todos los datos se introdujeron en hojas de cálculo Excel y, a continuación, se sometieron a un análisis de la varianza (ANVA) y a una prueba de Tukey ($P < 0,05$) para comparar las medias. Para llevar a cabo esta investigación se utilizó el programa estadístico InfoStat. (versión 2012 Di Rienzo).

2.5. Obtención del material vegetal

El Instituto de Investigación Biológica de Las Cordilleras Orientales (INIBICO), especializado en la propagación de orquídeas y autorizado por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), proporcionó el material vegetal (plántulas). El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales sirvió de sede para el procedimiento de selección de plántulas. Las plántulas de *P. kovachii* se muestran en la Figura 5.

Figura 1

Plántula de P. kovachii sembradas



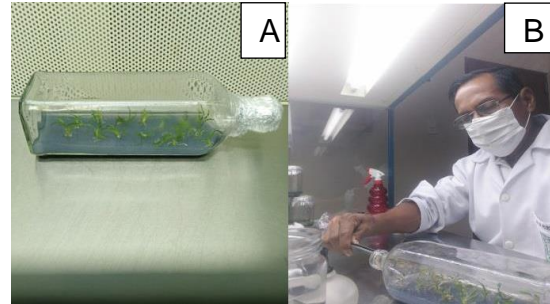
2.6. Extracción de las plántulas

En el Laboratorio (Área de siembra y transferencia) se procedió a extraer las plántulas de las botellas

sembradas uno por uno, para luego colocarlos en cada tubo de ensayo que le corresponde, para evitar contaminación la cámara de flujo laminar sirvió de escenario para el proceso en condiciones asépticas, luego se colocó en el área de incubación para seguir su proceso de desarrollo de la plántula.

Figura 2

Plántula de P. kovachii en botella A) Extracción de plántula B

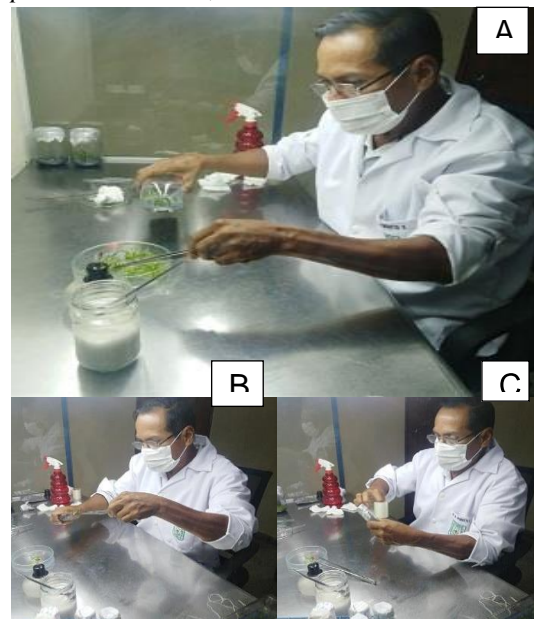


2.7. Siembra de plántulas

El proceso de siembra de las plántulas se realizó sacándolos de una botella donde estaban para colocarlos en una placa Petri estéril seleccionando a las mejores plantas, luego con una pinza desinfectada y estéril, se realizó la siembra, colocando una plántula en cada tubo de ensayo que contenían elementos nutritivos en estudio. Cada tubo fue sellado con papel, papel aluminio y tapado respectivo, rotulando los datos de siembra y, a continuación, se trasladan a la zona de incubación, que tiene controlada la iluminación, la humedad relativa y la temperatura, para luego iniciar la etapa de crecimiento, desarrollo y su conservación e iniciar con las evaluaciones respectivas.

Figura 3

Extracción de plántula de botella A; siembra de plántula en tubo B; sellado de tubo C



III. RESULTADOS

3.1. Parámetros evaluados durante el proceso de crecimiento *Phragmipedium kovachii*

3.1.1. Altura de planta

Los resultados del Análisis de Varianza (Tabla 1) para la altura de la planta de *P. kovachii* (cm) indican que los dos parámetros investigados (medio de cultivo y concentración de manitol) así como su interacción, mostraron diferencias altamente significativas.

Tabla 1

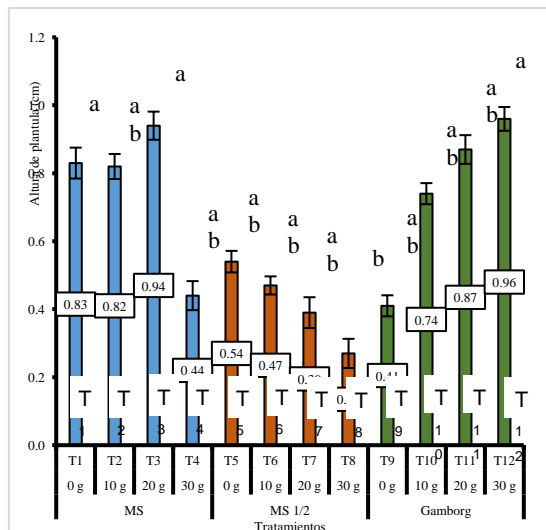
ANVA de la altura de plántulas (cm) de *P. kovachii*, durante el desarrollo vegetativo

F.V.	Gl	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	2,35	1,18	10,26	<0,0001**
Con. De Manitol	3	0,59	0,2	1,72	0,0083**
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	2,39	0,4	3,47	0,0036**
Error	108	12,39	0,11		
Total	119	17,72			

**= Altamente Significativo
 $R^2 = 89\%$ C.V.= 8,3% $\bar{x} = 1 \text{ cm}$

Figura 4

Prueba de Tikey ($p < 0,01$), para la altura de planta (cm) de *P. kovachii*, evaluados a los 165 días después de la siembra (DDS) bajo condiciones de laboratorio



3.1.2. Número de hojas

El coeficiente de correlación y la variabilidad dentro del rango aceptable apoyan las diferencias altamente significativas encontradas en

la prueba de varianza (Tabla 2) para el número de hojas de *P. kovachii* tanto para el medio de cultivo como para la concentración de manitol en estudio, así como su interacción. Calzada (1970).

Tabla 2

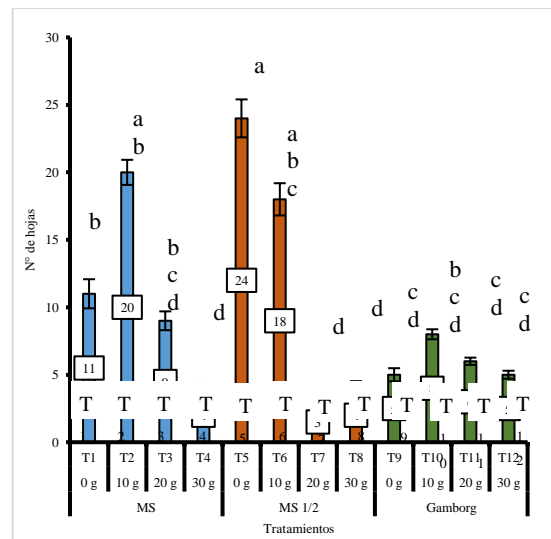
ANVA del número de hojas de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo

F.V.	Gl	SC	CM	F	p-valor
Medio de cultivo	2	872,52	436,267,42		<0,0001**
Con. De Manitol	3	2602,49	867,5	14,75	<0,0001**
Medio de cultivo, Con. De manitol	6	2098,88	349,815,95		<0,0001**
Error	108	6351,1	58,81		
Total	119	11924,99			

** = Altamente Significativo
 $R^2 = 87\%$ C.V.= 7,72% $\bar{x} = 10 \text{ hojas}$

Figura 5

La prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de hojas de *P. kovachii*, evaluados a 165 días posteriormente de la siembra (DDS) en laboratorio.



3.1.3. Longitud de hojas

La prueba de varianza (Tabla 3) para la longitud de la hoja de *P. kovachii* (cm) demuestra diferencias altamente significativas para las dos variables (concentración de manitol y medio de cultivo), así como su interacción. Esto se ve corroborado por la variabilidad y el coeficiente de correlación, que se encontraban dentro de un rango aceptable Calzada (1970).

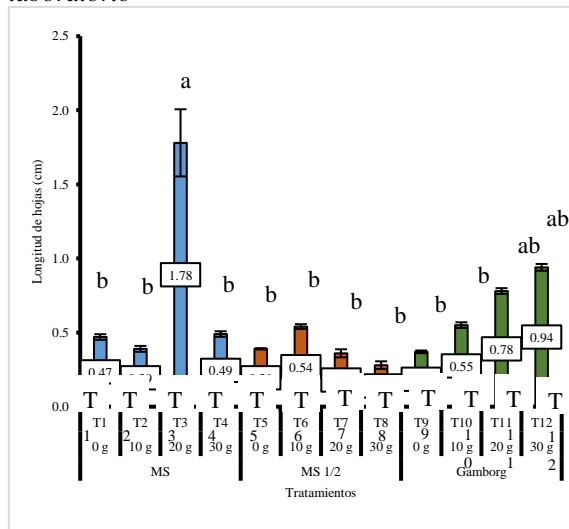
Tabla 3
ANVA de la longitud de hojas de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo

F.V.	Gl	SC	CM F	p-valor
Medio cultivo	de ₂	0,99	0,49 8,11	0,0005**
Con. Manitol	De ₃	0,92	0,31 5,04	0,0026**
Medio cultivo, Con. De manitol	de 6	2,09	0,35 5,72	<0,0001**
Error	108	6,58	0,06	
Total	119	10,57		

**= Altamente Significativo

R²= 88% C.V.= 4,15% \bar{x} = 1cm

Figura 6
Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la longitud de hojas (cm) de *P. kovachii*, evaluados a 165 días posteriormente de la siembra (DDS) en laboratorio



3.1.4. Número de tallos

El análisis de varianza (Tabla 4) para el número de tallos de *Phragmipedium kovachii* revela que hubo diferencias altamente significativas para los dos factores investigados (concentración de manitol y medio de cultivo); sin embargo, no hubo diferencias significativas en la interacción de ambos factores, lo que indica que los dos factores no estaban relacionados entre sí y que cada uno producía independientemente los resultados que necesitaba, como lo corroboran el rango aceptable de variabilidad y el coeficiente de correlación. Calzada (1970).

Tabla 4
ANVA del número de tallos de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo

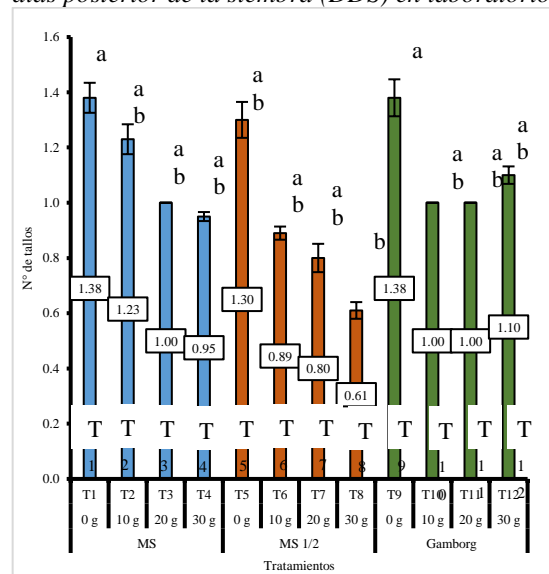
F.V.	Gl	SC	CM F	p-valor
Medio cultivo	de ₂	0,49	0,24 6,61	0,002**

Con. Manitol	De ₃	0,79	0,26 7,17	0,0002**
Medio cultivo, Con. De manitol	de ₆	0,23	0,04 1,06	0,3938 ns
Error	108	3,98	0,04	
Total	119	5,5		

** = Altamente Significativo ns = No Significativo

R²= 65% C.V.= 9,15% \bar{x} = 1 tallo

Figura 7
Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de tallos de plantas de *P. kovachii*, evaluados a 165 días posterior de la siembra (DDS) en laboratorio



3.1.5. Número de raíces

El número de raíces de *P. kovachii* fue objeto de un análisis de varianza (Tabla 5), que reveló diferencias altamente significativas tanto para los dos factores (concentración de manitol y medio de cultivo) como para la interacción de ambos factores y esto se corrobora con el coeficiente de correlación y variabilidad que se sitúa en un intervalo aceptable Calzada (1970).

Tabla 5
ANVA del número de raíces de *Phragmipedium kovachii*, durante el desarrollo vegetativo.

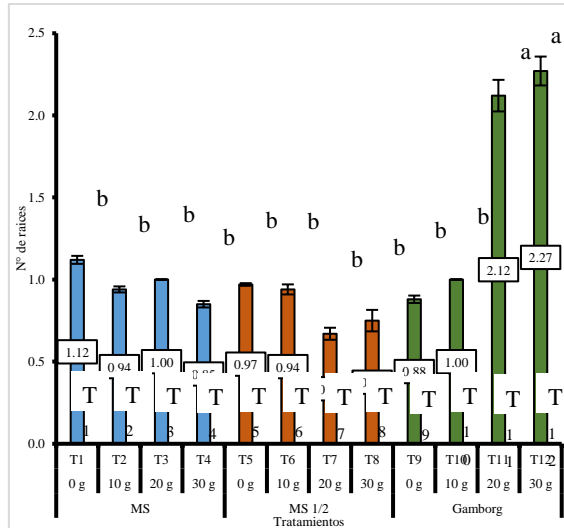
F.V.	Gl	SC	CM F	p-valor
Medio cultivo	de ₂	12.23	6.1228.84	<0.0001**
Con. Manitol	De ₃	2.76	0.924.33	0.0063**
Medio cultivo, Con. De manitol	de ₆	14.15	2.3611.12	<0.0001**
Error	108	22.9	0.21	
Total	119	52.03		

** = Altamente Significativo

R²= 89% C.V= 9.14% \bar{x} = 1 raíz

Figura 8

Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para el número de raíces en plántulas de *P. kovachii*, evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) en laboratorio



3.1.6. Longitud de raíces

La prueba de Varianza, realizado en la longitud de raíz en plántulas de *p. kovachii*, indica que hubo diferencias altamente significativas para los dos factores en estudio (Medio de cultivo y Concentración de Manitol), así como también, se mostraron diferencias altamente significativas en la interacción de ambos factores, corroborándose con el coeficiente de correlación y variabilidad que estuvieron dentro del rango aceptable Calzada (1970).

Tabla 6

ANVA de la longitud de raíces de *P. kovachii*, durante el desarrollo vegetativo

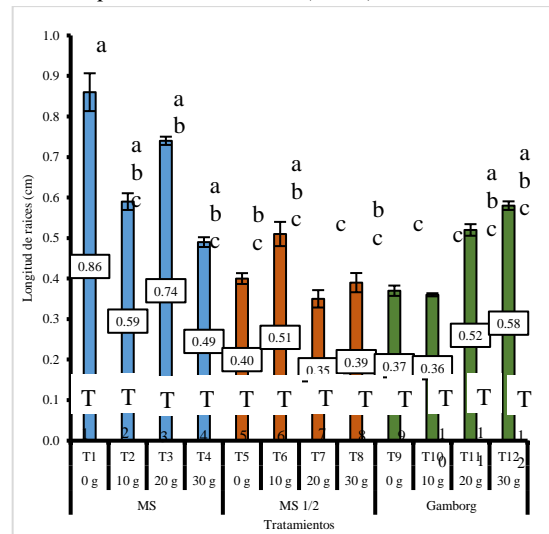
F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Medio cultivo	de2	0,72	0,36	20,56	<0,0001**
Con. Manitol	De3	0,02	0,01	4,47	0,005**
Medio cultivo, Con. De manitol	de6	0,53	0,09	5,02	<0,0001**
Error	108	1,9	0,02		
Total	119	3,18			

** = Altamente significativo

R² = 84 % C.V = 8.03 % \bar{x} = 1 cm

Figura 9

Prueba de Tukey ($p < 0,01$), para la longitud de raíz en plántulas de *P. kovachii*, evaluados a 165 días después de la siembra (DDS) en laboratorio



IV. DISCUSIONES

Se midió la altura de las plantas (Figura 4) utilizando medio de cultivo a media concentración con el tratamiento 8, que ha inhibido el crecimiento, con el fin de determinar los parámetros evaluados durante el proceso de crecimiento y desarrollo de los explantes en el proceso de optimización de los medios de cultivo para la conservación in vitro de *Phragmipedium kovachii*. (Kang et al., 2020), examinaron la propagación in vitro de la orquídea *Gastrochilus matsuran*, enfatizando el valor de la micropropagación de orquídeas en ambientes controlados propagación vitro, enfatizando el valor de la micropropagación de orquídeas en ambientes controlados todo corrobora estos hallazgos con una comparación de dos formulaciones nutritivas del medio de cultivo para la micropropagación de *Prosthechea crassilabia* Poepp & Endl, *Sobralia setigera* Poepp & Endl, y *Epidendrum macrocarpum* Rich en condiciones de cultivo in vitro.

Las formulaciones fueron M&S modificada más agua de coco y M&S modificada más plátano verde, y el control fue M&S, en la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco (UNSAAC), donde obtuvo una mayor altura de planta para la especie *Epidendrum macrocarpum* con 1,17 cm. Seguidamente *Sobralia setigera* con 0.68 cm de tamaño y finalmente *Prosthechea crassilabia* con un promedio de 0.47cm promedio/plántula a los 273 días. En este aspecto, el manitol solo inhibió el crecimiento de las plántulas del tratamiento MS a media concentración.

Ruíz (2021), respalda la relevancia de la micropropagación in vitro de la orquídea *Phragmipedium kovachii*, lo que puede ser fundamental para la conservación y propagación de esta especie de orquídea en particular. Salgado & Peñaranda (2019), Realizan un estudio donde se demuestra cómo el método práctico que ofrecen las técnicas de cultivo in vitro para la multiplicación de especies de orquídeas contribuye a garantizar su conservación y producción a largo plazo.

Estos resultados son comparables a los de Bello-Bello *et al.* (2015), quienes examinaron los efectos de dos osmóticos, manitol y polietilenglicol (PEG), a cuatro concentraciones diferentes (0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹) y cuatro valores diferentes (10, 20 y 30 g L⁻¹). Los efectos de dos inhibidores del crecimiento vegetal sobre la supervivencia y el crecimiento in vitro de las plantas de *V. planifolia* son el paclobutrazol (PAC) y el ácido abscísico (ABA).

Para el número de hojas (Figura 5) de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que los tratamientos 4, 7, y 8 (T₄: MS-T, con 30 g de manitol, T₇: MS ½, con 20 g de manitol y T₈: con 30 g de manitol), obtuvieron menor número de hojas con promedio de 4, 3 y 4 hojas respectivamente evaluado a los 165 DDS. La aplicación de manitol retardo el crecimiento de manera significativa en los tratamientos, ya que la reacción fue inversamente negativa (a mayor concentración de azúcares menor número de hojas. (Tostado *et al.*, 2020), realizaron una investigación para estudiar el impacto de la aplicación de Levase (mosto de caña de azúcar) en el rendimiento y calidad del Agave Tequilana Weber.

El estudio no menciona específicamente el manitol, pero ofrece información pertinente sobre cómo sustancias químicas específicas pueden afectar el crecimiento y la nutrición de las plantas. El número de hojas estuvo relacionado con la altura de cada plántula por tratamiento, teniendo en cuenta que los mejores tratamientos se dieron en el medio MS- T y media concentración; esto se debe a que no hubo diferencia entre el medio MS normal con el MS a media concentración, ya que la adición del inhibidor de crecimiento (Manitol) influyó en este indicador.

La prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) para la longitud de hojas de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que el tratamiento T₁, T₂, T₄ (M&S-T + 0 g, 10 g, 30 g de manitol); T₅, T₇, T₈ (M&S 1/2 + 0 g, 20 g, 30 g de manitol) y T₉ (GAMBORG B5 + 0 g de manitol), obtuvieron un retraso en la longitud de hojas con los promedios de 0,47, 0,39, 0,49, 0,39, 0,36, 0,28, 0,37 cm, respectivamente. Según estos resultados, el MS-T retardó la longitud de 10 plántulas en promedio;

mientras que los demás tratamientos presentaron valores mayores en longitud de hojas, siendo de manera general los tratamientos con MS a media concentración los que tuvieron menor longitud de hojas (0,35 cm en promedio), todo esto a los 165 DDS, la aplicación de manitol no influyó significativamente en los tratamientos. Cerna *et al.*, (2014), estudiaron la conservación de orquídeas, en el laboratorio de biotecnología vegetal donde determinaron que, refrigerando las semillas a 4 °C, más oscuridad es el método más eficaz de conservación de semillas; como lo indica la prueba de viabilidad de tetrazolio al 1% contando las semillas teñidas bajo un microscopio.

Para el número de tallos de plantas de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que el tratamiento 8 (M&S ½ con 30 g de manitol) obtuvo el menor número de tallos con promedio de 0,61 tallos. Los resultados, muestran que los medios de cultivo utilizados influyeron en la adición de azúcares (manitol) afectando el retardo del mayor número de tallos por plántula; sin embargo, los demás tratamientos en estudio estuvieron relativamente equidistantes, ya que la diferencia entre cada uno no fue estadísticamente diferente entre sí (1 tallo en promedio para los tratamientos con M&S; 0,7 tallos en promedio para los tratamientos con MS a media concentración y 1 tallo en promedio para los tratamientos con Gamborg), todo esto a los 165 DDS; al mismo tiempo que la aplicación de manitol no influyó significativamente en los demás tratamientos.

Las investigaciones indican que el tipo de sustrato utilizado puede influir en gran medida en el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, en las orquídeas, la inclusión de azúcares como el manitol podría aumentar el crecimiento de los tallos por plántula, (Jiménez-Peña *et al.*, 2019).

Estos resultados son semejantes a los que reportó Flores (2019), en donde comparó M&S (1962) modificado enriquecido con agua de coco (MS AC) y M&S (1962) modificado enriquecido con banano verde (MS PL) y control (MS) dos fórmulas dietéticas *Prostechea crassilabia* Poepp & Endl, *Sobralia* Micropropagación de especies de orquídeas *setigera* Poepp & Endl y *Epidendrum macrocarpum*, condiciones de cultivo in vitro ricas en semillas. Entre las excrecencias de las 3 especies estudiadas, la epidermis del fruto grande fue la especie con mayor rendimiento de datos morfológicos.

Para el número de raíces en plántulas de *Phragmipedium kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que el tratamiento 7 (M&S ½ + 20 g de manitol) obtuvo el menor número de raíces con un promedio de 0,67.

Contrariamente con los demás tratamientos estudiados quienes no mostraron diferencias significativas entre sí (1 raíz en los tratamientos con M&S, 1 raíz en los tratamientos con MS a media concentración), determinando que el medio Gamborg ejerce cierta influencia sobre las plántulas de *Phragmipedium. kovachii*, siempre y cuando estén con concentración de azúcares (manitol), ya que, en estos tratamientos (Gamborg) se está demostrando que a mayor concentración de manitol existe mayor número de raíces, todo esto a los 165 DDS, la aplicación de manitol no influyó significativamente en los tratamientos. Kalimuthu et al., (2006) obtuvo un protocolo de propagación para *Oncidium sp*; y detalló la importancia de utilizar reguladores de crecimiento en las etapas de germinación, producción de protocormos, propagación de brotes y etapas de raíz de alto índice de aptitud. Todos estos estudios demostraron que el uso de medios es muy importante para el desarrollo vegetativo de los trasplantes de plantas de orquídeas, especialmente por la composición de sus raíces.

Para la longitud de raíces en plántulas (Figura 9) de *P. kovachii*, evaluando diferentes concentraciones de manitol y medios de cultivo, muestra que los tratamientos T₅ y T₇ (M&S ½ + 0 g y 0,20 g con adición de manitol) y T₉ y T₁₀ (Gamborg + 0 g, 10 g de manitol) obtuvieron menor longitud de raíces respectivamente, en comparación de los demás tratamientos del mismo medio de cultivo, los cuales estuvieron en promedio a 0.6 cm (sin diferencias significativas entre sí). A su vez, se muestra que los niveles más altos de la longitud de raíces lo mostraron los tratamientos 1; 3 y 12, con 0,86 cm, 0,74 cm y 0.58 cm respectivamente. La inclusión de azúcares (manitol) en estos tratamientos no tuvo ningún efecto sobre el sustrato de crecimiento utilizado para apoyar el desarrollo de las plántulas de *P. kovachii* a 165 DDS.

Bello-Bello et al. (2015) examinaron los efectos de cuatro concentraciones de dos agentes osmóticos, manitol y polietilenglicol (PEG), y cuatro concentraciones de dos inhibidores del crecimiento vegetal, ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC), sobre la duración y el desarrollo in vitro de plantas de *V. planifolia*, las pruebas de comparación estadística fueron comparables a sus resultados. En donde cultivaron brotes en medio de cultivo M&S. Teniendo como resultados evaluados a los 180 días, los valores de las variables de crecimiento evaluadas in vitro fueron menores cuando se incrementó la concentración de agentes osmóticos e inhibidores en el medio de cultivo. El tratamiento con PAC mantuvo el 100% de duración de los brotes. Por lo tanto, el compuesto causó anomalías en la parte superior y las raíces de las plantas in vitro. Para ABA, los brotes presentaron cantidades más bajas en todas las variables

evaluadas y una supervivencia del 90% cuando se aplicó 3 mg L⁻¹. Estos resultados permiten desarrollar una técnica de protección in vitro a mediano plazo para *V. planifolia* que extiende el tiempo entre pases cada 180 días sin afectar la viabilidad y el fenotipo de la planta.

V. CONCLUSIONES

Las plántulas de orquídea, *Phragmipedium kovachii* mostraron diferencias significativas en el crecimiento morfológico al emplear tres tipos de medio de cultivo para los tratamientos utilizados. La aplicación de azúcares (manitol) en las cuatro concentraciones (0 g 10 g, 20 g y 30 g) inhibió en algunos tratamientos el desarrollo vegetativo de plántulas de *Phragmipedium. Kovachii*.

El desarrollo vegetativo de *Phragmipedium. kovachii* se diferenció durante los 165 Días Después de la Siembra (DDS), teniendo excelentes resultados para los parámetros de número de hojas, longitud de hojas y número de raíces, en la aplicación de inhibidor (manitol). Se recomienda hacer bancos de germoplasma para conservar estas especies y seguir realizando otras investigaciones.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, C. C. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación in vitro de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (orchidaceae). *Biotecnia*, 23(1), 5-12. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.805>
- Alzate-Guarín, F., Cano, D., Ortiz, R. (2021). Estado de conservación de las especies de plantas angiospermas de los páramos de Antioquia. *Acta Biológica Colombiana*, 27(2), 177-185. <https://doi.org/10.15446/abc.v27n2.89521>
- Bello-Bello, J., García-García, G., & Iglesias-Andreu, L. (2015). Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento in vitro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(2), 165-171. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v38n2/v38n2a6.pdf>
- Calzada, J. (1970). *Métodos estadísticos para la Investigación* (3ª ed.). Editorial Jurídica
- Cascante-Marín, A. & Hernández, C. (2019). Diversidad y vulnerabilidad de la flora orquideológica de un bosque montano nuboso del valle central de Costa Rica. *Lankesteriana*, 19(1), 31-55. <https://doi.org/10.15517/lank.v19i1.37031>

- Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. (2014). Colección de germoplasma de especies de la familia *Orchidaceae* del cantón Santiago de Méndez-Morona Santiago. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 20(2), 5-19. DOI: 10.17163.lgr.n20.2014.01
- Fortanelli-Martínez, J., Salazar, G., Castillo-Lara, P., García-Pérez, J., Alfaro-Medina, C., Castillo-Gómez, H., Ramírez-Palomeque, T., Morales-De la Torre, J. & De-Nova, J. (2021). *Orchidaceae* de San Luis Potosí, México: riqueza y distribución. *Botanical Sciences*, 100(1), 223-246. <https://doi.org/10.17129/botsoci.2875>
- Hernández-Mendoza, F., Carrillo-Castañeda, G., García-Gaytán, V., Pedraza-Santos, M., Cruz-Torres, E. & Mendoza-Castillo, M^a. (2021). Regeneración *in vitro* de plantas de *Polianthes tuberosa* L. a partir de tejido foliar y de botón floral. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.3621>
- Jiménez-Peña, N., Sandoval-Villa, M., Volke-Haller, V., Pedraza-Santos, M., & Colinas-León, M^a. (2019). La solución nutritiva modifica el crecimiento de dos especies de orquídeas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(4), 419-427. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.4.419-427>
- Kang, H., Kang, K., Kim, D. H., & Sivanesan, I. (2020). In vitro propagation of *Gastrochilus matusuran* (makino) schltr., an endangered epiphytic orchid. *Plants*, 9(4), 1-10. <https://doi.org/10.3390/plants9040524>
- Kalimuthu, K., Senthilkumar, R. & Vijayakumar, S. (2006). *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnology*, 6(10), pp. 1171-1174. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57383>
- López Flores, M., Sánchez, T., & Jauregui, D. (2019). Cultivo in-vitro y crioconservación de polineos del género *Epidendrum* en la provincia de Imbabura. *Revista Amazónica. Ciencia y Tecnología*, 8(2), 169-179. <https://doi.org/10.59410/racyt-v08n02ep08-0117>
- Mastretta-Yanes, A., Bellon, M., Acevedo, F., Burgeff, C. & Sarukhán, J. (2019). Un programa para México de conservación y uso de la diversidad genética de las plantas domesticadas y sus parientes silvestres. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(4), 321-334. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.4.321-334>
- Marín, L., Pessoa, E., & Alves, M. (2020). Lista comentada de orchidaceae en Uruguay y su distribución en ambientes y ecoregiones. *Lankesteriana*, 20(3), 359-394. <https://doi.org/10.15517/lank.v20i3.45193>
- Pérez, A. B. (2020). Efecto de la aplicación de levasa (mosto de caña de azúcar) en la producción y calidad de *Agave Tequilana* Weber. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1311-1324. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2216>
- Ruíz, M. (2021). Micropropagación de *phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61. <https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.99>
- Salgado, J. & Peñaranda, L. (2019). Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción *in-vitro* de orquídeas. *Revista Colombiana De Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 17-28. <https://doi.org/10.23850/24220582.1815>
- Soler, C. & Valverde, A. (2023). El análisis seminal en la agricultura de precisión en el siglo XXI. *Agronomía Mesoamericana*, 34(2), 4-19. <https://doi.org/10.15517/am.v34i2.51957>