

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
**Estimación de costos de producción de micropropagación a partir de
meristemas de la orquídea *Rhyncholaelia digbyana* (Lindl.) Schltr.**

Estudiante

Isabella Dennisse Viteri García

Asesoras

Cinthya Martínez, MAE.

María Alexandra Bravo, M. Sc.

Honduras, julio de 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos.....	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos	14
Fuente de Material Vegetal	14
Extracción y Desinfección de Meristemas / Preparación	14
Medio de Cultivo: Etapa I - Establecimiento.....	16
Medio de Cultivo: Etapa II - Multiplicación.....	17
Medio de Cultivo: Etapa III - Enraizamiento	18
Incubación de Meristemas	19
Etapa de Aclimatación	19
Estimación de Costos	20
Resultados y Discusión.....	21
Conclusiones	27
Recomendaciones.....	28

Referencias..... 29

Anexos..... 32

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa I (Establecimiento) <i>in vitro</i> de meristemas de <i>Rhyncholaelia digbyana</i>	17
Cuadro 2 Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa II (Multiplicación) <i>in vitro</i> de meristemas de <i>Rhyncholaelia digbyana</i>	18
Cuadro 3 Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa III (Enraizamiento) <i>in vitro</i> de <i>Rhyncholaelia digbyana</i>	18
Cuadro 4 Ciclo de producción para <i>Rhyncholaelia digbyana</i>	21
Cuadro 5 Costos del medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa I (Establecimiento) <i>in vitro</i> de <i>Rhyncholaelia digbyana</i> expresado en dólares	22
Cuadro 6 Costos del medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa II (Multiplicación) <i>in vitro</i> de <i>Rhyncholaelia digbyana</i> expresado en dólares	23
Cuadro 7 Costos del medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa III (Enraizamiento) <i>in vitro</i> de <i>Rhyncholaelia digbyana</i> expresado en dólares	24
Cuadro 8 Costos y depreciación anual del equipo utilizado para las Etapas I, II y III de la siembra de la <i>Rhyncholaelia digbyana</i> expresado en dólares	25
Cuadro 9 Costo total en la realización de cada una de las etapas de propagación expresado en dólares	25

Índice de Figuras

Figura 1 Planta madre de <i>Rhyncholaelia digbyana</i> en el Orquideario de Zamorano Jorge Bueso Arias.	14
Figura 2 Brotes extraídos de la planta madre de <i>Rhyncholaelia digbyana</i>	15
Figura 3 Meristemo de <i>Rhyncholaelia digbyana</i>	16
Figura 4 Meristemo de <i>Rhyncholaelia digbyana</i> a los 29 días desde el Establecimiento.....	23

Índice de Anexos

Anexo A Costo total en la realización de cada una de las etapas de propagación expresado en dólares	
.....	32

Resumen

Las orquídeas son reconocidas por sus extraordinarias flores de formas y colores muy variados, siendo de las especies botánicas más numerosas que existen en el mundo. Una de ellas es la flor nacional de Honduras, *Rhynchoaelia digbyana* (Lindl.) Schltr., esta y muchas otras más orquídeas están en peligro de extinción, debido a las malas prácticas humanas que destruyen su hábitat. Actualmente, esta planta no es producida de manera comercial, por eso se usan varias técnicas de reproducción, como la micropropagación, para así tener un elevado número de plantas homogéneas y de una muy alta calidad fitosanitaria en un laboratorio, llevando estas plantas al mercado. El establecimiento a través de los meristemas ha sido usado en la iniciación de los cultivos *in vitro* para obtener plantas sanas y libres de patógenos, sin embargo, todas estas técnicas representan elevados costos de producción, no siendo beneficioso para su comercialización. Por eso es importante entender una estimación de costos, así como su comportamiento. Para que la producción de estas plantas sea rentable se debe conocer los costos de los insumos, la mano de obra y la energía a utilizar que se usan en todo el proceso de propagación. Los objetivos de este estudio fueron establecer *in vitro* meristemas de *Rhynchoaelia digbyana*; y, estimar los costos de la producción de plantas *in vitro* de *Rhynchoaelia digbyana* a partir de meristemas. El costo directo de producción por plántula estimado fue de \$1.60, producida en un ciclo de 14 meses.

Palabras clave: meristemas, epífitas, extinción, orquídeas, propagación.

Abstract

Orchids are recognized for their extraordinary flowers of very varied shapes and colors, being one of the most numerous botanical species that exist in the world. One of them is the national flower of Honduras, *Rhyncholaelia digbyana*, this and many other orchids are in danger of extinction, due to bad human practices that destroy their habitat. Currently, this plant is not produced commercially, which is why various reproduction techniques are used, such as micropropagation, to have many homogeneous plants of very high phytosanitary quality in a laboratory, bringing these plants to market. The establishment through the meristems has been used in the initiation of in vitro cultures to obtain healthy and pathogen-free plants, since they provide permanent plant growth, however, all these techniques represent high production costs, not being beneficial for marketing. That is why it is important to understand a cost estimate, as well as its behavior, for these plants to be profitable, the costs of the inputs, the labor, and the energy to be used that are involved in the entire propagation process must be known. The objectives of this study were to establish in vitro meristems of *Rhyncholaelia digbyana*; and, to estimate the costs of the production of in vitro plants of *Rhyncholaelia digbyana* from meristems. Giving an estimated direct cost of production per seedling was \$1.60, produced in a 14-month cycle.

Keywords: meristems, epiphytes, extinction, orchids, propagation.

Introducción

Las orquídeas son reconocidas por sus extraordinarias flores de formas y colores muy variadas. Estas plantas pertenecen a la familia botánica Orchidaceae, que contiene entre 25 y 30 mil especies, se pueden encontrar por todo el mundo, pero son abundantes en regiones tropicales o cálido-húmedas (Menchaca García 2011). El uso más popular de las orquídeas es en el ámbito estético, para así embellecer los espacios, por el interés y armonía que provoca (Tejeda-Sartorius et al. 2017).

Las orquídeas constituyen una de las familias de plantas que son reconocidas fácilmente por sus flores grandes, bellas y exóticas (Sedano et al. 2015). Las orquídeas tienen diferentes hábitos de crecimiento, de forma terrestre o epífitas, esta última siendo la más conocida, alcanzan su mayor diversidad y abundancia en los bosques nubosos tropicales (Cascante-Marín y Trejos Hernández 2019). Son plantas muy adaptables, pero se destacan por depender de hongos, algunos micorrízicos, para su germinación (Chavez et al. 2014). A nivel mundial, con la destrucción del hábitat y el cambio global, la recolección de varias especies para la horticultura, alimento o medicina representa una de las principales amenazas para la supervivencia de algunos grupos más destacados de orquídeas (Fay 2018).

Las orquídeas se pueden reproducir por propagación sexual y asexual. En la propagación sexual se usa la germinación por semillas, estas realizan una función simbiótica, para que así los organismos se beneficien mutuamente sin afectar al otro, sin embargo, tiene en contra factores climáticos, el suelo y la competencia entre especies (Menchaca García 2011).

En la propagación asexual casi siempre la nueva planta es genéticamente idéntica al progenitor, esto a través de la separación de partes vegetativas (Osuna Fernández H et al. 2016). Esto consiste en la separación de un fragmento de la planta que se desea multiplicar y conseguir que a partir de ese fragmento se desarrolle un individuo nuevo (Osuna Fernández H et al. 2016).

Uno de los métodos más utilizados para obtener plantas libres de patógenos, es a través de la propagación *in vitro* usando meristemas, con esta técnica se logra la propagación masiva de plantas sanas y libres de enfermedades (Solis et al. 2011). Esta forma de cultivar las plantas tiene dos

características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes) y las condiciones controladas (temperatura, humedad relativa, luz y medio de cultivo).

Los dos principales problemas que presenta la micropropagación son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante (Bolaños Campollo 2017). La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados, en especial durante las primeras etapas de propagación (Afanador Pérez 2005). Los explantes suelen sufrir situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro*, por ejemplo la preparación de los explantes y los cortes previos que hay que realizar y también los componentes del medio de cultivo, esto producirá una síntesis de fenoles causando hipersensibilidad, dando origen a la oxidación de fenoles que son tóxicos para los explantes (Afanador Pérez 2005).

La micropropagación ofrece una serie de ventajas sobre la propagación convencional, como la posibilidad de producir un elevado número de plantas homogéneas y de una muy alta calidad fitosanitaria, en un menor lapso y en espacios reducidos. El cultivo se incuba bajo condiciones adecuadas de luz, temperatura, humedad y que junto con las físico químicos y nutricionales conducen al desarrollo del explante (Calva y Pérez 2005).

Los meristemos no suelen usarse de manera tan frecuente, por su difícil extracción y baja sobrevivencia, pero son conocidos por ser un grupo de células que al dividirse dan origen a una célula hija que continúa siendo meristemática y otra que se diferencia (Bolaños Campollo 2017). El establecimiento de meristemos ha sido usado en la iniciación de los cultivos *in vitro* para obtener plantas sanas y libres de patógenos (García-Águila et al. 2001). Una vez obtenidos los meristemos se proceden a la siembra en un medio de cultivo, con el cual se busca el crecimiento y regeneración de estos mediante el aporte de nutrientes (Afanador Pérez 2005).

La *Rhyncholelia digbyana* (Lindl.) Schltr., es la flor nacional de Honduras desde 1969, su presencia en bosques y zonas montañosas ha disminuido, debido a la extracción indiscriminada de las plantas adultas que posteriormente son comercializadas ilegalmente, de igual forma por la destrucción acelerada de los bosques (Salgado Moncada 2002). La Convención sobre el Comercio

Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) se redactó como resultado de una reunión de los miembros de la UICN, celebrada en 1963 con la finalidad de velar por que el comercio internacional de animales y plantas silvestres no constituya una amenaza para la supervivencia de las especies, existen tres apéndices en que son colocadas las especies, dependiendo del grado de riesgo y peligro de extinción. La *Rhynchoaelia digbyana* está en el apéndice II, no es altamente amenazada, pero podría estarlo si no se toman las medidas necesarias a tiempo (Salgado Moncada 2002). La *Rhynchoaelia digbyana* es una planta compacta de tamaño mediano, tiene una fragancia nocturna muy parecida a los cítricos (Silva Sanchez 2020).

La amenaza de esta y casi todas las orquídeas, es la que actualmente enfrentan todos los seres vivientes: el calentamiento global y las actividades humanas que destruyen su hábitat. En la actualidad es necesario aumentar las poblaciones de *Rhynchoaelia digbyana* para reinsertarlas en hábitats silvestres o permitir asegurar su conservación.

El uso de técnicas de cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de acortar hasta en dos años el tiempo requerido para la floración de plántulas, teniendo así un óptimo enraizamiento y producciones masivas (Tejeda-Sartorius et al. 2017) a pesar de producir muchas plantas, la principal desventaja de la micropropagación es el elevado costo de producción, no siendo rentable en algunos casos, además, en algunos ejemplares es difícil la obtención de plantas madres de las cuáles se extraiga explantes, sin embargo las investigaciones avanzan en algunas especies de interés económico (Espinoza 2020).

Entender una estimación de costos, así como su comportamiento, permite llevar a cabo una mejor estimación a futuro de los mismos, logrando establecer prioridades y conseguir una eficiente asignación y control de los recursos, evitando así costos innecesarios (Lambretón 2015). Los puntos principales para hacer una diferenciación de costos se dividen en las siguientes categorías: inversiones y reemplazo periódico, costos de producción (suele variar por la escala de manufactura) y, los costos o gastos generales, estos no suelen variar por los cambios en la magnitud de la producción (FAO 2005).

Una estimación de costos se realiza para poder analizar, controlar y poder asignar valores correctamente a los procesos y actividades que se realizan en la fabricación de algún producto o

emprendimiento. Va más allá de determinar el costo de algo sino de una comprensión de factores como la calidad, el ciclo de vida de los productos, innovaciones tecnológicas y sistemas productivos (Lambretón 2015). Uno de los principales actores es la depreciación, se presenta como un costo indirecto, se caracteriza por la recuperación del capital invertido en bienes de producción y por determinar con seguridad costos de producción para llevar un correcto registro de costos (FAO 1998).

Además, se debe resaltar que a nivel nacional no se produce de manera comercial la *Rhyncholaelia digbyana*, en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano se han hecho investigaciones para reproducir *in vitro* esta planta, pero a través de germinación por semillas y no por meristemos. Por esa razón no hay costos estimados para la producción de *Rhyncholaelia digbyana* a partir de este explante.

Los objetivos de este estudio fueron establecer *in vitro* meristemos de *Rhyncholaelia digbyana*; y, estimar los costos de la producción de plantas *in vitro* de *Rhyncholaelia digbyana* a partir de meristemos.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el valle del río Yegüare a 30 km de Tegucigalpa, Municipio de San Antonio Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

Fuente de Material Vegetal

El material se obtuvo de la colección de orquídeas del Orquideario de Zamorano Jorge Bueso Arias y de plantas madre del laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano (Figura 1).

Figura 1

Planta madre de Rhyncholaelia digbyana en el Orquideario de Zamorano Jorge Bueso Arias.



Extracción y Desinfección de Meristemos / Preparación

Previo a la extracción de los meristemos de la *Rhyncholaelia digbyana* las plantas fueron aplicadas con el fungicida sistémico PREVALOR®84 SL, su ingrediente activo es el fosetyl + propamocarb, la dosis recomendada para aplicaciones foliares es de 1.5 - 2 L/ha (Bayer CropScience AG 2011). Se realizaron dos aplicaciones y cinco días después de la última aplicación se extrajeron los brotes.

Se seleccionaron 10 brotes asegurándose que no estén inducidos a floración, sin daño mecánico, que no hubiera presencia de plagas o enfermedades (Figura 2). Fueron cortados con la

ayuda de un bisturí desinfectado para evitar cualquier tipo de contaminación, los cortes se realizaron lo más cerca de la base y colocándolos en papel toalla mientras se trasladaron de los invernaderos al laboratorio de cultivo de tejidos.

Figura 2

Brotos extraídos de la planta madre de Rhyncholaelia digbyana.



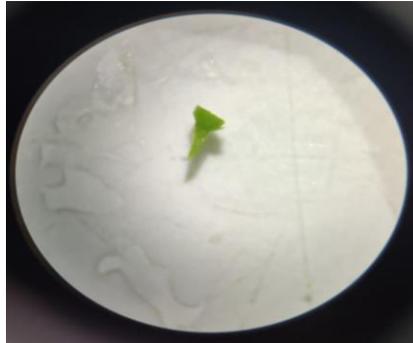
Después de tener los brotes, se realizó el proceso de desinfección que constó de los siguientes pasos:

1. Lavar con agua potable y jabón.
2. Sumergir alcohol 70% por 10 segundos.
3. Sumergir en cloro 10% v/v, más Tween80 por 15 segundos.
4. Lavar con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

La extracción de los meristemas se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, con herramientas desinfectadas previamente con alcohol al 70% y papel toalla y colocadas posteriormente en el esterilizador de calor seco a 350°C por 30 segundos. Una vez frías las herramientas se retiraron las primeras capas de brotes con la ayuda de las pinzas y bisturí, cortando el tejido sobrante que se encontraba en la parte de arriba, dejando expuesto el meristemo, con una medida aproximada de 2 mm de altura y 1 mm de grosor (Figura 3).

Figura 3

Meristemo de Rhyncholaelia digbyana



Según la etapa de micropropagación se utilizan medios de cultivo diferentes. Las etapas para la micropropagación de *Rhyncholaelia digbyana* son las siguientes:

Etapa I - Establecimiento del cultivo: el explante se transfiere al medio de cultivo para la formación de callos y la generación de nuevos brotes.

Etapa II - Multiplicación de brotes: el propágulo germinado se multiplica, seguido de la proliferación de brotes axilares para la estabilidad genética. Las citoquininas se utilizan en mayor cantidad para superar la dominancia apical en este paso.

Etapa III - Enraizamiento del brote: cuando se desarrollan los brotes, se transfieren al medio de enraizamiento para la formación de raíces adventicias.

Etapa IV - Aclimatación de las plántulas: al ya tener un crecimiento de raíces las plántulas se pasan de las bandejas a maceteros con huecos en la parte inferior para ayudar a la aireación, en esta etapa después de realizar un manejo adecuado de sustratos, fertilizantes y fungicidas se puede comercializar finalmente.

Medio de Cultivo: Etapa I - Establecimiento

Para esta etapa se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (Cuadro 1). El pH del medio se ajustó a 5.8, y para solidificarlo se usó Phytigel® 1.8 g/L.

Cuadro 1

Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa I (Establecimiento) in vitro de meristemas de Rhyncholaelia digbyana

Componente	Unidad	Cantidad usada en 1L
Macroelementos MS (10X)	mL	100.00
FeNaEDTA	mg	50.00
Microelementos MS (1000X)	mL	1.00
Inositol	g	0.10
Ácido nicotínico	mg	0.01
Cisteína	mg	10.00
Biotina	mg	0.0001
Pantoneato	mg	0.01
Sulfato de adenina	mg	5.00
Caseína hidrolizada	mg	1.00
Tiamina	mg	0.10
Piridoxina	mg	0.10
Ácido naftalenacético	mg	1.50
Sacarosa	g	30.00

El medio de cultivo fue colocado en frascos de vidrio y sellados con papel aluminio, finalmente se esterilizó en autoclave por 20 minutos, con una presión de 1.1 kg/cm² y una temperatura de 120°C.

Cuando los meristemas alcanzaron una altura de 4 cm, se trasladaron al nuevo medio de cultivo para realizar la segunda etapa (multiplicación).

Medio de Cultivo: Etapa II - Multiplicación

En el Cuadro 2 se muestra el medio de cultivo utilizado, para esta etapa se aumentó la cantidad de citoquininas, para superar la dominancia apical en este paso. El pH del medio se ajustó hasta llegar a 5.8 y para solidificarlo se usó 1.8 gramos de Phytigel®.

Cuadro 2

Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa II (Multiplicación) in vitro de meristemas de Rhyncholaelia digbyana.

Componente	Unidad	Cantidad usada en 1L
Macroelementos MS (10X)	mL	100.00
FeNaEDTA (200X)	mL	5.00
Microelementos MS (1000X)	mL	1.00
Inositol	g	0.10
Tiamina	mg	0.50
Ácido nicotínico	mg	0.50
Piridoxina	mg	0.50
Glicina	mg	2.00
6-Bencilaminopurina	mg	0.01
Ácido indol-3-acético	mg	0.10
Sacarosa	g	30.00

Posteriormente, se retiraron los brotes del medio de cultivo de la Etapa de Establecimiento y se trasladaron a este medio de cultivo, para proceder a la multiplicación de cada uno de estos, para su crecimiento. Las plantas al estar sanas continuaron avanzando en el proceso de micropropagación.

Medio de Cultivo: Etapa III - Enraizamiento

Al desarrollar los brotes, se transfirieron al medio de enraizamiento para la formación de raíces adventicias, en esa formulación se reducen las citoquininas y se aumenta auxinas como el ácido naftalenacético (Cuadro 3). Se ajustó el pH a 5.8 y para solidificarlo se usó 1.8 gramos de Phytigel®.

Cuadro 3

Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa III (Enraizamiento) in vitro de Rhyncholaelia digbyana

Componente	Unidad	Cantidad usada en 1L
Macroelementos MS (10X)	mL	100.00
FeNaEDTA (200X)	mL	5.00
Microelementos MS (1000X)	mL	1.00
Inositol	g	0.10
Tiamina	mg	0.40
Ácido nicotínico	mg	0.50
Piridoxina	mg	0.50
6-Bencilaminopurina	mg	0.10
Ácido naftalenacético	mg	1.00
Sacarosa	g	20.00

Incubación de Meristemos

Los meristemos de *Rhynchoaelia digbyana* sembrados en los frascos permanecieron en el cuarto de crecimiento I, el cual se encuentra con una humedad relativa entre un 30%, temperatura de 22 a 24°C, 16 horas de luz a 4,000 lux y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 40 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Una vez que las plantas salen del laboratorio continúan con la etapa de aclimatación. Esta etapa no se llevó a cabo por razones de tiempo, pero los costos fueron estimados, mediante revisión de literatura y ayuda de técnicos del laboratorio de cultivo de tejidos y la unidad de Propagación de plantas.

Etapa de Aclimatación

Este es el proceso de traspaso de las plantas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos al invernadero, las vitro plántulas se colocan en bandejas plásticas de 50 alveolos, las bandejas deber ser previamente desinfectadas sumergiéndolas en una solución de cloro a 0.20 g/L. Se utiliza un sustrato formulado para producción de orquídeas Orchid Bark $\frac{1}{4}$ " - $\frac{3}{4}$ ", el cual permite una mejor retención de agua y nutrientes y un mejor desarrollo radicular para la plántula en esta etapa. Las bandejas permanecen en el invernadero a 80% de sombra, con una Humedad Relativa arriba de 85% y una temperatura promedio de 24°C. EL invernadero cuenta con un sistema de ventilación, y está cubierto por malla sarán, 80%. El sistema de riego a utilizar es de nebulización, en el cual se expulsa agua en forma de neblina, a través de emisores colocados en la parte superior de los cultivos, el cual además de suministrar agua contribuye a disminuir temperatura y elevar el nivel de humedad relativa en el interior de los invernaderos.

Para completar el proceso, las plántulas ya adaptadas, son llevadas al área de crecimiento, es decir pasan a otro invernadero donde son trasplantadas a maceteras de mayor tamaño, y con perforaciones pequeñas en la parte inferior para su aireación, se utiliza el sustrato Orchid Bark $\frac{1}{4}$ " – $\frac{3}{4}$ ". En esta etapa las plantas se fertilizan con Triple 20 o Vitafol 10–40-10, para favorecer su crecimiento y aplicar de 2 - 3 tratamientos con intervalos de 12 - 14 días en pulverización foliar

mojando abundantemente. Las aplicaciones recomendadas de fungicidas para prevención y control de hongos.

Estimación de Costos

Para obtener los costos de producción, se estimaron y se asignaron según las cantidades de insumos utilizados y la mano de obra usada en la producción. Se recolectó información por medio de visitas al laboratorio, registros contables y personas expertas del laboratorio para llevar a cabo la producción del cultivo *in vitro* de la *Rhyncholelia digbyana*.

Para el cálculo de la depreciación de los equipos e implementos que se encuentran en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, se usó la depreciación en línea recta, al ser la más simple en aplicación y el método más usado frecuentemente. (FAO 1998). Este cálculo se hizo mediante la fórmula para calcular la Depreciación en Línea Recta (DLR) descrita a continuación:

$$DLR = \frac{\text{Costo del activo}}{\text{Vida útil del activo}} [1]$$

Sin embargo, para esta estimación solo se incluyeron los costos directos, no se incluyó esta depreciación, debido al desconocimiento de los costos actuales de cada uno de los equipos que se encuentran en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetal, y su depreciación en cada uno de los años de vida útil, pero se incluyó una depreciación en línea recta para observar así un costo aproximado de cada uno de estos y el aumento que podrían causar en el costo total de producción por plántula.

Resultados y Discusión

Dentro de las tres primeras etapas de propagación de *Rhynchoaelia digbyana* se tuvo un 60% de sobrevivencia. Para evitar esto, es necesario tener un manejo fitosanitario de las plantas madre desde que están en el invernadero con un control previo, observando las plantas jóvenes que serán de ayuda para su multiplicación y con el uso de fungicidas que ayuden a contrarrestar enfermedades o contaminaciones al momento de extraer los brotes. De igual manera, en laboratorio, ya que pueden contaminarse los explantes al momento de siembra, por el error humano.

El ciclo de producción para la micropropagación de *Rhynchoaelia digbyana* es de 14 meses (Cuadro 4), siendo la primera etapa la más larga debido al tiempo que necesita el explante de pasar de un medio ambiente diferente a adaptarse al medio de cultivo.

Cuadro 4

Ciclo de producción para Rhynchoaelia digbyana

Etapa	Número de días	Lugar	Temperatura °C	Humedad Relativa %
Etapa I: Establecimiento	90 - 120	Cuarto de crecimiento I	22 – 24	40 – 70
Etapa II: Multiplicación	90	Cuarto de crecimiento I	22 – 24	40 – 70
Etapa III: Enraizamiento	90	Cuarto de crecimiento I	22 – 24	40 – 70
Etapa IV: Aclimatación	60	Invernadero	24 – 30	90 – 100
Área de Crecimiento	60	Invernadero	24 – 30	50 – 60

En el Cuadro 5, se puede observar el costo del medio de cultivo utilizado en la primera etapa, para el estudio se estimó la preparación de 1 litro de medio. Siendo el Phytigel® el componente más costoso, este componente se usa para solidificar los medios y dar soporte a los explantes.

Cuadro 5

Costos del medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa I (Establecimiento) in vitro de Rhyncholaelia digbyana expresado en dólares

Componente	Unidad	Costo por unidad	Cantidad por envase	Cantidad usada en 1L	Costo por litro
Macroelementos MS (10X)	mL	7.1	1000	100	0.71300
Microelementos (1000X)	MS mL	26.6	500	1	0.05316
FeNaEDTA (200X)	mL	47.7	1000	5	0.23850
Inositol	g	85.1	1000	0.1	0.00851
Ácido nicotínico	mg	21.5	5000	0.01	0.00004
Cisteína	g	29.2	25	0.01	0.01168
Biotina	mg	24.5	100	0.0001	0.00002
Pantotenato	mg	18.4	100	0.01	0.00184
Sulfato de adenina	mg	19.6	5000	5	0.01960
Caseína hidrolizada	g	20.1	100	0.0001	0.00020
Tiamina	mg	17.7	5000	0.1	0.00035
Piridoxina	mg	65.8	5000	0.1	0.00132
Ácido naftalenacético	g	32.6	25	0.0015	0.00196
Sacarosa	g	46.8	5000	30	0.28080
Phytigel	g	61.0	100	1.8	1.09800
Costo total					2.42898

En el Cuadro 6, se muestra el costo por unidad del medio de cultivo y el costo usado en 1 litro de para la multiplicación realizada en la segunda etapa de propagación de la *Rhyncholaelia digbyana*. Se puede observar una disminución del 5% en el costo por unidad de este medio de cultivo de la etapa de establecimiento, por la eliminación de los componentes: cisteína, biotina, pantoneato, sulfato de adenina, caseína hidrolizada y ácido naftalenacético.

Cuadro 6

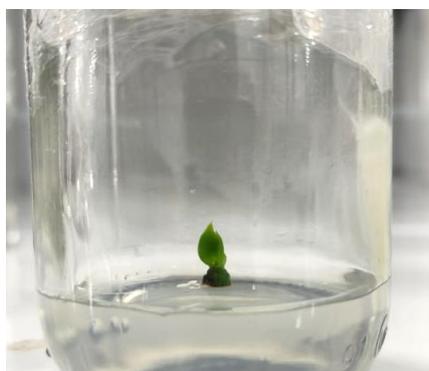
Costos del medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa II (Multiplicación) in vitro de Rhyncholaelia digbyana expresado en dólares

Componente	Unidad	Costo por unidad	Cantidad por envase	Cantidad usada en 1L	Costo por litro
Macroelementos MS (10X)	mL	7.1	1000	100	0.71000
Microelementos (1000X)	MS mL	26.6	500	1	0.05320
FeNaEDTA (200X)	mL	47.7	1000	5	0.23850
Inositol	g	85.1	1000	0.1	0.00851
Tiamina	mg	17.7	5000	0.5	0.00177
Ácido nicotínico	mg	21.5	5000	0.5	0.00215
Piridoxina	mg	65.8	5000	0.5	0.00658
Glicina	g	65.6	500	0.002	0.00026
6-Bencilaminopurina	mg	20.8	100	0.01	0.00208
Ácido indol-3-acético	mg	31.5	5000	0.1	0.00063
Sacarosa	g	46.8	5000	30	0.28080
Phytigel	g	61.0	100	1.8	1.09800
Costo total					2.402482

Al ya ir absorbiendo los diferentes nutrientes, los meristemos comienzan con el crecimiento y generación de brotes (Figura 4), alcanzando una altura de 4 mm.

Figura 4

Meristemo de Rhyncholaelia digbyana a los 29 días desde el Establecimiento



En el Cuadro 7, se presentan los costos por unidad y el costo usado por 1 litro de los componentes del medio de cultivo para la tercera etapa, el enraizamiento. Respecto al costo final de

este medio hubo una reducción del 1%, ya que solo se eliminó la glicina, y se incluyó el ácido naftalenacético.

Cuadro 7

Costos del medio de cultivo de Murashige y Skoog para la Etapa III (Enraizamiento) in vitro de Rhyncholaelia digbyana expresado en dólares

Componente	Unidad	Costo por unidad	Cantidad por envase	Cantidad usada en 1L	Costo por litro
Macroelementos MS (10X)	mL	7.10	1000	100	0.71000
Microelementos (1000X)	MS mL	26.60	500	1	0.05320
FeNaEDTA (200X)	mL	47.70	1000	5	0.23850
Inositol	g	85.10	1000	0.1	0.00851
Tiamina	mg	17.70	5000	0.4	0.00142
Ácido nicotínico	mg	21.50	5000	0.5	0.00215
Piridoxina	mg	65.80	5000	0.5	0.00658
6-Bencilaminopurina	mg	20.80	100	0.1	0.02080
Ácido naftalenacético	g	32.60	25	0.001	0.00130
Sacarosa	g	46.80	5000	20	0.18720
Phytigel	g	61.00	100	1.8	1.09800
Costo final					2.32766

La estimación de costos se hizo para una capacidad de 8,400 frascos, siendo esta la capacidad total del cuarto de crecimiento I, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos. En el Cuadro 8, se presentan los costos de los equipos que se encuentran en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos que fueron usados para la preparación del medio de cultivo y la respectiva propagación de la *Rhyncholaelia digbyana*. Se calculó la depreciación, esta demuestra el momento en que un activo alcanzó el límite de su vida útil, esto por un desgaste físico o técnico, al final de cada periodo se refleja el gasto depreciable que es la parte del servicio que ha expirado por el uso en la elaboración de un producto o servicio (Carrión Cumbicos 2019).

Cuadro 8

Costos y depreciación anual del equipo utilizado para las Etapas I, II y III de la siembra de la Rhyncholelia digbyana expresado en dólares

Equipo	Costo	Vida Útil (Años)	Depreciación anual
Autoclave	11,476.00	25	459.04
Cámara de flujo laminar	10,236.00	30	341.20
Balanza analítica	3,693.20	20	184.66
Aire acondicionado incubación	2,488.22	5	497.64
Aire acondicionado transferencia	1,685.01	5	337.00
Estereoscopio	691.00	20	34.55
Refrigerador	626.30	25	25.05
Esterilizador de calor seco	554.00	10	55.40
Agitador mecánico	323.32	5	64.66
Extractor de humedad	190.63	10	19.06
Microondas	169.45	20	8.47
Medidor de pH	76.00	3	25.33
Programador de luz	63.38	10	6.34

En el Cuadro 9 se presenta el total de cada uno de los costos de los materiales y mano de obra usados en las etapas de propagación, desde que entra al laboratorio hasta su momento de venta ya en macetas.

Cuadro 9

Costo total en la realización de cada una de las etapas de propagación expresado en dólares

	Descripción	Costo total	%	% Total por etapa
Etapa I: Establecimiento	Insumos	354.62	29.22	9.05%
	Medio de cultivo	610.97	50.34	
	Mano de obra	248.00	20.44	
	Subtotal	1,213.59		
Etapa II: Multiplicación	Insumos	212.80	29.17	5.44%
	Medio de cultivo	361.83	49.59	
	Mano de obra	155.00	21.24	
	Subtotal	729.63		
Etapa III: Enraizamiento	Insumos	1,276.80	32.64	29.18%
	Medio de cultivo	2,108.11	53.89	
	Mano de obra	527.00	13.47	
	Subtotal	3,911.91		

	Descripción	Costo total	%	% Total por etapa
Etapa IV: Aclimatación	Bandejas	171.36	9.81	13.03%
	Sustrato	990.00	56.67	
	Fertilización	9.33	0.53	
	Fungicidas	5.91	0.34	
	Insecticida	12.34	0.71	
	Mano de obra	558.00	31.94	
	Subtotal	1,746.94		
Área de crecimiento	Macetas	2,268.00	39.08	43.29%
	Sustrato	2,750.00	47.39	
	Fertilización	146.86	2.53	
	Fungicidas	5.91	0.10	
	Insecticida	12.34	0.21	
	Mano de obra	620.00	10.68	
	Subtotal	5,803.11		
	Total	13,405.18		100.00%
Costo total de producción/planta		1.60		

Se pudo observar un mayor porcentaje de costos en la Etapa IV: Aclimatación en el segundo invernadero, con un 43.29%, debido a los altos costos necesarios para su tiempo en el invernadero. Para la producción de la *Rhyncholelia digbyana* se recomienda establecer en un invernadero con techo de plástico, para así evitar la exposición a precipitaciones y poder controlar la temperatura (Medina y Vargas 2020). La temperatura óptima varía según las especies, pero casi siempre está comprendida entre 10 y 25°C (FAO 2002). A diferencia de la Etapa II: Multiplicación, que obtuvo un 5.44% siendo la de menor costo por la disminución de ingredientes en la realización del medio de cultivo.

En las primeras tres etapas se pudo observar que el mayor gasto está destinado hacia la mano de obra, ocupando más del 40% de los costos totales en esta parte. Mientras que en las dos últimas etapas el costo de mayor insumo es el sustrato que se va a utilizar en las plántulas de *Rhyncholelia digbyana*.

Conclusiones

Se logró establecer *Rhyncholaelia digbyana* a partir de sus meristemas.

Para la producción de 8,400 orquídeas *in vitro* a partir de meristemas el costo directo de producción por cada planta de 1.60 dólares.

Recomendaciones

Para reducir contaminación en la etapa de establecimiento, utilizar material sano de las plantas madre de *Rhyncholelia digbyana*.

Completar el proceso de producción hasta la etapa de crecimiento, para obtener un costo más aproximado.

Realizar el costeo total que incluya estimación de costos indirectos para tener un costo total con mayor exactitud.

Referencias

- Afanador Pérez AM. jun. 2005. Propagación *in vitro* a partir de meristemas de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Carrera de Biología. 137 p; [consultado el 6 de jun. de 2022]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8740/tesis68%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.
- Bayer CropScience AG. 2011. Prevalor 84 SL panf.FH11; [consultado el 7 de jun. de 2022]. <http://casagri.co.cr/wp-content/uploads/fichatecnica/60019.pdf>.
- Bolaños Campollo MM. jul. 2017. Micropropagación *in vitro* de meristemas para control del virus de amarillamiento (SCYLV) en variedades de caña de azúcar: Sistematización de práctica profesional. Guatemala de la Asunción: Universidad Rafael Landívar. <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2017/06/14/Bolanos-Monica.pdf>.
- Calva G, Pérez J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro; [consultado el 7 de jun. de 2022]. 6(11). http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf.
- Carrión Cumbicos CV. feb. 2019. Análisis comparativo del método de depreciación lineal y suma de números dígitos de activos en las empresas públicas y privadas. Machala, Ecuador: Unidad Académica de Ciencias Empresariales, Carrera de Administración de Empresas. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/13406/1/EUACE-2019-AE-DE00417.pdf>.
- Cascante-Marín A, Trejos Hernández C. 2019. Diversidad y vulnerabilidad de la flora orquideológica de un bosque montano nuboso del Valle Central de Costa Rica. *Lankesteriana*; [consultado 2 de junio del 2022]. Abril, 19(1). doi:10.15517/lank.v19i1.37031.
- Chavez HK, Mosquera AT, Otero Ospina JT. 2014. Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta agron*; [consultado el 7 de jun. de 2022]. 64(2):125–133. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v64n2/v64n2a4.pdf>. doi:10.15446/acag.v64n2.42976.
- Espinoza G. 2020. Cultivo *in vitro* en plantas, finalidad, elementos, beneficios y desventajas: Naturaleza y ecología. *Naturaleza y ecología*; [consultado el 12 de jun. de 2022]. <https://naturaleza.animalesbiologia.com/plantas/cultivo-in-vitro-en-plantas>.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2002. El cultivo protegido en Clima Mediterráneo: Capítulo 4: Control del Medio Ambiente. Roma: [sin editorial]; [actualizado el 8 de feb. de 2021; consultado el 10 de jun. de 2022]. <https://www.fao.org/3/s8630s/s8630s06.htm>.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 1998. Ingeniería económica aplicada a la industria pesquera: Costos de producción. Roma: [sin editorial]; [actualizado el 17 de feb. de 2021; consultado el 3 de jun. de 2022]. <https://www.fao.org/3/v8490s/v8490s06.htm>.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2005. Formulación y análisis detallado de proyectos: Como estimar costos e ingresos. Roma: [sin editorial]; [actualizado el 8 de feb. de 2021; consultado el 2 de jun. de 2022]. <https://www.fao.org/3/a0323s/a0323s06.htm>.

- Fay MF. 2018. Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Bot Stud*; [consultado el 6 de jun. de 2022]. 59(1):16. eng. <https://as-botanicalstudies.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s40529-018-0232-z.pdf>. doi:10.1186/s40529-018-0232-z.
- García-Águila L, Sarría Hernández Z, Pichardo Moya T, Pérez Mederos B. 2001. Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas in vitro. *Biotecnología Vegetal*. 1(2). es. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/77/html>.
- Lambretón V. 2015. La importancia del análisis y la estimación de costos. Perú: [sin editorial]; [actualizado el 3 de jun. de 2022; consultado el 3 de jun. de 2022]. <https://www.esan.edu.pe/conexion-esan/importancia-analisis-estimacion-costos>.
- Medina Y, Vargas R. 2020. Estudio de factibilidad para la producción de pascuas (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en la cordillera de El Merendón, San Pedro Sula, Honduras. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 35 p; [consultado el 10 de jun. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/40c205bc-80b4-40f7-a080-80d36ba5f169/content>.
- Menchaca García RA. 2011. Manual para la Propagación de Orquídeas: Una estrategia para revalorizarlas como recurso forestal no maderable; [consultado el 4 de jun. de 2022]. https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF.
- Osuna Fernández H, Osuna Fernández AM, Fierro Álvarez A. 2016. Manual de propagación de plantas superiores; [consultado el 2 de jun. de 2022]. https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/manual_plantas.pdf.
- Salgado Moncada JD. nov. 2002. Analisis del costo de produccion y evaluacion de la tasa de multiplicacion in vitro de *Rhyncholelia digbyana* en Zamorano. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 75 p; [consultado el 6 de jun. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/f68072ec-4b8b-4f66-972b-9f2b5517b575/content>.
- Sedano G, Manzo A, Roldán R, Castellanos JA. 2015. Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1:451–456. Español. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263139243061>.
- Silva Sanchez LE. oct. 2020. Descripción botánica del género *Rhyncholelia*: Revisión de Literatura. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 37 p; [consultado el 6 de jun. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/e9b761d2-a134-4d9f-9338-e7aee1804a5f/content>.
- Solis R, Olivera J, La Rosa R. 2011. Propagación in vitro de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. *Revista Peruana de Biología*. 18(3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332011000300012.
- Tejeda-Sartorius O, Téllez-Velasco MAA, Téllez-VelascoEscobar-Aguayo JJ. 2017. Importancia de aprovechamiento sustentable de productos forestales no maderables en bosques de niebla: Estudio de caso en orquídeas. *Agro productividad*; [consultado el 6 de jun. de 2022]. 10(6). https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2017/AGROPRODUCTIVIDAD_VI-2017.pdf.
- Tejeda-Sartorius O, Téllez-Velasco MAA, Trejo-Téllez LI. 2017. Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales: Alternativa de aprovechamiento sustentable. *Agro productividad*. 10(6). <https://go.gale.com/ps/>

i.do?p=IFME&u=googlescholar&id=GALE%7CA534321577&v=2.1&it=r&sid=IFME&asid=526694e
e.

Anexos

Anexo A

Costo total en la realización de cada una de las etapas de propagación expresado en dólares

	Descripción	Costo por unidad	Cantidad	Costo total	%	%
Etapa I: Establecimiento	Insumos				29.22	9.05%
				354.62		
	Medio de cultivo	2.61	234	610.97	50.34	
	Mano de obra	15.50	16	248.00	20.44	
	Subtotal			1,213.59		
Etapa II: Multiplicación	Insumos				29.17	5.44%
				212.80		
	Medio de cultivo	2.58	140	361.83	49.59	
	Mano de obra	15.50	10	155.00	21.24	
	Subtotal			729.63		
Etapa III: Enraizamiento	Insumos				32.64	29.18%
				1,276.80		
	Medio de cultivo	2.51	840	2,108.11	53.89	
	Mano de obra	15.50	34	527.00	13.47	
	Subtotal			3,911.91		
Etapa IV: Aclimatación	Bandejas	1.02	168	171.36	9.81	13.03%
	Sustrato	55.00	18	990.00	56.67	
	Fertilización	3.24	2.88	9.33	0.53	
	Fungicidas	49.26	0.12	5.91	0.34	
	Insecticida	12.30	0.04	12.34	0.71	
	Mano de obra	15.50	36	558.00	31.94	
		Subtotal			1,746.94	
Área de crecimiento	Macetas	0.27	8400	2,268.00	39.08	43.29%
	Sustrato	55.00	50	2,750.00	47.39	
	Fertilización	3.24	45.36	146.86	2.53	
	Funguicidas	49.26	0.12	5.91	0.10	

	Descripción	Costo por unidad	Cantidad	Costo total	%	%
	Insecticida	12.30	0.04	12.34	0.21	
	Mano de obra	15.50	40	620.00	10.68	
Subtotal				5,803.11		
	Total			13,405.18		100.00
						%
	Costo total/planta			1.60		