



Universidad  
Nacional  
de Loja

# Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Forestal

## Inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas

Trabajo de Integración Curricular  
previo a la obtención del título de  
Ingeniera Forestal

**AUTORA:**

Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo

**DIRECTOR:**

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2024

## Certificación

Loja, 22 de agosto de 2023

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

### **DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

#### **CERTIFICO:**

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas**, previo a la obtención del título de **Ingeniera Forestal**, de la autoría de la estudiante **Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo**, con **cédula de identidad Nro. 0705646453**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Firmado electrónicamente por:  
**VICTOR HUGO ERAS  
GUAMAN**

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

### **DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

## Autoría

Yo, **Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.



**Firma:**

**Cedula de identidad:** 0705646453

**Fecha:** 27 de marzo del 2024

**Correo electrónico:** daniela.cardenas@unl.edu.ec

**Teléfono:** 0967961484

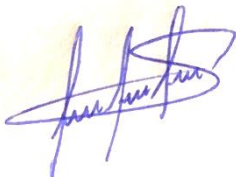
Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.

Yo, **Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: **Inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas**, como requisito para optar el título de **Ingeniera Forestal**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja, a los veintisiete días del mes de marzo del dos mil veinticuatro.



**Firma:**

Autora: Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo

Cédula: 0705646453

Dirección: Loja, Héroes del Cenepa tercera etapa (Carlos Yunque y Héctor Pilco)

Correo electrónico: daniela.cardenas@unl.edu.ec

Celular: 0967961484

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

Director del Trabajo de Integración Curricular: Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc

## **Dedicatoria**

El presente trabajo de investigación va dedicado a Dios principalmente, por darme la sabiduría para completar mi formación profesional, por brindarme las oportunidades para superarme y mostrarme el camino correcto. A mis padres **Ángel y Albita**, que con su esfuerzo y sacrificio han sido el pilar fundamental para conseguir este logro, por haberme guiado, apoyado e incentivado a crecer humana y profesionalmente, por enseñarme los valores correctos y mostrarme que en la vida con esfuerzo y dedicación todo se puede lograr.

A mis hermanos **Paúl, Carolina, Eliza, Pablo y Ámbar** por apoyarme y motivarme a ser mejor en todo momento, a mis queridos sobrinos **Andrea, Dilan y Alaia** que con sus ocurrencias y amor cada que llegaba a casa, hacían más llevadera esta etapa.

A mis abuelitos paternos **Alcívar y Flor**, a mi abuelita materna **María** por regalarme su amor y apoyo.

A todos ellos por brindarme su amor incondicional y ser la fuente de inspiración y motivación para cumplir esta meta.

*Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo*

## **Agradecimiento**

A mi director del Trabajo de Integración Curricular, Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, por haber depositado en mí su confianza y haberme permitido formar parte de su equipo de investigación, por la paciencia, entrega y responsabilidad que puso en mi trabajo. Por el amor que tiene a su profesión y por transmitir conocimientos académicos y experiencias que aportaron a nuestra formación.

Al equipo de investigación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Ing. Agrónoma Magaly Yaguana Arévalo por su predisposición absoluta y apoyo incondicional en la fase de laboratorio, por sus conocimientos y experiencias compartidas; al Ing. For. Darlin González Zaruma, por su tiempo y aporte durante la redacción mi trabajo de investigación.

Finalmente, a mi grupo de compañeros de curso con los que más compartí esta hermosa etapa. Por ser parte importante y un apoyo en cada ciclo académico, por compartir conocimientos y experiencias dentro y fuera de nuestra formación académica, por el tiempo compartido y su amistad incondicional.

*Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo*

## Índice de contenidos

<b>Portada</b> .....	<b>i</b>
<b>Certificación</b> .....	<b>ii</b>
<b>Autoría</b> .....	<b>iii</b>
<b>Carta de autorización</b> .....	<b>iv</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>v</b>
<b>Agradecimiento</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice de contenidos</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Índice de anexos</b> .....	<b>xviii</b>
<b>1. Título</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>2</b>
Abstract.....	4
<b>3. Introducción</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Marco teórico</b> .....	<b>9</b>
4.1. Descripción de la familia Orchidaceae .....	9
4.2. Descripción del género <i>Cattleya</i> .....	9
4.3. Descripción de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.....	9
4.3.1. Taxonomía .....	10
4.3.2. Distribución geográfica.....	10
4.3.3. Usos.....	11
4.3.4. Estado de conservación .....	11
4.4. Micropropagación vegetal <i>in vitro</i> .....	12
4.5. Medio de cultivo .....	12
4.5.1. Composición química del medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946).....	12
4.5.2. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962).....	13

4.6.	Reguladores de crecimiento .....	14
4.6.1.	Auxinas .....	15
4.6.1.1.	Ácido diclorofenoxiacético (2-4, D) .....	15
4.6.1.2.	Ácido indol acético (AIA).....	15
4.6.2.	Citoquininas o citocininas .....	15
4.6.2.1.	Bencil amino purina (BAP).....	16
4.6.2.2.	Kinetina (KIN). .....	16
4.7.	Condiciones ambientales del cultivo <i>in vitro</i> .....	16
4.7.1.	Temperatura .....	16
4.7.2.	Luz .....	17
4.7.3.	Humedad relativa .....	17
4.8.	Cultivo de callos.....	17
4.8.1.	Calogénesis <i>in vitro</i> de <i>Cattleya maxima</i> Lindl. ....	18
4.9.	Estudios realizados en micropropagación de <i>Cattleya</i> spp. ....	19
<b>5.</b>	<b>Metodología .....</b>	<b>20</b>
5.1.	Área de estudio.....	20
5.2.	Selección del material vegetal.....	20
5.3.	Metodología para evaluar el efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras calogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946). ....	21
5.3.1.	Preparación del medio de cultivo .....	21
5.3.2.	Inoculación <i>in vitro</i> de los explantes.....	22
5.3.3.	Incubación <i>in vitro</i> .....	23
5.3.4.	Diseño experimental .....	23
5.3.4.1.	Factores y niveles.....	24
5.3.4.2.	Especificaciones del diseño experimental.....	24
5.3.5.	Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo, en el cuarto de incubación del laboratorio .....	25



5.3.6.	Variables de evaluación .....	26
5.3.7.	Análisis estadístico.....	28
5.4.	Metodología para determinar el balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962).....	29
5.4.1.	Preparación del medio de cultivo.....	29
5.4.2.	Inoculación <i>in vitro</i> de los explantes.....	30
5.4.3.	Incubación <i>in vitro</i> .....	31
5.4.4.	Diseño experimental .....	31
5.4.4.1.	Factores y niveles.....	32
5.4.4.2.	Especificaciones del diseño experimental.....	32
5.4.5.	Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo, en el cuarto de incubación del laboratorio .....	33
5.4.6.	Variables de evaluación .....	34
5.4.7.	Análisis estadístico.....	36
<b>6.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
6.1.	Evaluación del efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), en condiciones de oscuridad total. ....	38
6.1.1.	Contaminación de protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.....	38
6.1.2.	Fenolización de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.....	39
6.1.3.	Formación de estructuras callogénicas en protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación. ....	40
6.1.4.	Número de días a la formación de estructuras callogénicas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación. ....	41

6.1.5.	Inducción de raíces <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación. .....	43
6.1.6.	Inducción de brotes <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación. .....	43
6.1.7.	Color de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.....	44
6.1.8.	Friabilidad de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación. ....	45
6.2.	Determinación el balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), en condiciones de oscuridad total.....	47
6.2.1.	Contaminación de protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.....	47
6.2.2.	Fenolización de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación. ....	48
6.2.3.	Formación estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación. ....	49
6.2.4.	Número de días a formación de estructuras callogénicas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación. ....	50
6.2.5.	Inducción de raíces <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación. ....	52
6.2.6.	Inducción de brotes <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación. ....	52
6.2.7.	Color de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación. ....	53

6.2.8.	Friabilidad de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.....	54
6.3.	Difusión de los resultados de la investigación, para su conocimiento y aplicación. .....	56
<b>7.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>58</b>
7.1.	Contaminación de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	58
7.2.	Fenolización de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	59
7.3.	Formación de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	60
7.4.	Inducción de raíces <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	61
7.5.	Inducción de brotes <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	62
7.6.	Color de las estructuras callogénicas formadas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	63
7.7.	Friabilidad de las estructuras callogénicas inducidas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	64
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>65</b>
<b>9.</b>	<b>Recomendaciones</b> .....	<b>66</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>67</b>
<b>11.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>75</b>

## Índice de tablas:

<b>Tabla 1.</b>	Composición química del medio de cultivo Knudson - C (KC-1946).....	13
<b>Tabla 2.</b>	Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962). .....	14
<b>Tabla 3.</b>	Recopilación de estudios realizados en micropropagación de <i>Cattleya</i> spp.....	19
<b>Tabla 4.</b>	Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.....	22
<b>Tabla 5.</b>	Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.....	24
<b>Tabla 6.</b>	Factores y niveles de las concentraciones auxina-citoquinina utilizadas, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.....	24
<b>Tabla 7.</b>	Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el laboratorio, para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl, en condiciones de oscuridad total. ....	25
<b>Tabla 8.</b>	Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados, y número de explantes fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total. ....	26
<b>Tabla 9.</b>	Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes con callo, número de raíces <i>de novo</i> por callo, número de brotes <i>de novo</i> por callo, color del callo y friabilidad del callo, en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total. ....	27
<b>Tabla 10.</b>	Escala para evaluar el porcentaje de formación de callo, color y friabilidad del callo; en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total. ....	27

<b>Tabla 11.</b> Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.....	30
<b>Tabla 12.</b> Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.....	32
<b>Tabla 13.</b> Factores y niveles de las concentraciones auxina-citoquinina utilizadas, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.....	32
<b>Tabla 14.</b> Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el laboratorio, para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de orquídeas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl, en condiciones de oscuridad total. ....	33
<b>Tabla 15.</b> Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados y número de explantes fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total. ....	34
<b>Tabla 16.</b> Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes con callo, número de raíces <i>de novo</i> por callo, número de brotes <i>de novo</i> por callo, color del callo y friabilidad del callo, en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total. ....	35
<b>Tabla 17.</b> Escala para evaluar el porcentaje de formación de callo, color y friabilidad del callo; en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total. ....	35

## Índice de figuras:

- Figura 1.** Distribución geográfica de *Cattleya maxima* Lindl., en los bosques secos de la costa y el sur del Ecuador (MAATE, 2021). ..... 11
- Figura 2.** Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL.... 20
- Figura 3.** Preparación del medio de cultivo de Knudson C (KC-1946): A) Macro y micronutrientes; B) Pesaje de sales minerales; C) Adición de mio-inositol y tiamina; D) Disolución de sales minerales; E) Medición de pH; y, F) Distribución de 25 ml en los frascos de vidrio de cada tratamiento..... 21
- Figura 4.** Inoculación *in vitro* de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson C (KC-1946): A) Flameado del frasco con el material vegetal inoculado; B) Disección y selección de protocormos adecuados para la siembra; y, C) Siembra *in vitro* de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl..... 22
- Figura 5.** Incubación *in vitro* de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en el cuarto de luces del LMV-UNL: A) Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones para la incubación; y, B) Ensayo cubierto con cartulina para generar cámara oscura. .... 23
- Figura 6.** Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962): A) Soluciones madre; B) Medición de volúmenes correspondientes de cada solución madre; C) Adición de sacarosa y carbón activo; D) Medición del pH; E) Filtración del medio de cultivo; y, F) Distribución de 25 ml del medio de cultivo en los frascos de vidrio de cada tratamiento. .... 29
- Figura 7.** Inoculación *in vitro* de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962): A) Flameado del frasco con el material vegetal; B) Disección y selección de protocormos adecuados para la siembra; y, C) Siembra *in vitro* de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl..... 30
- Figura 8.** Incubación *in vitro* de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl en el cuarto de luces: A) Distribución espacial por tratamientos y repeticiones; y, B) Ensayo en oscuridad total..... 31
- Figura 9.** Porcentaje de contaminación de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ..... 38

<b>Figura 10.</b> Ilustración de la contaminación de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	39
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de oxidación fenólica de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). .....	40
<b>Figura 12.</b> Ilustración de la oxidación fenólica de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), en los tratamientos: A) T1R2F4 y B) T5R1F1, a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total... ..	40
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).....	41
<b>Figura 14.</b> Ilustración de las estructuras callogénicas formadas en el tratamiento T7 (10,0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L <sup>-1</sup> de BAP) en <i>Cattleya maxima</i> Lindl: A) Tamaño; B) aspecto y C) estructura en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	41
<b>Figura 15.</b> Número de días a la formación del callo en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).....	42
<b>Figura 16.</b> Ilustración de la secuencia de la formación de estructuras callogénicas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	42
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de brotes <i>de novo</i> formados en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).....	43
<b>Figura 18.</b> Ilustración de la inducción de brotes <i>de novo</i> formados en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los tratamientos: A y B) T5R3F4 y C) T4R3F1, en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	44
<b>Figura 19.</b> Porcentaje del color de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., formadas en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ....	45

<b>Figura 20.</b> Ilustración del color de las estructuras callogénicas formadas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los tratamientos: A) T0R1F2 (crema); B) T7R1F2 (verde) y C) T5R1F1 (café), en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad. ....	45
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de friabilidad de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ....	46
<b>Figura 22.</b> Ilustración de la friabilidad de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los tratamientos: A) T7R1F2; B) T6R1F4 y C) T1R2F5, el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.....	46
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de contaminación de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ....	47
<b>Figura 24.</b> Ilustración de la contaminación de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	48
<b>Figura 25.</b> Porcentaje de oxidación fenólica de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).....	49
<b>Figura 26.</b> Ilustración de la oxidación fenólica de los protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los tratamientos: A) T2R2F1; B) T1R3F5 y C) T6R3F1 en el medio de cultivo de Muriashige y Skook (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	49
<b>Figura 27.</b> Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en protocormos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ....	50
<b>Figura 28.</b> Ilustración de estructuras las callogénicas formadas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los tratamientos: A) T0R1F2; B) T6R2F2 y C) T7R3F2, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	50
<b>Figura 29.</b> Número de días a la formación de callo en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).....	51



<b>Figura 30.</b> Ilustración de la secuencia de la formación de estructuras callogénicas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), en 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	51
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de brotes <i>de novo</i> formados en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ..	52
<b>Figura 32.</b> Ilustración de la inducción de brotes <i>de novo</i> formados en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el tratamiento T4R2F3, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962) a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	53
<b>Figura 33.</b> Porcentaje del color de las estructuras callogénicas formadas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ....	54
<b>Figura 34.</b> Ilustración del color de las estructuras callogénicas formadas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los tratamientos: A) T7R3F2 (verde); B) T0R1F2 (crema) y C) T6R3F1 (café), en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	54
<b>Figura 35.</b> Porcentaje de friabilidad de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30). ....	55
<b>Figura 36.</b> Ilustración de la friabilidad de las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en los tratamientos: A) T0R1F2 (friable) y B) T3R1F3 (no friable), en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	55
<b>Figura 37.</b> Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados: A) Socialización de los resultados preliminares del TIC a actores sociales interesados, que asistieron a la Casa Abierta organizada por la CIF; B) Presentación del poster científico; C) Socialización de los resultados del TIC, ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona; D) Elaboración de un manuscrito del artículo científico derivado del TIC; E) Elaboración de un manual técnico; F) Elaboración de un poster científico; y, G) Elaboración de un tríptico derivado de los resultados del TIC. ....	57

## Índice de anexos:

<b>Anexo 1.</b>	Visita por parte del Director del Trabajo de Integración Curricular (TIC), Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, a los ensayos instalados en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, para la inducción de estructuras callogénicas en <i>Cattleya maxima</i> Lindl, a partir de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.....	75
<b>Anexo 2.</b>	Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), bajo diferentes combinaciones hormonales auxina-citoquinina, a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	75
<b>Anexo 3.</b>	Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), bajo diferentes combinaciones hormonales auxina-citoquinina, a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total. ....	76
<b>Anexo 4.</b>	Poster científico con los resultados preliminares, para la difusión a los asistentes de la Casa Abierta, organizada el 28 de julio del 2023, por la Carrera de Ingeniería Forestal, de la UNL. ....	77
<b>Anexo 5.</b>	Tríptico para la difusión de los resultados del trabajo de investigación, a los actores sociales interesados. ....	78
<b>Anexo 6.</b>	Análisis de significancia del número de explantes contaminados de <i>Cattleya maxima</i> Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS). ....	80
<b>Anexo 7.</b>	Análisis de significancia del número de explantes fenolizados de <i>Cattleya maxima</i> Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS). ....	80
<b>Anexo 8.</b>	Análisis de significancia del número de explantes con formación de callo de <i>Cattleya maxima</i> Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).....	81
<b>Anexo 9.</b>	Análisis de significancia del número de brotes formados en las estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).....	81
<b>Anexo 10.</b>	Certificación de la traducción del Abstrac .....	82

## **1. Título**

Inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas

## 2. Resumen

Las orquídeas son especies vegetales que poseen importancia ecológica y económica, por el rol que cumplen en los bosques y la comercialización de las flores; pero presentan limitaciones en la germinación y el establecimiento en ambientes naturales. *Cattleya maxima* Lindl., es una especie altamente demandada por la vistosidad y belleza de las flores; encontrándose en el Apéndice II del CITES. A partir de ello, la biotecnología vegetal, mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, aporta a la conservación de especies vegetales de difícil propagación y multiplicación *in vivo*. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo inducir la formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl, en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), bajo diferentes concentraciones hormonales de auxina-citoquinina (2,4-D y BAP) y en condiciones de oscuridad total. El material vegetal utilizado fue obtenido de vitroplantas del banco de germoplasma del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UNL. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de fenolización, número de días a la contaminación, porcentaje de explantes con callo, número de días a la formación del callo, porcentaje de raíces, porcentaje de brotes, porcentaje de color del callo y porcentaje de friabilidad de los callos. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con ocho tratamientos y tres repeticiones. La evaluación de las variables se realizó durante 90 días, con registro de datos cada 5 días. Los resultados obtenidos muestran que la contaminación se presentó en los dos medios de cultivo evaluados; así, en KC el T2 obtuvo 13,33 % y en MS el T0 alcanzó 20 % de contaminación. El porcentaje de fenolización registrado no superó el 20 % en los dos medios de cultivo, para KC en el T5 y en MS en el T6. La formación de estructuras callogénicas en el medio de cultivo KC en los tratamientos T4 y T7 presentaron el 100 % de los explantes con formación de callo; mientras que, en MS los porcentajes obtenidos disminuyeron ligeramente en todos sus tratamientos; así, el T7 alcanzó el 93,33 %. La formación de estructuras callogénicas en el medio de cultivo de KC empezó a los 28 días luego de la inoculación y en MS la formación del callo inició a los 19 días. En la variable formación de raíces *de novo*, no se registró datos en ninguno de los tratamientos ensayados en los dos medios de cultivo hasta los 90 días de evaluación. La formación de brotes *de novo* en las estructuras callogénicas, en el medio de cultivo KC, el T4 registró el 43,33 % de formación; mientras que, en MS este porcentaje disminuyó considerablemente; así, en el mismo tratamiento solo se registró el 10 %. Con respecto, al color de las estructuras callogénicas, en KC en el tratamiento T4 predominó el color crema en el 93,33 % de los explantes, mostrando buen estado del callo; en tanto que, en MS el

T4 registró el 76,67 % de estructuras en color crema. Finalmente, la friabilidad de los callos formados disminuyó considerablemente en MS con respecto a KC; así, en KC, los tratamientos T4 y T5 presentaron el 70 % de callos friables cada uno y en MS el mayor porcentaje de friabilidad se registró T7 con el 26,67 %. Se concluyó que el balance hormonal auxina-citoquinina de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP (T7), resultó ser efectiva en la formación de estructuras callogénicas en los explantes obtenidos de las vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., en los dos medios de cultivo (Knudson-C y Murashige y Skoog) con el 100 % y 93,33 %, respectivamente.

**Palabras claves:** micropropagación, protocormos, callos, orquídeas, auxina-citoquinina

## Abstract

As a species of plants, orchids have a significant ecological and economic importance, as they are used in forests and in the commercialization of flowers; however, they are subject to limitations when it comes to germination and establishment in natural environments. *Cattleya maxima* Lindl. is a highly demanded species due to the showiness and beauty of its flowers; it is included in Appendix II of CITES. Consequently, plant biotechnology contributes to the preservation of species of plant that are difficult to propagate and multiply in vitro through the application of in vivo culture techniques. Hence, the present research attempted to induce the formation of callogenic structures in *Cattleya maxima* Lindl, in the culture medium of Knudson-C (KC-1946) and Murashige and Skoog (MS-1962), under different hormonal concentrations of auxin-cytokinin (2,4-D and BAP) and under total darkness conditions. The plant material used was obtained from vitroplants of the germplasm bank of the Plant Micropropagation Laboratory of the UNL. The variables evaluated were: percentage of contamination, percentage of phenolization, number of days to contamination, percentage of explants with callus, number of days to callus formation, percentage of roots, percentage of shoots, percentage of callus color and percentage of callus friability. A completely randomized experimental design was used, with eight treatments and three replications. In order to evaluate the variables, data was collected on a daily basis for 90 days. The results obtained show that contamination was present in the two culture media evaluated; thus, in KC, T2 obtained 13.33 % and in DM, T0 reached 20 % contamination. The percentage of phenolization recorded did not exceed 20 % in the two culture media, for KC at T5 and in MS at T6. There was a 100% callus formation rate in the KC culture medium in the T4 and T7 treatments, whereas the percentage in the MS culture medium was slightly lower across all treatments; thus, T7 reached 93.33%. The formation of callus structures in the KC culture medium began 28 days after inoculation and in MS callus formation began 19 days after inoculation. In the variable *de novo* root formation, no data were recorded in any of the treatments tested in the two culture media up to 90 days of evaluation. For callogenic structures with *de novo* shoots, T4 recorded 43.33 % of formation in the KC medium; however, in MS, this percentage decreased considerably; thus, only 10 % was observed in this same treatment. With respect to the color of the callus structures, in KC in the T4 treatment, 93.33 % of the explants were cream-colored, showing good callus condition; while in MS, T4 recorded 76.67 % of cream-colored structures. Accordingly, in DM, the callus formed had a much lower degree of friability than in KC. For example, in KC, treatments T4 and T5 both displayed 70 percent friable calli; in DM, treatment

T7 displayed 26.67 percent friability. It was concluded that the auxin-cytokinin hormonal balance of 10.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP (T7) proved to be effective in the formation of callogeneic structures in explants obtained from vitroplants of *Cattleya maxima* Lindl. in the two culture media (Knudson-C and Murashige and Skoog) with 100 % and 93.33 %, respectively.

**Key words:** micropropagation, protocorms, callus, orchids, auxin-cytokinin

### 3. Introducción

Las orquídeas poseen aproximadamente entre 25 a 30 mil especies (Nieto y Damon, 2014) y están presentes en casi todas las regiones del mundo a excepción de los polos, los nevados y los desiertos más áridos; el mayor número de registros de especies, se ha dado en Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador y Panamá (Cox et al., 2016). En Ecuador alrededor de un tercio de las especies de plantas endémicas conocidas, pertenecen a la familia Orchidaceae, albergando cuatro de las cinco subfamilias y más del 15 % de las orquídeas que existen a nivel mundial, hasta la actualidad se han registrado 4 032 especies, de las cuales 1 714 son endémicas y alrededor de 400 especies aún se encuentran en proceso de estudio y descripción. Esta variabilidad, se debe a los diferentes climas y microclimas existentes en cada región del Ecuador (Illescas, 2019); además, las orquídeas contribuyen con la generación, el mantenimiento y el flujo de servicios ecosistémicos (Castellanos y Torres, 2018).

Un género representativo de la familia Orchidaceae, es *Cattleya* y en Ecuador el género cuenta con tres especies nativas, siendo: *C. iricolor* Rchb.f., *C. maxima* Lindl. y *C. violacea* (Kunth) Rolfe (Jorgensen y León, 1999). *Cattleya maxima* fue descrita por primera vez por el Dr. John Lindley, la cual posee un alto valor comercial, por la vistosidad y belleza de las flores. Actualmente esta especie se encuentra en el Apéndice II del CITES (Álvarez et al., 2015).

La disminución de la cobertura vegetal en los bosques, trae consigo la alteración, destrucción y transformación de los ecosistemas, sumado a actividades económicas; tales como, el saqueo, la sobrecolecta y la extracción masiva de plantas, representando una amenaza constante para las especies de la familia Orchidaceae (Califa y Estupiñan, 2020). En Ecuador para el año 1990 la cobertura vegetal de los bosques nativos se mantenía en el 68 %, para el 2018 este porcentaje disminuyó considerablemente al 56 % (Sierra et al., 2021), afectando significativamente a las especies que habitan en estas zonas boscosas.

Las especies de la familia Orchidaceae, presentan condiciones fisiológicas que limitan la germinación y el establecimiento en ambientes naturales, debido a las características que poseen las semillas, ya que estas son muy pequeñas y no cuentan con las suficientes reservas nutricionales que favorezcan el crecimiento del embrión y su posterior desarrollo (Banda et al., 2017). A partir de ello, las orquídeas deben establecer asociaciones simbióticas; principalmente, con micorrizas para lograr la germinación, la cual en condiciones naturales puede llegar a ser



del 2 al 3 % (Pérez y Castañeda, 2016); a esto, se suma la baja tasa de crecimiento y ciclos de vida relativamente largos, ocasionando que la velocidad de recuperación de las poblaciones sea inferior a la tasa de extracción, llegando a provocar la extinción local de algunas de sus especies (Mata et al., 2021). Estas características limitan la propagación de forma natural, por lo que es necesario recurrir a técnicas de multiplicación *in vitro*.

En este contexto, la biotecnología vegetal constituye una herramienta alternativa para la conservación y propagación de germoplasma de especies vegetales, mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*. La micropropagación de tejidos vegetales, permite la propagación clonal y sexual masiva de orquídeas, en ambientes asépticos, obteniendo plantas libres de hongos o bacterias (Pedraza, 2017). Esta herramienta generalmente se emplea en especies que se encuentran en peligro de extinción o aquellas que presentan limitaciones en la germinación y propagación (Mata et al., 2021). A partir de ello, la callogénesis es una técnica que permite la regeneración masiva de material vegetal *in vitro*, generando un tejido callogénico, a partir de un explante (Páez et al., 2012), del cual se puede obtener varios callos de un callo principal (Lallana y Lallana, 2003); y, mediante la adición de reguladores de crecimiento, se consigue la desdiferenciación de callos mediante formación de órganos *de novo* (Páez et al., 2012), a partir de la organogénesis indirecta se puede generar plantas nuevas y completas, aportando de esta manera a la propagación de la especie *Cattleya maxima* Lindl.

En base a ello, se han realizado varios esfuerzos mediante el empleo de nuevas tecnologías y la estandarización procesos de propagación de orquídeas en ambientes controlados, mediante el uso de herramientas biotecnológicas, como los procesos de propagación *in vitro* (Gil et al., 2019). En la actualidad los métodos de cultivo *in vitro* están siendo utilizados con éxito para la conservación y propagación de especies de orquídeas en peligro de extinción (Deb y Pongener, 2011), lo cual ha permitido obtener buenos porcentajes de formación de callo (40 %) Robles (2022), y brotes *de novo* (47,2 %) (Gil et al., 2019).

Por lo mencionado anteriormente, la presente investigación titulada: **“Inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas”**, se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, desde el mes de marzo del 2023, hasta agosto del mismo año, la cual tuvo como propósito fundamental establecer una metodología apropiada para la formación de estructuras callogénicas, a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes

concentraciones hormonales auxina-citoquinina, en dos medios de cultivo, el de Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), en condiciones de oscuridad total, con el fin de conocer la interacción de cada medio de cultivo y la combinación hormonal probada en cada tratamiento. Además, esta investigación tuvo como finalidad generar información científica referente a métodos de propagación y conservación *in vitro*, mediante la aplicación del cultivo de tejidos vegetales, con el propósito de producir mayor cantidad de material vegetal, en un espacio reducido y en menor tiempo; y, así elevar la tasa de multiplicación potencial de la especie, aportando de esta forma a la conservación y protección de la misma, la cual tiene una gran importancia ecológica y económica.

En este contexto, los objetivos que orientaron la presente investigación fueron los siguientes:

**Objetivo general:**

- Contribuir a la generación de información científica, relacionada con la inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de vitroplantas, en dos medios de cultivo.

**Objetivos específicos:**

- Evaluar el efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC).
- Determinar el balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación

## 4. Marco teórico

### 4.1. Descripción de la familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae, es uno de los grupos de plantas más diversos; y, de las familias botánicas es la que mayor número de especies posee, con cerca de 25 mil especies conocidas a nivel mundial. Se encuentran distribuidas en casi todos los continentes, a excepción de la Antártida, pero su mayor diversidad se encuentra en zonas tropicales (Salazar, 2007). La diversidad de las Orchidaceae no solo se ve reflejada en su número de especies; sino también, en la cantidad de variantes morfológicas que existen dentro de la familia (Leopardo, 2008).

Las especies que forman parte de esta familia, brindan valiosos aportes ecológicos a los ecosistemas en que habitan y también poseen altos valores económicos, al ser comercializadas como flores de corte (Viveros y Molina, 2001), cabe mencionar que su comercialización está permitida siempre y cuando sean reproducidas artificialmente es decir mediante cultivo *in vitro* (Ministerio del Ambiente de Perú "MINAM", 2017).

### 4.2. Descripción del género *Cattleya*

Es uno de los géneros más representativos de la familia Orchidaceae, cuenta con aproximadamente 60 especies (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca "CVC" - Fundación Agua Viva "FUNAGUA" (ed.), 2011). Es nativo de América tropical, siendo el más cultivado y popular entre las orquídeas, debido a la gran variabilidad (Niessen y Calderon, 2002). Este género posee pseudobulbos cilíndricos y apicales, de hojas gruesas y una inflorescencia en racimo, dando lugar a majestuosas flores vistosas de gran tamaño. En Ecuador el género *Cattleya* cuenta con tres especies nativas, las especies reportadas son: *C. iricolor* Rchb.f., *C. maxima* Lindl. y *C. violacea* (Kunth) Rolfe l (Jorgensen y León, 1999).

### 4.3. Descripción de *Cattleya maxima* Lindl.

*Cattleya maxima* Lindl., fue descrita por primera vez por el Dr. John Lindley. Es una planta epífita con Pseudobulbos cilíndricos, de 2-3 nudos o separaciones de unos 25 cm de largo. Su inflorescencia va desde el ápice del pseudobulbo; tiene de 5 a 13 flores, son grandes y pueden medir 15 cm de longitud, poseen un color rosado-lila con nervaduras de color más claro en el labelo (Álvarez et al., 2015). Es una especie nativa (Cueva et al., 2014), que se

distribuye en los bosques secos de la costa y sur del Ecuador (Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Ecuador "MAATE", 2021).

*Cattleya maxima* presenta dos tipos de plantas: plantas de pseudobulbos más cortos y salpicados por manchas moradas y flores de color morado más intenso, originarias de los bosques secos del sur-occidente de Ecuador; y, plantas con pseudobulbos muy alargados que pueden alcanzar hasta medio metro de altura, con ausencia de manchas y flores de color más claro. Estas variedades son poco frecuentes y de altísimo interés comercial y ornamental alcanzando elevados precios en el mercado de orquídeas (MAATE, 2021).

#### **4.3.1. Taxonomía**

La taxonomía botánica de *Cattleya maxima* Lindl, se describe a continuación:

**Clase:** Equisetopsida C. Agarch

**Sub clase:** Magnoliidae Novák ex Takht

**Super orden:** Lilianae Takht.

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Orchidaceae Juss

**Género:** *Cattleya*

**Especie:** *maxima*

**Nombre común:** catleya, amancay, magdalena

#### **4.3.2. Distribución geográfica**

Se encuentra distribuida en Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador y Panamá (Cox et al., 2016). En el Ecuador se la puede encontrar en las provincias de El Oro, Guayas, Loja y Manabí (Figura 1) (Sánchez y Rodríguez, 2018). Se distribuye entre los 0 – 1 500 m s.n.m. (Arosemena, 2017).

En Ecuador existen orquídeas endémicas en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 - 4 500 m s.n.m. Un análisis de covarianza con una corrección de área indica que, la mayor diversidad de orquídeas se encuentra entre los 1 000 – 3 000 m s.n.m. y el pico de diversidad entre los 1 500 - 2 500 m s.n.m. (Endara et al., 2006).

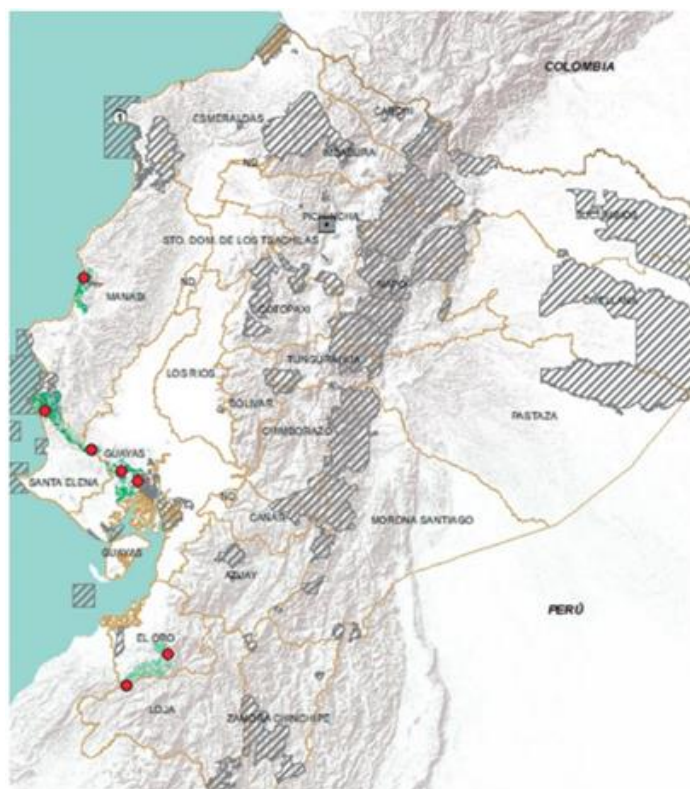


Figura 1. Distribución geográfica de *Cattleya maxima* Lindl., en los bosques secos de la costa y el sur del Ecuador (MAATE, 2021).

#### 4.3.3. Usos

Tradicionalmente las orquídeas tienen usos ornamentales y medicinales (Alvarado, 2000). En la actualidad se emplean también en la gastronomía dado a que las flores son comestibles, poseen bajo porcentaje de colorías y el uso principal radica en la apariencia y sabor agradable que le puede dar a los alimentos. Además, mejora la parte estética de los mismos y brinda tonalidades de frescura y un sabor poco inusual, los olores y colores pueden llegar a estimular los sentidos (Armijos, 2018).

#### 4.3.4. Estado de conservación

Según el CITES, actualmente la especie se encuentra en la **categoría II**; es decir, que **no está necesariamente amenazada de extinción**, pero que podría llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente el comercio, la principal amenaza por la que se encuentra en peligro es la destrucción del hábitat (Sánchez y Rodríguez, 2018) y la constante presión antrópica que recibe; además, que posee bajos porcentajes de germinación y propagación en condiciones naturales. Según la lista roja nacional en Ecuador se encuentra en peligro (MAATE, 2021).

#### **4.4. Micropropagación vegetal *in vitro***

La micropropagación, se basa en la propagación de plantas en un ambiente artificial en condiciones controladas, empleando un medio de cultivo adecuado que proporcione las condiciones nutricionales necesarias para que las plantas se desarrollen; posee dos características fundamentales: la asepsia y el control de factores que afectan al crecimiento (Castillo, 2008). Según Flores et al. (2017) el cultivo *in vitro*, es una técnica que facilita la germinación y propagación de prácticamente cualquier orquídea, ya que se lleva a cabo en condiciones de asepsia, en presencia de una fuente de nutrimentos y condiciones físicas controladas, lo que potencializa la capacidad de reproducción y crecimiento.

#### **4.5. Medio de cultivo**

Un medio de cultivo contiene un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes, que brindan las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos que se desea propagar. Existe una gran variedad de medios de cultivos, su composición dependerá de la especie que se desee propagar (Gonzalez et al., 2018).

Generalmente, los medios de cultivos están constituidos de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento. La composición del medio de cultivo garantiza que se suministren los nutrientes que el tejido vegetal a cultivar necesita y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales, que le ofrece el medio natural a la planta (Sharry et al., 2020).

##### **4.5.1. Composición química del medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946)**

En 1922 Lewis Knudson (1884-1958) describió la germinación asimbiótica de orquídeas, en un medio de cultivo aséptico en ausencia de hongos, con los cuales naturalmente germina (Suzuki et al., 2010). Sin embargo, el medio de cultivo desarrollado por Knudson-C (KC) en 1964, es el más aceptado para el cultivo *in vitro* de especies de orquídeas (Tabla 1). Todo medio está compuesto por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos y una fuente de carbono. La inducción de una ruta morfogénica (organogénesis, embriogénesis, callogénesis) es regulada por la composición del medio de cultivo y la adición de reguladores de crecimiento (Gonçalves et al., 2016).

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Knudson - C (KC-1946).

N°	Componentes	Nutrientes	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>			
1	Sulfato de amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500
2	Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	122
3	Nitrato de calcio tetrahidratado	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	694
4	Fosfato dipotásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250
<b>Micronutrientes</b>			
5	Yoduro de potasio	KI	0,83
6	Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,056
7	Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	5,68
8	Trióxido de molibdeno	MoO <sub>3</sub>	0,016
9	Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,062
10	Sulfato ferroso heptahidrato	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25

#### 4.5.2. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962)

El medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962) es el más conocido y usado en el campo de la micropropagación vegetal, ya que contiene los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de especies vegetales a excepción de aquellas que son sensibles a la salinidad. Además, ha sido utilizado para la creación de mezclas comerciales permitiendo la propagación masiva de plantas (Rodríguez et al., 2004).

Para que el medio de cultivo sea adecuado, se debe calcular las cantidades exactas de sus componentes, a partir del volumen del medio a preparar (Tabla 2).

Tabla 2. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962).

N°	Solución madre	Componentes	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
1	Nitratos	Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1 650,00
		Nitrato de potasio (NO <sub>3</sub> K)	1 900,00
2	sulfatos	Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	370,00
		Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	22,3
		Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	8,60
		Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0,025
		Sulfato de cobalto (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0,025
3	Haloides	Cloruro de potasio (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	440,00
		Yoduro de potasio (KI)	0,83
		Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0,025
4	P, B, Mo	Fosfato di básico de potasio (KH <sub>2</sub> ·PO <sub>4</sub> )	170,00
		Ácido bórico (H <sub>3</sub> ·BO <sub>3</sub> )	6,20
		Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0,25
		Sulfato ferroso (FaSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	27,81
5	Na, Fe, EDTA	Ácido Etildiaminotetraacético (Na <sub>2</sub> EDTA)	37,31

#### 4.6. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento vegetal, son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos, son similares a las fitohormonas y desarrollan un papel importante en la regulación de varios procesos bioquímicos en los organismos vegetales. Existen diversos tipos de reguladores, que son capaces de promover o inhibir el crecimiento vegetal. Estos se clasifican dependiendo de la capacidad o estimulación que cada uno posee sobre el órgano a propagar, las que generalmente se utilizan son las auxinas, citoquininas y giberelinas (Alcantara et al., 2019).



#### **4.6.1. Auxinas**

Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales descubiertas, son capaces de regular muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas (Jordán y Casaretto, 2006). Son el grupo principal de fitohormonas, están presentes en todos los procesos de desarrollo de las plantas e intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación celular. El compuesto más abundante y fisiológicamente más importantes es el Ácido Indol Acético (AIA) (Arroyo et al., 2014).

Las auxinas promueven elongación celular y expansión de los tejidos, división celular, formación de raíces adventicias, inhibición de la creación de vástagos axilares y adventicios, y repetidamente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990).

##### **4.6.1.1. Ácido diclorofenoxiacético (2-4, D)**

El 2,4-D es una auxina que se usa en el cultivo *in vitro* para la formación de callos y la inducción de embriones somáticos. También se ha usado como regulador de crecimiento en varias especies obteniendo buenos resultados (Espinosa et al., 2012).

##### **4.6.1.2. Ácido indol acético (AIA)**

La auxina (AIA), generalmente produce elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhibición de brotes axilares y adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990).

#### **4.6.2. Citoquininas o citocininas**

Las citoquininas son capaces de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, inducen la iniciación y elongación de las raíces. Esta fitohormona normalmente es considerada como inhibidor del crecimiento debido a que puede detener el proceso de germinación vegetal (Alcantara et al., 2019).

Las citocininas más utilizadas y comunes son: kinetina (KIN), 2 isopentil adenina (2iP), bencil amino purina (BAP) y bencil adenina (BA), las cuales estimulan crecimiento y desarrollo

de las plantas, pero cuando van acompañadas por auxinas generan división celular pueden impulsar la formación de vástagos axilares, disminuir la dominancia apical y retardar el envejecimiento (Pierik, 1990).

#### **4.6.2.1. Bencil amino purina (BAP).**

La citoquinina BAP, es un regulador de crecimiento sintético implicado en la mejora de la proliferación de brotes y elongación (Larson et al., 2017). También, tiene un marcado efecto en la formación y multiplicación de yemas axilares y adventicias en los cultivos *in vitro* (Bermúdez et al., 2017).

#### **4.6.2.2. Kinetina (KIN).**

La citoquinina KIN se utiliza para estimular el crecimiento y desarrollo; además, sirven para estimular la división celular. La kinetina en concentraciones elevadas (1,0 - 10 mg L<sup>-1</sup>) induce la formación de brotes adventicios e inhibe la formación de raíces y retarda el envejecimiento (Pierik, 1990).

### **4.7. Condiciones ambientales del cultivo *in vitro***

Los medios de cultivos deben estar en condiciones ambientales similares a las naturales, de esta manera se favorece el crecimiento y desarrollo de los tejidos inoculados *in vitro*. La temperatura, la luz y la humedad relativa, son factores que inciden directamente en la proliferación de los explantes sembrados en condiciones controladas (Llorente, 2002).

#### **4.7.1. Temperatura**

La temperatura desempeña un papel importante en los cultivos de tejidos *in vitro*, ya que reduce la actividad metabólica y en consecuencia el crecimiento de los explantes (Sánchez y Jiménez, 2010). La temperatura de las cámaras de cultivo se regulan entre 22 - 28 °C, permitiendo el desarrollo de especies de climas templados y tropicales, durante el período iluminado, la temperatura en el interior de los frascos de cultivo es 1 – 2 °C superior a la de la cámara debido al efecto invernadero (Llorente, 2002).

Al disminuir la temperatura, se produce una reducción en la actividad metabólica y en el crecimiento de los explantes. La temperatura va a depender del requerimiento de cada especie (Sánchez y Jiménez, 2010).

#### **4.7.2. Luz**

La calidad, cantidad y fotoperiodo de la luz, influyen en el comportamiento de los medios de cultivo, ya que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario, son influenciadas por la luz. Generalmente se usa la luz blanca, el fotoperiodo generalmente usado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (16/8), aunque algunos cultivos requieren de completa oscuridad (Llorente, 2002).

#### **4.7.3. Humedad relativa**

En lo que concierne a la humedad relativa, ésta se mantiene en alrededor del 70 % en las condiciones en las que habitualmente se encuentran los cultivos, aunque varía con la temperatura de la cámara y el tipo y cierre de los recipientes (Llorente, 2002).

Generalmente las plantas cultivadas *in vitro* crecen en condiciones de humedad relativa alta (Pérez et al., 2014). Para el desarrollo de las células vegetativas, es necesario un nivel de humedad adecuado, dicho nivel varía entre los 35 - 37 °C (Cueva et al., 2014).

### **4.8. Cultivo de callos**

El cultivo de callos se puede usar con el propósito de mejoramiento vegetal o micropropagación. El callo es una masa amorfa de células no diferenciadas, la producción de callo requiere de un explante inicial, ya sea un segmento de raíz, tallo u hoja que pueda tener una alta diferenciación de sus tejidos o bien usar tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas, e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros (Rodríguez et al., 2014).

El cultivo de callos es a menudo de crecimiento lento y heterogéneo, debido generalmente a la disponibilidad de nutrientes. Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos según la especie (30 - 45 días). La tasa de

crecimiento y las características de friabilidad dependen de la especie, del balance hormonal, de la concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Llorente, 2002).

#### **4.8.1. Callogénesis *in vitro* de *Cattleya maxima* Lindl.**

La callogénesis es uno de los métodos para reproducir masivamente material vegetal en condiciones *in vitro*. La característica más importante de los callos es su capacidad para formar raíces, tallos y embriones capaces de generar plantas completas; sin embargo, su inestabilidad genética provoca variaciones fenotípicas en las células siendo este un problema (González et al., 2002).

La adición de reguladores de crecimiento (auxinas, citoquinas o giberelinas) no siempre favorece a la estimulación del desarrollo de vitroplantas, debido a que se puede presentar la aparición y el aumento del desarrollo de callogénesis, lo cual, está directamente relacionado con una disminución del crecimiento, principalmente, a nivel del rizoma (Gil et al., 2019).

La inducción de callos se obtiene por la adición de auxinas, la fuente del explante no importa ya que tanto en segmentos de hoja como de protocormos y pseudobulbos se produce callogénesis. Las características que presentan los callos son similares en todas las orquídeas, generalmente son granuloso de color verde claro y poseen alta capacidad regenerativa (Ávila y Salgado, 2006).

#### 4.9. Estudios realizados en micropropagación de *Cattleya* spp.

Tabla 3. Recopilación de estudios realizados en micropropagación de *Cattleya* spp.

<b>Autores</b>	<b>año</b>	<b>Tema</b>
Briceño, I.	2004	Propagación vegetativa, fenología y comercio de seis especies del género <i>Cattleya</i> Lindl. (Orchidaceae).
Ávila y Salgado	2006	Propagación y mantenimiento <i>in vitro</i> de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación.
Cueva y Rino	2018	Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> de la orquídea silvestre <i>Cattleya maxima</i> Lindl.
Gil et al.,	2019	Inducción de organogénesis <i>in vitro</i> con 6-bencilaminopurina en <i>Cattleya trianae</i> Linden y Rchb.f.
Cueva et al.,	2020	Aislamiento, análisis filogenético y expresión de un gen del receptor de embriogénesis somática como quinasa (SERK) en <i>Cattleya maxima</i> Lindl.
Saravia et al.,	2022	Las auxinas y las citoquininas provocan una respuesta diferenciada en la formación de brotes y raíces en <i>Cattleya maxima</i> Lindl y <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L) Blume.
Robles, A.	2022	Influencia de la sacarosa en la germinación <i>in vitro</i> de semillas e inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.
Hariyadi et al.,	2023	Formación de respuesta de callo de hoja de orquídea <i>Cattleya</i> ( <i>Cattleya</i> sp.) con la adición de ácido acético 2,4 diclorofenoxi y 6-bencil amino purina <i>in vitro</i> .
Lisboa et al.,	2023	Extracción de ADN en especies del género <i>Cattleya</i> (Epidendroideae: Orchidaceae).

## 5. Metodología

### 5.1. Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, de la Universidad Nacional de Loja, el cual está ubicado en el Bloque 15 del campus universitario, en el cantón y provincia de Loja (Figura 2), entre las siguientes coordenadas geográficas: 04° 00' 00" S - 79° 12' 00" O (Eras et al., 2019).



Figura 2. Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL.

### 5.2. Selección del material vegetal

A partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de semillas germinadas *in vitro* en el trabajo de investigación de Robles (2022), desarrollado en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, se obtuvieron 240 protocormos para cada ensayo; los cuales presentaron condiciones fisiológicas adecuadas, en cuanto a color, tamaño y sin hojas, ni raíces. Cabe mencionar que no fue necesario desinfectar el material vegetal, por tratarse de material vegetal que creció en condiciones asépticas.

### 5.3. Metodología para evaluar el efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), en oscuridad total.

Para dar cumplimiento al primer objetivo, los explantes (protocormos) fueron inoculados en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), con diferentes combinaciones hormonales, según su tratamiento, e incubados en el cuarto de crecimiento, en condiciones de oscuridad total.

#### 5.3.1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales (macro y micronutrientes) de Knudson-C (KC-1946), sólido; el cual, estuvo suplementado con: 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de tiamina (Vitamina B1) + 20,0 g L<sup>-1</sup> de sacarosa + 2,0 g L<sup>-1</sup> de carbón activado y 6,0 g L<sup>-1</sup> de agar. Posteriormente se ajustó el pH a 5,8 ± 0,2, se distribuyó a razón de 25 ml L<sup>-1</sup> en cada frasco de vidrio y se esterilizó en autoclave, a una temperatura de 120 °C y 1,5 kg/cm<sup>2</sup> de presión, durante 20 minutos (Figura 3).

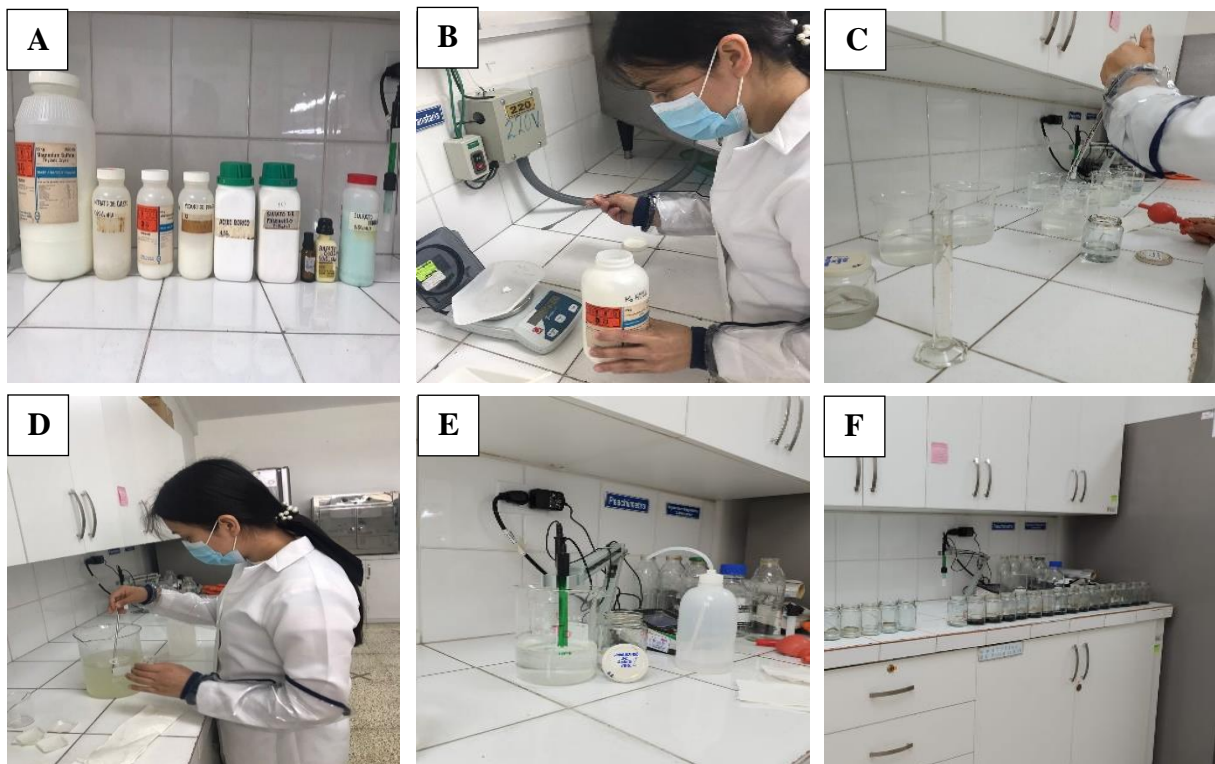


Figura 3. Preparación del medio de cultivo de Knudson C (KC-1946): A) Macro y micronutrientes; B) Pesaje de sales minerales; C) Adición de mio-inositol y tiamina; D) Disolución de sales minerales; E) Medición de pH; y, F) Distribución de 25 ml en los frascos de vidrio de cada tratamiento.

Las combinaciones hormonales auxina-citoquinina, empleadas para la inducción de estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes (protocormos) obtenidos de vitroplantas, se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

No.	Tratamientos	Regulador de crecimiento	
		2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
1.	T0	0,0	0,0
2.	T1	5,0	0,0
3.	T2	7,5	0,0
4.	T3	10,0	0,0
5.	T4	0,0	1,0
6.	T5	5,0	1,0
7.	T6	7,5	1,0
8.	T7	10,0	1,0

### 5.3.2. Inoculación *in vitro* de los explantes

La inoculación *in vitro* se realizó en la cámara de flujo laminar; donde con ayuda del bisturí, pinzas y cerca del mechero bunsen, se tomaron los protocormos con una espátula y se inocularon en el medio de cultivo, que contenía la concentración hormonal auxina-citoquinina, correspondiente a cada tratamiento, se colocaron a razón de dos explantes en cada frasco (Figura 4).

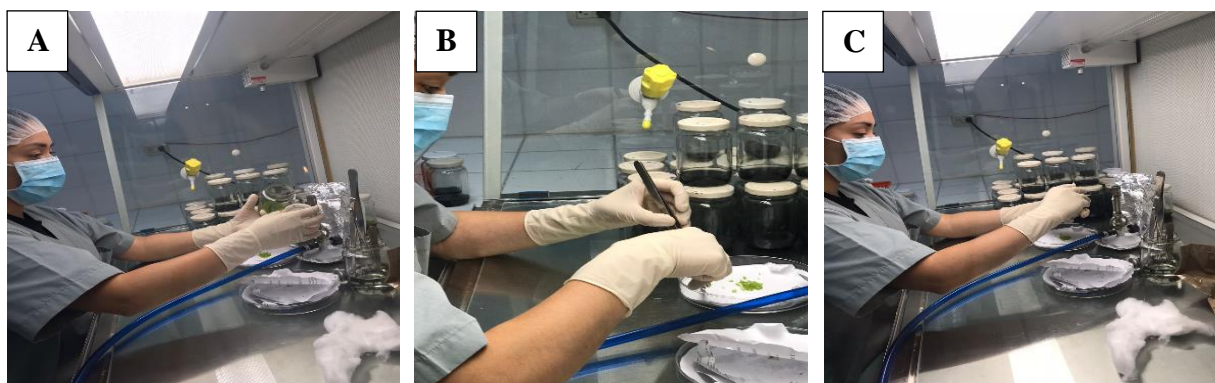


Figura 4. Inoculación *in vitro* de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson C (KC-1946): A) Flameado del frasco con el material vegetal inoculado; B) Disección y selección de protocormos adecuados para la siembra; y, C) Siembra *in vitro* de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl.



### 5.3.3. Incubación *in vitro*

La incubación de los protocormos se realizó en condiciones de oscuridad total, para ello se cubrieron los frascos de vidrio inoculados, con una cartulina de color negro, con la finalidad de recrear una cámara oscura y al mismo tiempo, incrementar la temperatura de incubación de los explantes (Figura 5).

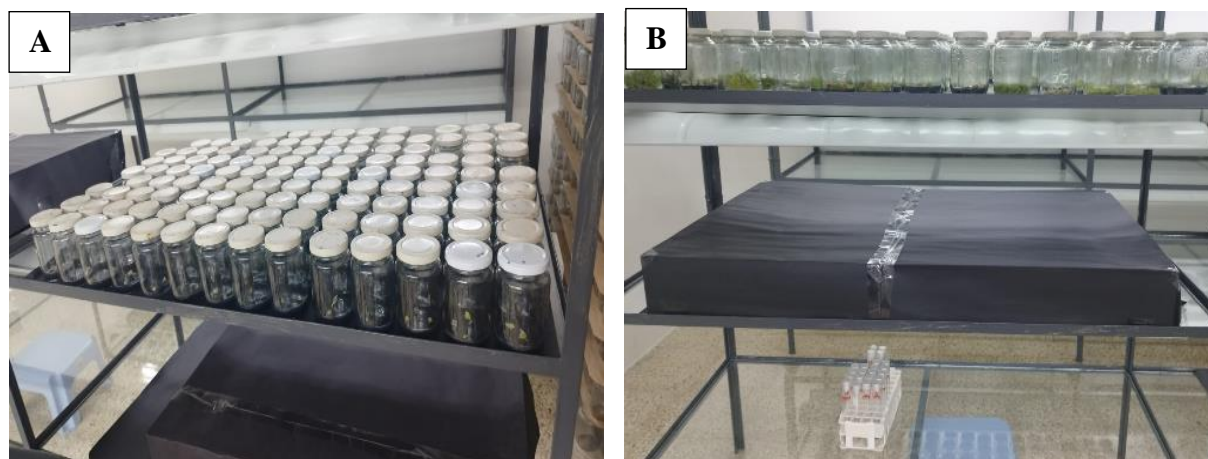


Figura 5. Incubación *in vitro* de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en el cuarto de luces del LMV-UNL: A) Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones para la incubación; y, B) Ensayo cubierto con cartulina para generar cámara oscura.

### 5.3.4. Diseño experimental

Para la evaluación del efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), para la inducción *in vitro* de estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en condiciones de oscuridad total, se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con ocho tratamientos y tres repeticiones (Tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

No.	Tratamientos	Regulador de crecimiento		Codificación
		2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	
1.	T0	0,0	0,0	T0A0C0OSC
2.	T1	5,0	0,0	T1A1C0OSC
3.	T2	7,5	0,0	T2A2C0OSC
4.	T3	10,0	0,0	T3A3C0OSC
5.	T4	0,0	1,0	T4A0C1OSC
6.	T5	5,0	1,0	T5A1C1OSC
7.	T6	7,5	1,0	T6A2C1OSC
8.	T7	10,0	1,0	T7A3C1OSC

Leyenda: T = Tratamiento. A = Auxina. C = Citoquinina. OSC = Oscuridad.

#### 5.3.4.1. Factores y niveles.

Los factores, niveles y las concentraciones hormonales evaluadas, se detallan en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6. Factores y niveles de las concentraciones auxina-citoquinina utilizadas, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

Factores	Niveles mg L <sup>-1</sup>
Nivel de concentración de auxina (A)	1. 0,0
	2. 5,0
	3. 7,5
	4. 10,0
Nivel de concentración de citoquinina (C)	1. 0,0
	2. 1,0

#### 5.3.4.2. Especificaciones del diseño experimental.

La unidad experimental fue un explante (protocormo), se inocularon dos explantes por cada frasco de vidrio, con un total de 30 explantes en cada uno de los tratamientos, dando un total para todo el ensayo de 240 explantes o unidades experimentales, los cuales, permanecieron incubados en oscuridad total.

Unidad experimental	Un explante
Número de tratamientos	8
Número de repeticiones	3
Número de frascos por tratamiento	15
Número de frascos por repetición	5
Número de frascos del ensayo	120
Número de explantes por frasco	2
Número de explantes por repetición	10
Número de explantes por tratamiento	30
Número de explantes del ensayo	240

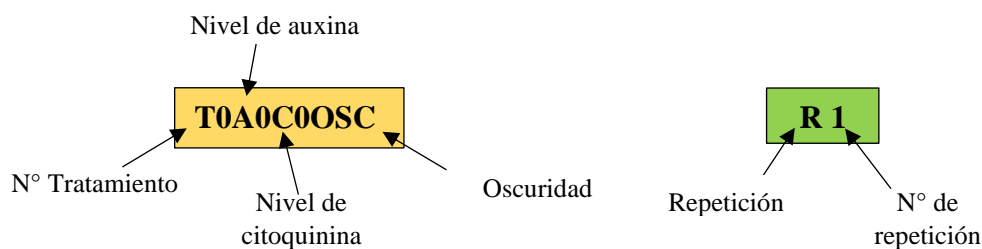
**5.3.5. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo, en el cuarto de incubación del laboratorio**

Los tratamientos y repeticiones del ensayo, empleados para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo KC-1946, a partir de protocormos *in vitro*, se distribuyeron en el cuarto de incubación, en oscuridad total, de la siguiente manera (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el laboratorio, para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl, en condiciones de oscuridad total.

<b>T0A0C0OSC</b>			<b>T1A1C0OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T2A2C0OSC</b>			<b>T3A3C0OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T4A0C1OSC</b>			<b>T5A1C1OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T6A2C1OSC</b>			<b>T7A3C1OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3

Leyenda: T = Tratamiento; R= Repetición; A= Auxina; C=Citoquinina y OBS: oscuridad



### 5.3.6. Variables de evaluación

La evaluación de las variables se realizó mediante observación directa, cada cinco días, por un tiempo de 90 días, luego de la inoculación de los explantes. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- Número de explantes contaminados
- Número de explantes fenolizados
- Número de días a la contaminación
- Número de explantes con callo
- Número de raíces por callo
- Número de brotes por callo
- Número de días a la formación del callo
- Color del callo
- Friabilidad del callo

Para registrar los datos del número de explantes contaminados y número de explantes fenolizados, se utilizó la siguiente matriz de registro (Tabla 8).

Tabla 8. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados, y número de explantes fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total.

Fecha de siembra:				Tratamiento:					
N° de días	Fecha	N° de frasco	N° total de explantes	N° de Explantes contaminados			N° de Explantes fenolizados		
				R1	R2	R3	R1	R2	R3
		Fn	1						
			2						

Leyenda: Fn = Número de frasco, R= Repetición

Para el registro de datos, del número de explantes con callo, número de raíces por callo, número de brotes por callo, color del callo y friabilidad del callo, se utilizó la siguiente matriz de evaluación (Tabla 9).

Tabla 9. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes con callo, número de raíces *de novo* por callo, número de brotes *de novo* por callo, color del callo y friabilidad del callo, en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total.

Ensayo:				Fecha de siembra:								
Variable:				N° de explante:								
N° de Trat	Rep.	N° de frasco	Días							Total	Observaciones	
			5	10	15	20	25	30..	90			
Tn	R1	F1										
		F2										
		F3										
		F4										
		F5										
	R2	F1										
		F2										
		F3										
		F4										
		F5										
	R3	F1										
		F2										
		F3										
		F4										
		F5										

Leyenda: Tn= Tratamiento; F= Frasco; R= Repetición

Para la evaluación del número de explantes con callo, el color y la friabilidad del callo, se utilizó la siguiente escala (Tabla 10):

Tabla 10. Escala para evaluar el porcentaje de formación de callo, color y friabilidad del callo; en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

Criterios para la evaluación de los callos			
	Formación de callo:	Color	Friabilidad:
- =	0 % Sin formación	CF = Café	
+ =	25 %: pobre (formado de ¼ del explante)	C = Carmelita	F = Friable
++ =	50 %: regular (formado de ½ del explante)	CR = Crema	NF = No friable
+++ =	75 %: bueno (formado de ¾ del explante)	V = Verde	
++++ =	100 %: muy bueno (formado en todo el explante)		

Fuente: Laboratorio de Micropropagación Vegetal, 2023.

### **5.3.7. *Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se cumplió con los principios estadísticos de distribución normal de los datos, homogeneidad de varianza e independencia de los errores, en el software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020); y, posteriormente se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia del 0,05 %.

#### 5.4. Metodología para determinar el balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962).

Para el cumplimiento del segundo objetivo de la presente investigación, los explantes fueron inoculados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), bajo diferentes combinaciones hormonales, según el tratamiento, e incubados en el cuarto de crecimiento, en condiciones de oscuridad total.

##### 5.4.1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo basal utilizado fue de Murashige y Skoog (MS-1962) sólido, el cual, a más de las sales minerales, estuvo suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de tiamina (Vitamina B1) + 20,0 g L<sup>-1</sup> de sacarosa + 2,0 g L<sup>-1</sup> de carbón activado y 6,0 g L<sup>-1</sup> de agar. Posteriormente se ajustó el pH del medio de cultivo a 5,8 ± 0,2 y se distribuyó 25 ml L<sup>-1</sup> de medio de cultivo en cada frasco de vidrio. Finalmente se esterilizó en autoclave a una temperatura de 120 °C y 1,5 kg/cm<sup>2</sup> de presión, durante 20 minutos (Figura 6).

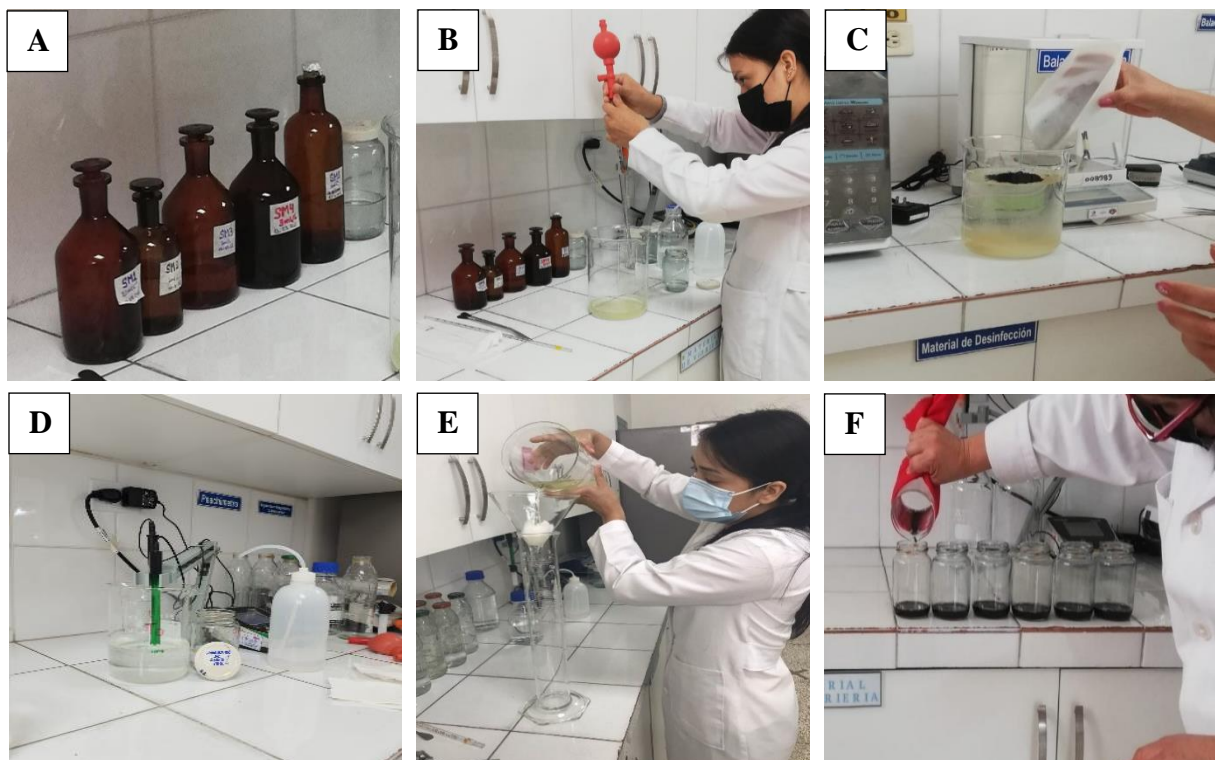


Figura 6. Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962): A) Soluciones madre; B) Medición de volúmenes correspondientes de cada solución madre; C) Adición de sacarosa y carbón activo; D) Medición del pH; E) Filtración del medio de cultivo; y, F) Distribución de 25 ml del medio de cultivo en los frascos de vidrio de cada tratamiento.

Las combinaciones hormonales auxina-citoquinina, que se utilizó, para la inducción de estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

No.	Tratamientos	Regulador de crecimiento	
		2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
1.	T0	0,0	0,0
2.	T1	5,0	0,0
3.	T2	7,5	0,0
4.	T3	10,0	0,0
5.	T4	0,0	1,0
6.	T5	5,0	1,0
7.	T6	7,5	1,0
8.	T7	10,0	1,0

#### 5.4.2. Inoculación *in vitro* de los explantes

La inoculación *in vitro* se realizó en la cámara de flujo laminar; para lo cual, con ayuda de un bisturí, pinzas y cerca del mechero bunsen, se tomó con una espátula los protocormos y se inocularon en el medio de cultivo que contenía la concentración hormonal auxina-citoquinina correspondiente a cada tratamiento, se colocaron a razón de dos explantes en cada frasco (Figura 7).

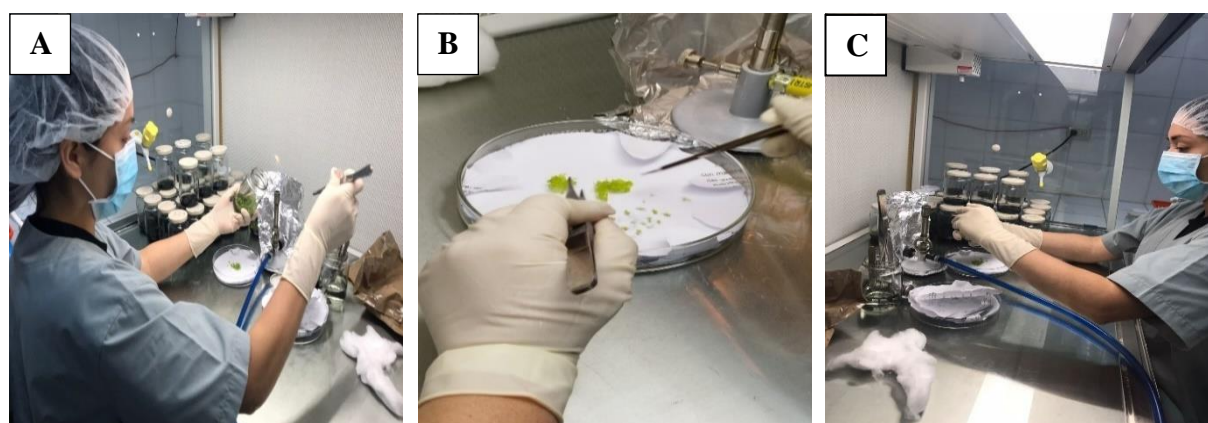


Figura 7. Inoculación *in vitro* de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962): A) Flameado del frasco con el material vegetal; B) Disección y selección de protocormos adecuados para la siembra; y, C) Siembra *in vitro* de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl.



### 5.4.3. Incubación *in vitro*

La incubación de los protocormos se realizó en oscuridad total, para ello se cubrieron los frascos de vidrio inoculados, con una cartulina de color negro, con la finalidad de recrear una cámara oscura y al mismo tiempo, incrementar la temperatura de incubación de los explantes (Figura 8).

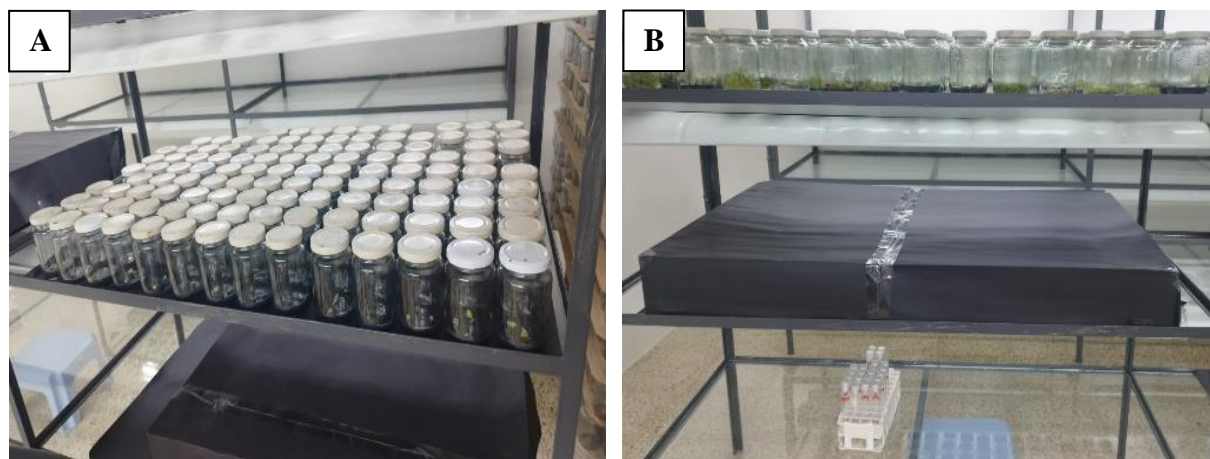


Figura 8. Incubación *in vitro* de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl en el cuarto de luces: A) Distribución espacial por tratamientos y repeticiones; y, B) Ensayo en oscuridad total.

### 5.4.4. Diseño experimental

Para la evaluación del efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), para la inducción *in vitro* de estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en condiciones de oscuridad total, se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con ocho tratamientos y tres repeticiones (Tabla 12).

Tabla 12. Tratamientos para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

No.	Tratamientos	Regulador de crecimiento		Codificación
		2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	
1.	T0	0,0	0,0	T0A0C0OSC
2.	T1	5,0	0,0	T1A1C0OSC
3.	T2	7,5	0,0	T2A2C0OSC
4.	T3	10,0	0,0	T3A3C0OSC
5.	T4	0,0	1,0	T4A0C1OSC
6.	T5	5,0	1,0	T5A1C1OSC
7.	T6	7,5	1,0	T6A2C1OSC
8.	T7	10,0	1,0	T7A3C1OSC

Leyenda: T = Tratamiento. A = Auxina. C = Citoquinina. OSC = Oscuridad.

#### 5.4.4.1. Factores y niveles.

Los factores, niveles y las concentraciones hormonales evaluadas, se detallan a continuación (Tabla 13):

Tabla 13. Factores y niveles de las concentraciones auxina-citoquinina utilizadas, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

Factores	Niveles mg L <sup>-1</sup>
Nivel de concentración de auxina (A)	1. 0,0
	2. 5,0
	3. 7,5
	4. 10,0
Nivel de concentración de citoquinina (C)	1. 0,0
	2. 1,0

#### 5.4.4.2. Especificaciones del diseño experimental.

La unidad experimental fue un explante (protocormo), se inocularon dos explantes en cada frasco de vidrio, con un total de 30 explantes en cada uno de los tratamientos, dando un total para todo el ensayo de 240 explantes o unidades experimentales, los cuales, permanecieron incubados en oscuridad total.

Unidad experimental	Un explante
Número de tratamientos	8
Número de repeticiones	3
Número de frascos por tratamiento	15
Número de frascos por repetición	5
Número de frascos del ensayo	120
Número de explantes por frasco	2
Número de explantes por repetición	10
Número de explantes por tratamiento	30
Número de explantes del ensayo	240

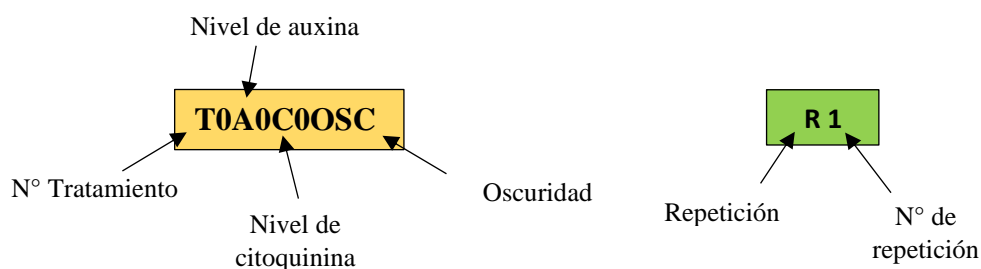
#### 5.4.5. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo, en el cuarto de incubación del laboratorio

Los tratamientos y repeticiones del ensayo, empleados para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de MS-1962, a partir de protocormos *in vitro*, se distribuyeron en el cuarto de incubación, en oscuridad total, de la siguiente manera (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el laboratorio, para evaluar la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl, en condiciones de oscuridad total.

<b>T0A0C0OSC</b>			<b>T1A1C0OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T2A2C0OSC</b>			<b>T3A3C0OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T4A0C1OSC</b>			<b>T5A1C1OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T6A2C1OSC</b>			<b>T7A3C1OSC</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3

Leyenda: T = Tratamiento; R= Repetición; A= Auxina; C=Citoquinina y OBS: Oscuridad



#### 5.4.6. Variables de evaluación

La evaluación de las variables se realizó mediante observación directa, cada cinco días, por un tiempo de 90 días, luego de la inoculación. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- Número de explantes contaminados
- Número de explantes fenolizados
- Número de días a la contaminación
- Número de explantes con callo
- Número de raíces por callo
- Número de brotes por callo
- Número de días a la formación del callo
- Color del callo
- Friabilidad del callo

Para el registro de los datos, del número de explantes contaminados y número de explantes fenolizados, se utilizó matriz de registro (Tabla 15).

Tabla 15. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados y número de explantes fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total.

Fecha de siembra:				Tratamiento:					
N° de días	Fecha	N° de frasco	N° total de explantes	N° de Explante contaminados			N° de Explante fenolizados		
				R1	R2	R3	R1	R2	R3
		Fn	1						
			2						

Leyenda: Fn = Número de frasco y R = Repetición

Para el registro de datos, del número de explantes con callo, número de raíces por callo, número de brotes por callo, color del callo y friabilidad del callo, se utilizó la siguiente matriz de evaluación (Tabla 16).

Tabla 16. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes con callo, número de raíces *de novo* por callo, número de brotes *de novo* por callo, color del callo y friabilidad del callo, en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, utilizando diferentes combinaciones hormonal auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total.

Ensayo:				Fecha de siembra:							
Variable:				N° de explante:							
N° de	Trat	Rep	N° de frasco	Días						Total	Observaciones
				5	10	15	20	25	30..		
			F1								
			F2								
		R1	F3								
			F4								
			F5								
			F1								
			F2								
Tn		R2	F3								
			F4								
			F5								
			F1								
			F2								
		R3	F3								
			F4								
			F5								

Leyenda: Tn= Tratamiento; F= Frasco; R= Repetición

Para la evaluación del número de explantes con callo, el color y la friabilidad del callo, se utilizó la siguiente escala (Tabla 17):

Tabla 17. Escala para evaluar el porcentaje de formación de callo, color y friabilidad del callo; en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

Criterios para la evaluación de los callos			
Formación de callo:		Color:	Friabilidad:
- =	0 % Sin formación	CF = Café	
+ =	25 %: pobre (formado de ¼ del explante	C = Carmelita	F = Friable
++ =	50 %: regular (formado de ½ del explante	CR = Crema	NF = No friable
+++ =	75 %: bueno (formado de ¾ del explante	V = Verde	
++++ =	100 %: muy bueno (formado en todo el explante		

Fuente: Laboratorio de Micropropagación Vegetal, 2023.

#### **5.4.7. *Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se cumplió con los principios estadísticos de distribución normal de los datos, homogeneidad de varianza e independencia de los errores, en el software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020); y, posteriormente se aplicó la prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis), con un nivel de significancia del 0,05 %.

### **5.5. Metodología para la difusión de los resultados de la investigación, a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.**

La difusión de los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC), se realizó mediante el cumplimiento de las siguientes actividades:

- Socialización de los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC), ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación *Cinchona* del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja y a los tesisistas del mismo.
- Socialización de poster científico con los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC), en la Casa Abierta de la Carrera de Ingeniería Forestal, realizado el 28 de julio del 2023.
- Elaboración de un tríptico y póster para la difusión de resultados del Trabajo de Integración Curricular (TIC).
- Elaboración de un manual técnico con los resultados obtenidos del Trabajo de Integración Curricular (TIC).
- Elaboración de un manuscrito de artículo científico, con los resultados obtenidos en la presente investigación.
- Elaboración y publicación del documento final del Trabajo de Integración Curricular (TIC).

## 6. Resultados

**6.1. Evaluación del efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), en condiciones de oscuridad total.**

**6.1.1. Contaminación de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.**

En la figura 9, se presenta el porcentaje de contaminación de los explantes de *C. maxima*, la cual se registró a partir del quinto día de inoculación *in vitro*, durante un periodo de evaluación de 90 días; en donde, el mayor porcentaje se registró en el tratamiento T2 (7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) con 13,33 % de contaminación, seguido del tratamiento T1 compuesto por 5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP con 6,67 %, el resto de tratamientos evaluados no registraron contaminación; los resultados obtenidos presentaron diferencia estadística significativa ( $p = 0,0036$ ) entre los tratamientos ensayados. En la figura 10 se ilustra la principal causa de contaminación en condiciones de oscuridad total, la cual fue originada por hongos, evidenciándose principalmente en el medio de cultivo, sin afectar a los explantes inoculados.

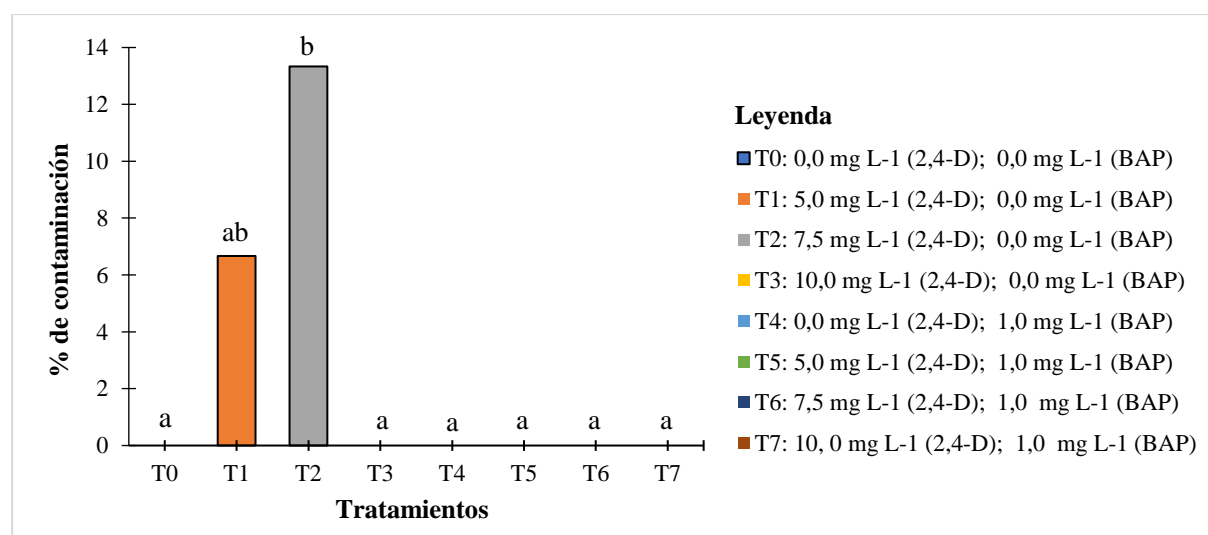


Figura 9. Porcentaje de contaminación de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).





Figura 10. Ilustración de la contaminación de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

### **6.1.2. Fenolización de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.**

En lo referente a la variable oxidación fenólica en *C. maxima* en condiciones de oscuridad total, en la figura 11, se puede observar que el mayor porcentaje de fenolización, se registró en el tratamiento T5 formado por  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP con el 20 %, seguido del tratamiento T1 suplementado de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP con 10 %; mientras que, los tratamientos que registraron menor porcentaje de explantes fenolizados fueron T3 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP), T6 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) y T7 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) con el 3,33 %; el análisis estadístico demostró que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ensayados ( $p = 0,0038$ ). En la figura 12 se ilustra el aspecto de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., que presentaron oxidación fenólica, específicamente los tratamientos T1R2F4 y T5R1F1.

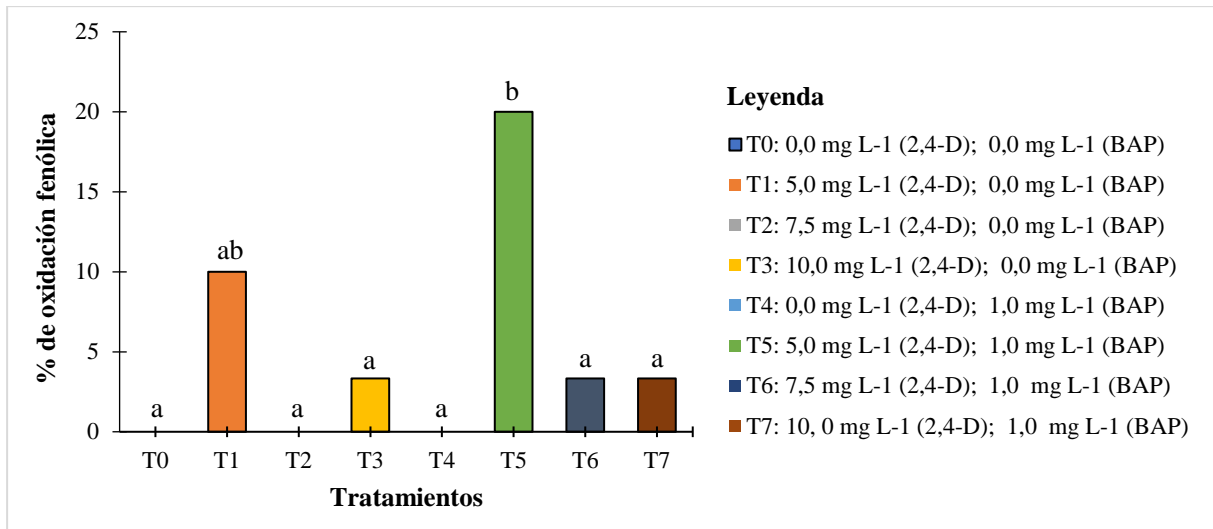


Figura 11. Porcentaje de oxidación fenólica de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

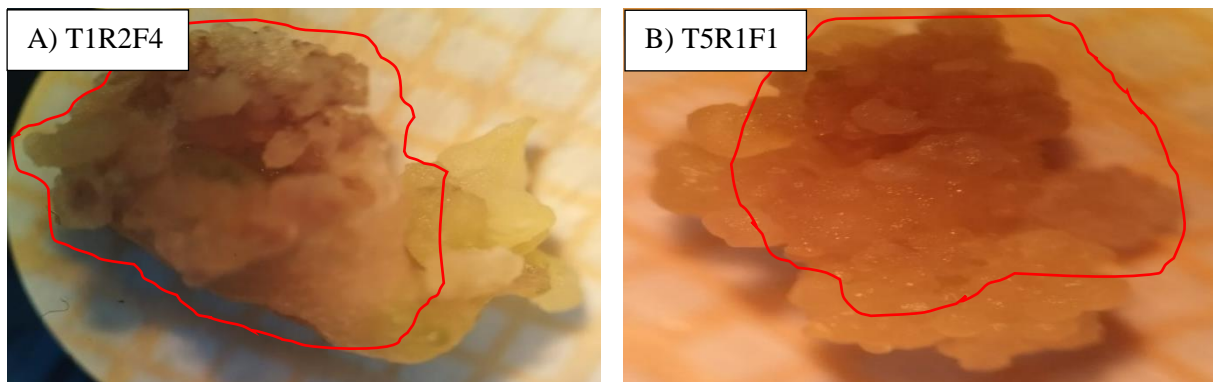


Figura 12. Ilustración de la oxidación fenólica de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), en los tratamientos: A) T1R2F4 y B) T5R1F1, a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total

### 6.1.3. Formación de estructuras callogénicas en protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.

En cuanto al porcentaje de formación de estructuras callogénicas a partir de protocormos en *C. maxima*, en 90 días de evaluación; en la figura 13, se muestra que los tratamientos, T4 que estuvo conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP y T7 suplementado de 10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, presentaron el 100 % de los explantes con formación de estructuras callogénicas; mientras que, el tratamiento que presentó el menor porcentaje, fue el T2 conformado por 7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, con el 80 % de formación de callo, el análisis estadístico aplicado a los tratamientos, demostró la existencia de diferencia estadística significativa ( $p = 0,0311$ ). En la figura 14 se puede observar de forma elocuente el tamaño,

aspecto y estructura de los callos de *Cattleya maxima* Lindl., formados en el medio de cultivo de Knudson-C, en el tratamiento T7, en condiciones de oscuridad total.

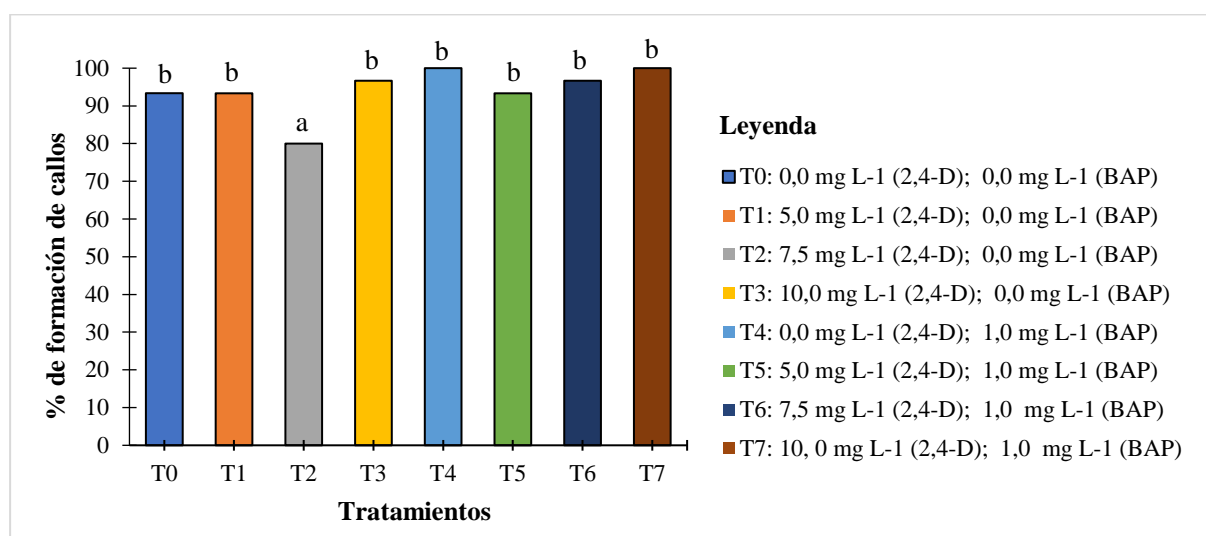


Figura 13. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

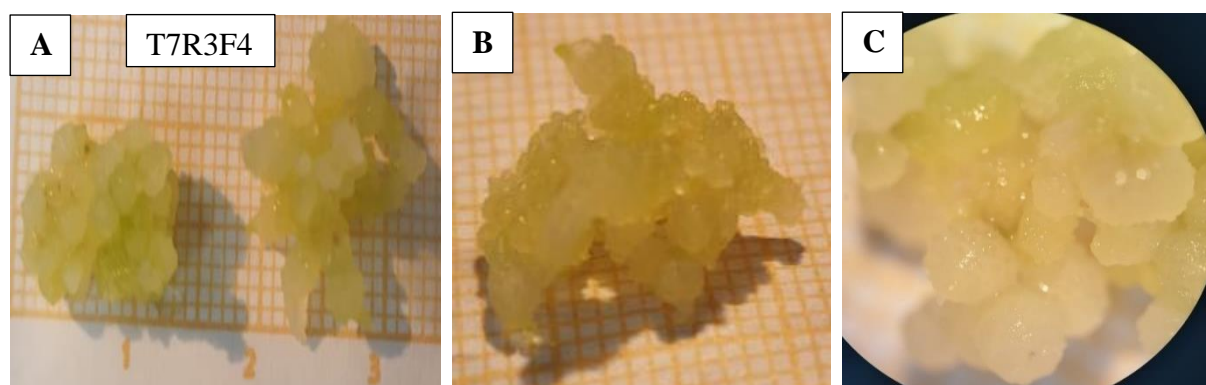


Figura 14. Ilustración de las estructuras callogénicas formadas en el tratamiento T7 (10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) en *Cattleya maxima* Lindl.: A) Tamaño; B) aspecto y C) estructura en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

#### 6.1.4. Número de días a la formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.

En lo que concierne a la variable número de días a la formación de estructuras callogénicas a partir de protocormos de *C. maxima* en el medio de cultivo de Knudson-C (KC); como se puede observar en la figura 15, la formación del callo empezó a los 28 días, destacándose el tratamiento T6 compuesto por 7,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, con el 40 % de explantes con formación; así mismo, a los 33 días de evaluación, se registró el

mayor número de explantes con formación de estructuras calogénicas en el T3 que estuvo suplementado con  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP con el 50 %; seguido del tratamiento T7 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) con el 43,33 % de formación de callo. En la figura 16, se ilustra de forma secuencial la formación de estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en un periodo de evaluación de 90 días.

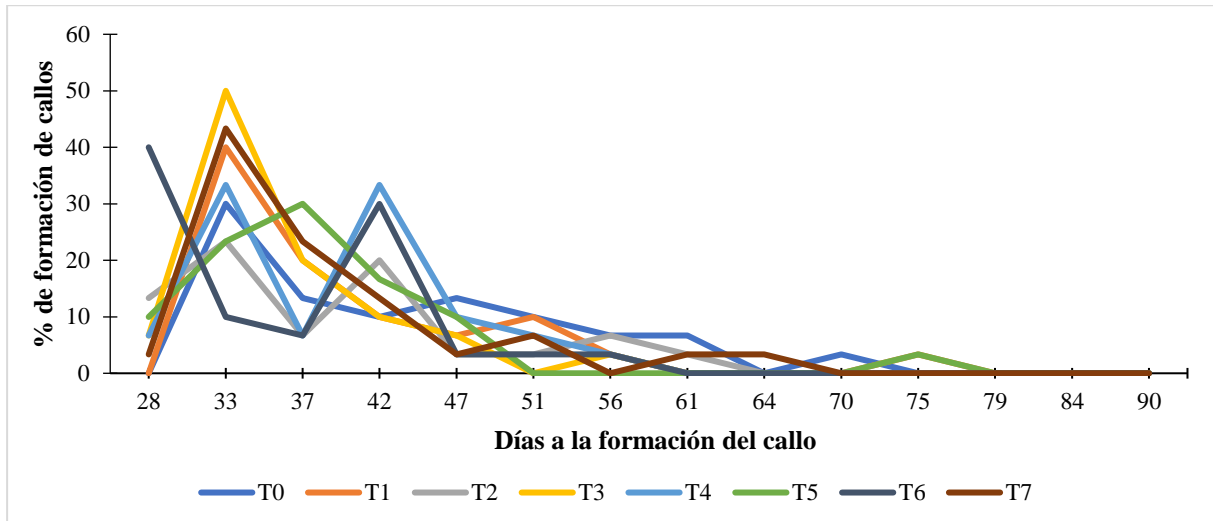


Figura 15. Número de días a la formación del callo en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

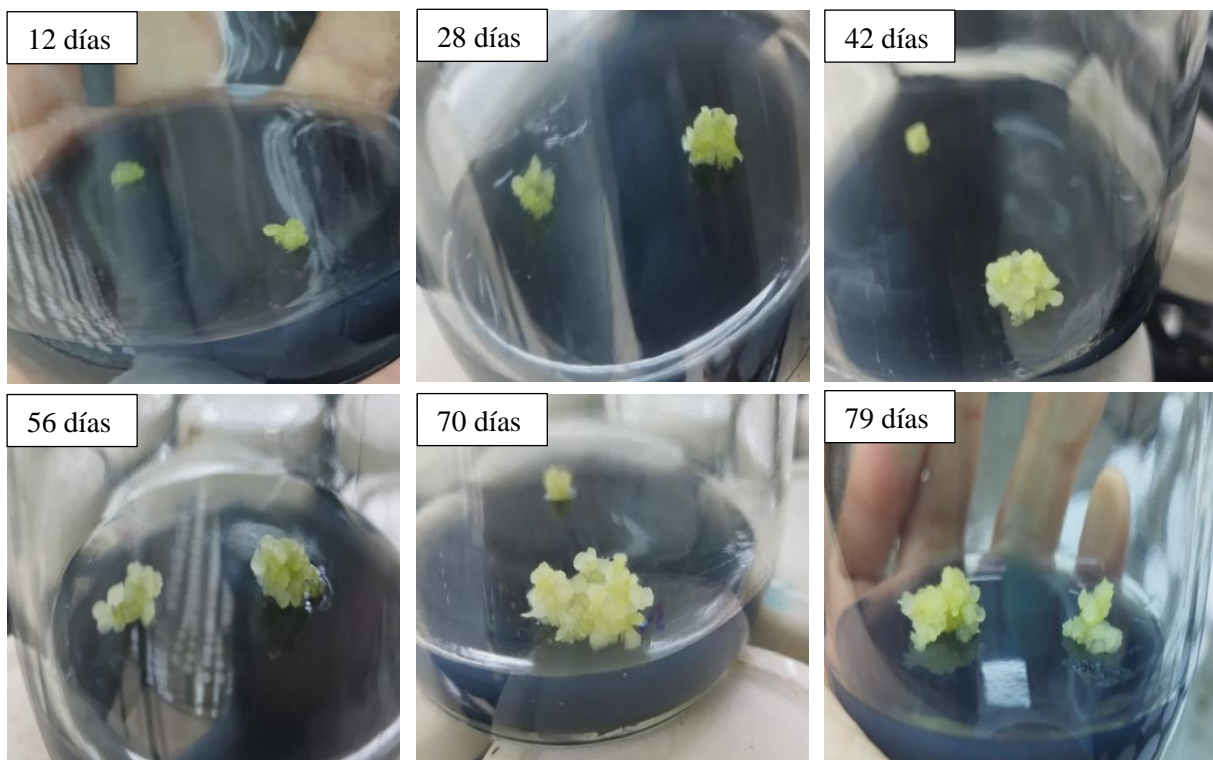


Figura 16. Ilustración de la secuencia de la formación de estructuras calogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

### 6.1.5. Inducción de raíces de novo en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.

En cuanto a la variable formación de raíces *de novo* en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en condiciones de oscuridad total, no se registró resultados de formación de raíces en ninguno de los tratamientos ensayados, durante los 90 días de evaluación.

### 6.1.6. Inducción de brotes de novo en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.

Según como se muestra en la figura 17, la formación de brotes *de novo* en las estructuras callogénicas de *C. maxima*, se presentó en todos los tratamientos evaluados, donde el mayor porcentaje se registró en el tratamiento T4 conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP con el 43,33 %; seguido del T5 compuesto de 5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, que presentó el 26,67 %; mientras que, el T7 (10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) registró el menor porcentaje de formación de brotes *de novo*, con el 3,33 %. El análisis estadístico aplicado a los datos, mostró la existencia de diferencia estadística significativa ( $p= 0,0479$ ) entre los tratamientos ensayados. En la figura 18 se puede observar la formación de brotes *de novo* en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) y T5 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP).

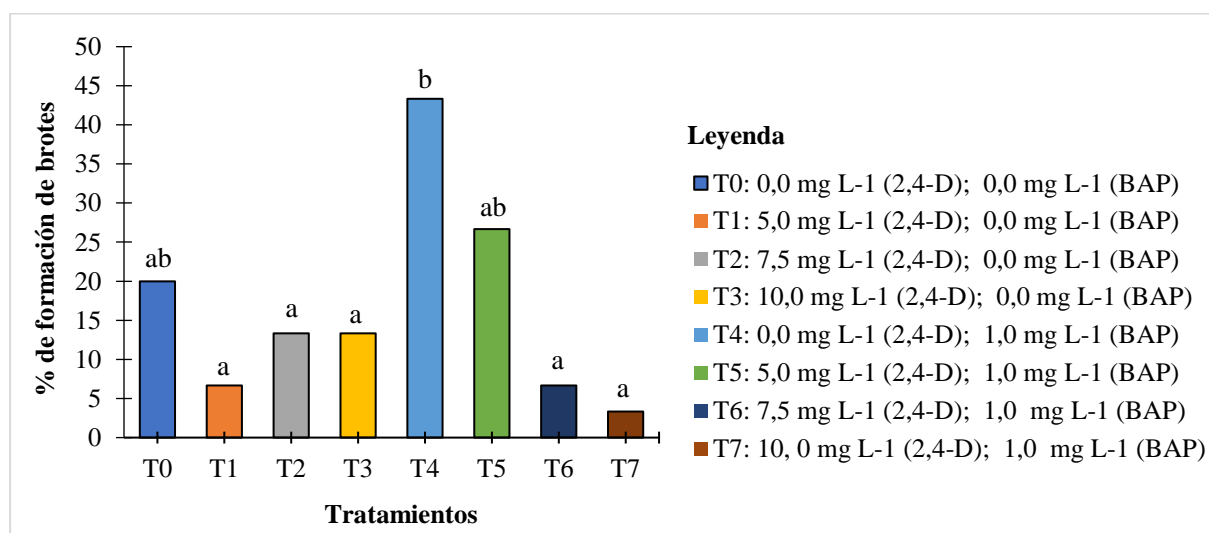


Figura 17. Porcentaje de brotes *de novo* formados en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

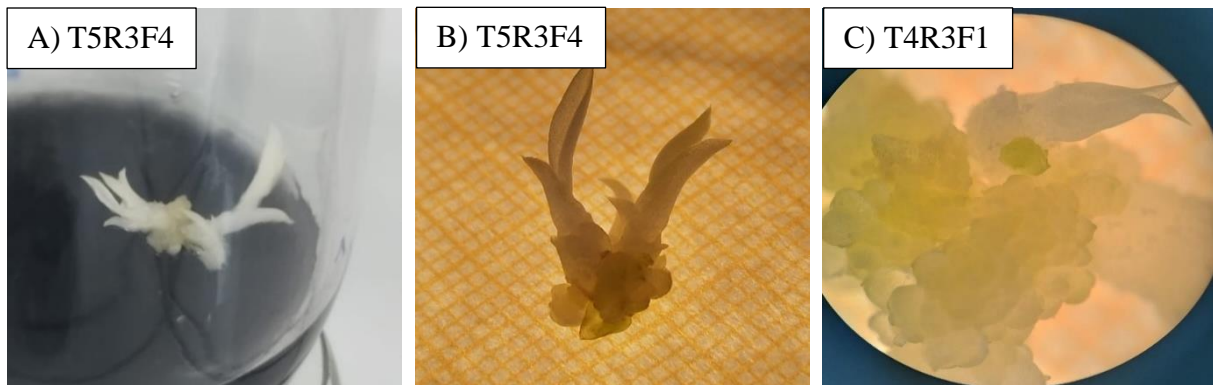


Figura 18. Ilustración de la inducción de brotes *de novo* formados en *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos: A y B) T5R3F4 y C) T4R3F1, en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

#### **6.1.7. Color de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.**

En lo que se refiere a la variable color de las estructuras callogénicas de *C. maxima*., estas presentaron tres tonalidades de coloración; café, verde y crema, como se muestra en la figura 19; así, el tratamiento T4 ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP) registró el 93,33 %, seguido del T7 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) con el 90 % de los explantes en color crema, siendo los mayores porcentajes, mientras que en los tratamientos T0, T2 y T5 disminuyeron al 60 %; otra tonalidad registrada es el color verde, el cual estuvo presente con el 33,33 % en el T0 que no tuvo ninguna combinación hormonal y en los tratamientos T4 y T7 presentó el 6,67 % de estructuras en color verde; mientras que, la coloración café registró el 16,67 % en el tratamiento T5 que contuvo  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, disminuyendo al 3,33 % en los tratamientos T3 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP), T6 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) y T7 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP). En la figura 20 se muestra la coloración de las estructuras callogénicas formadas en el medio de cultivo de Knudson-C, en condiciones de oscuridad total; así, específicamente los tratamientos: T0R1F2, T0R1F4 y T5R1F1.

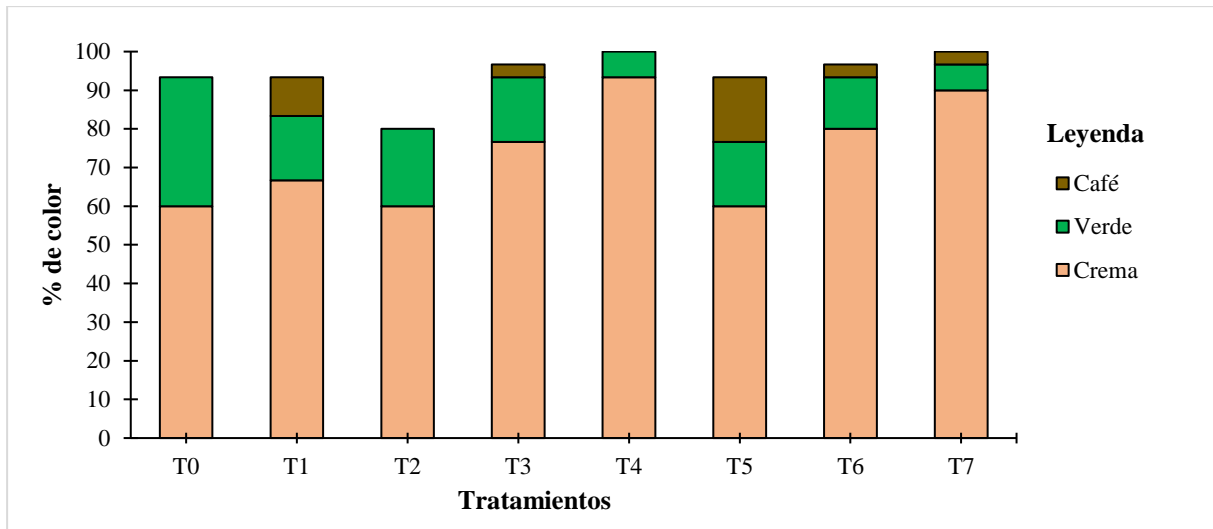


Figura 19. Porcentaje del color de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., formadas en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de inoculación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

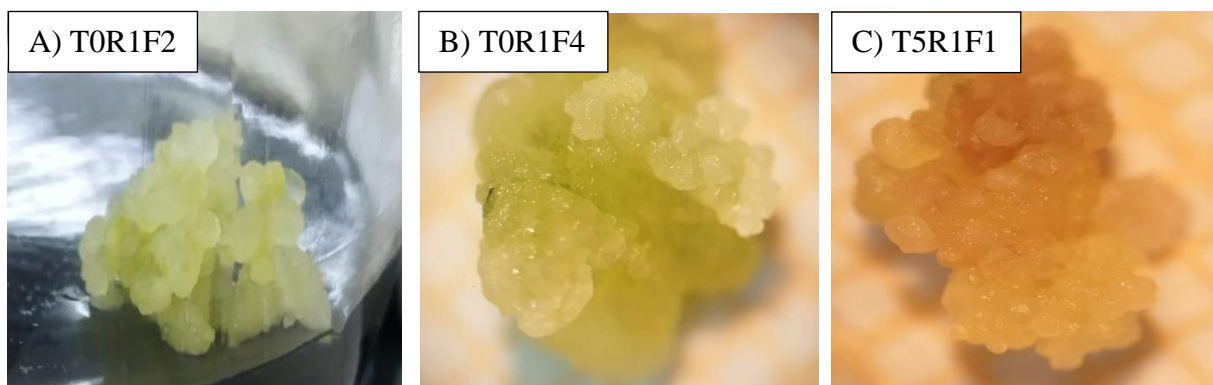


Figura 20. Ilustración del color de las estructuras callogénicas formadas en *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos: A) T0R1F2 (crema); B) T0R1F4 (verde) y C) T5R1F1 (café), en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad.

#### 6.1.8. Friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.

En lo relacionado al porcentaje de friabilidad de los callos de *C. maxima*, en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), en la figura 21, se evidencia que los tratamientos T4 con  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y T5 compuesto por  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, registraron 70 % de estructuras friables, siendo el mayor porcentaje; mientras que, el tratamiento que registró el menor porcentaje de friabilidad fue el T2 ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) con el 46,67 %. En la figura 22, se muestra el estado de friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., formadas en los tratamientos T1 ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP), T6 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP) y T7 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-

D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP), bajo diferentes concentraciones hormonales, a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad.

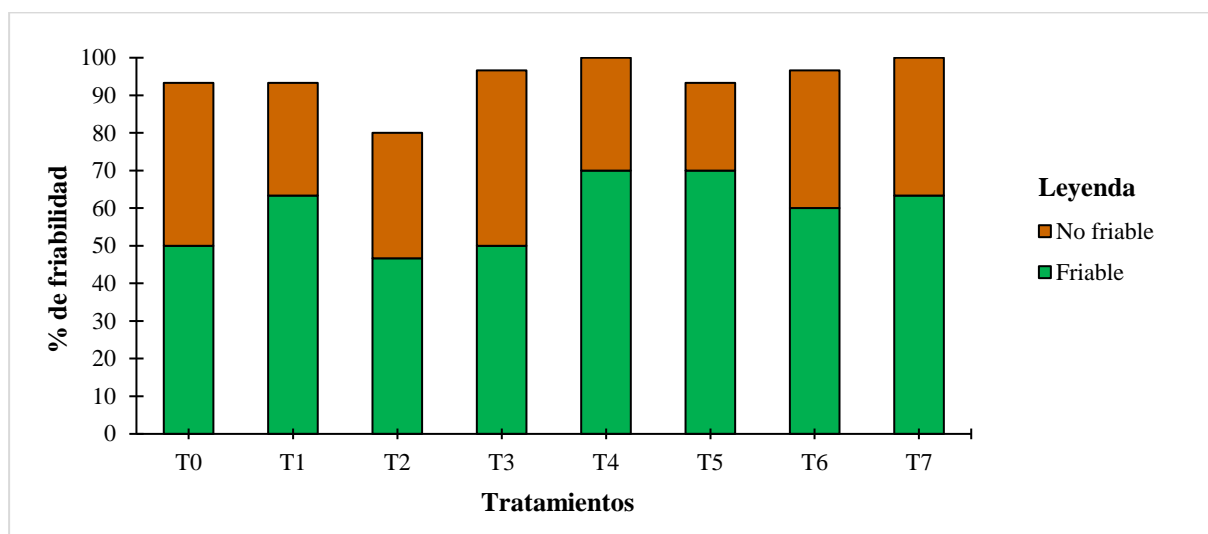


Figura 21. Porcentaje de friabilidad de las estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

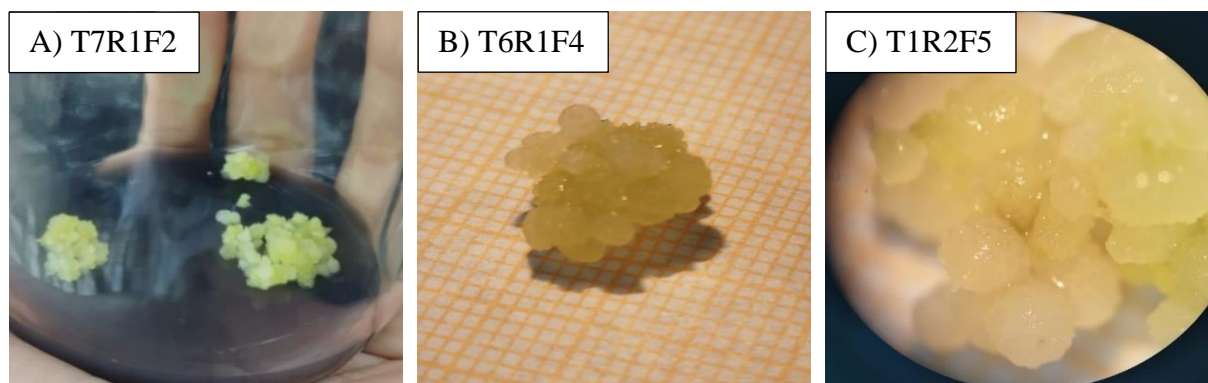


Figura 22. Ilustración de la friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos: A) T7R1F2; B) T6R1F4 y C) T1R2F5, el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.



## 6.2. Determinación del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), en condiciones de oscuridad total.

### 6.2.1. Contaminación de protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.

El porcentaje de contaminación de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., se registró a partir quinto día de inoculación *in vitro* de los protocormos; en la figura 23, se observa que el tratamiento testigo T0 que no contuvo ninguna combinación hormonal, registró el 20 % de contaminación, seguido del T2 compuesto de 7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, con el 13,33 %; en tanto que, los tratamientos T3 con 10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP y T5 suplementado con 5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, presentaron 6,67 % respectivamente, los tratamientos restantes no registraron contaminación; el análisis estadístico aplicado a los tratamientos ensayados, demostró la existencia de diferencia estadística significativa ( $p = 0,0032$ ). En la figura 24 se presenta de forma ilustrada la contaminación de los protocormos de *C. maxima*, la cual fue causada por bacterias y hongos, evidenciándose principalmente en el medio de cultivo.

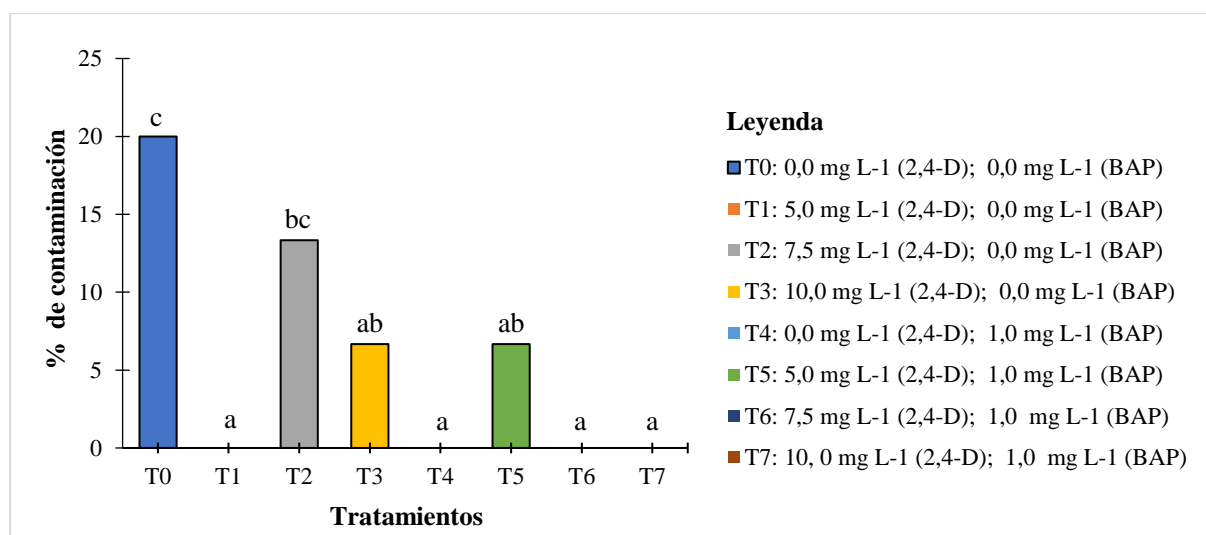


Figura 23. Porcentaje de contaminación de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).



Figura 24. Ilustración de la contaminación de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

### **6.2.2. Fenolización de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.**

En la figura 25, se presentan los resultados de la variable oxidación fenólica de los protocormos inoculados de *C. maxima*, en donde el mayor porcentaje se registró en el tratamiento T6, que estuvo constituido por  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, con el 20 %, seguido del T1 ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) con 16,67 %; mientras que, el menor porcentaje de explantes fenolizados se registró en el T2 suplementado por  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, con el 3,33 %. Los resultados obtenidos demostraron que no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados ( $p = 0,5464$ ). En la figura 26 se muestran los explantes fenolizados de *Cattleya maxima* Lindl., en un periodo de evaluación de 90 días, en condiciones de oscuridad total, en los tratamientos T1 ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP), T2 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) y T6 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP).

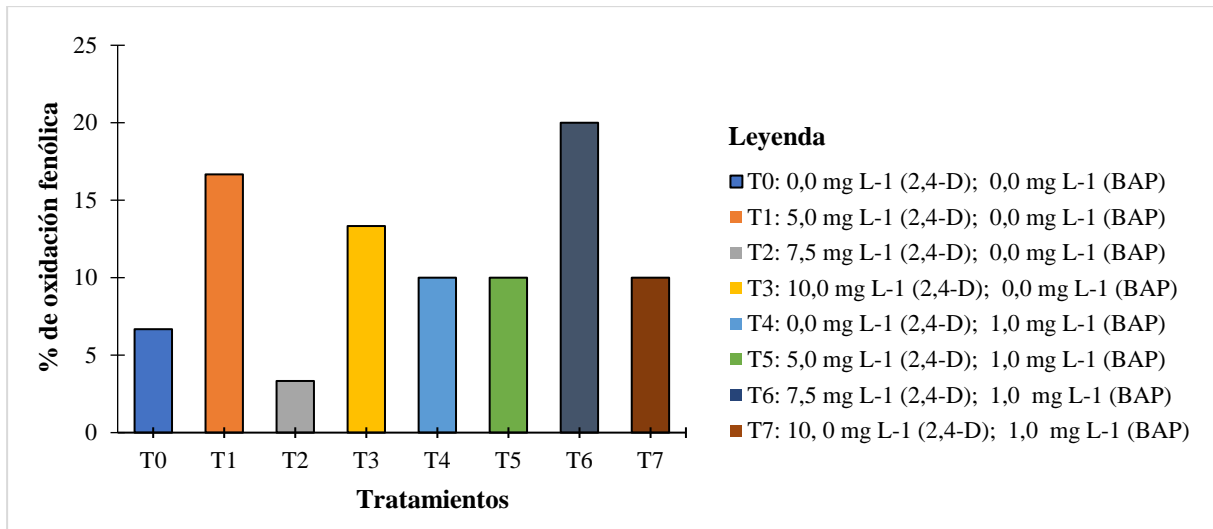


Figura 25. Porcentaje de oxidación fenólica de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).



Figura 26. Ilustración de la oxidación fenólica de los protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos: A) T2R2F1; B) T1R3F5 y C) T6R3F1 en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

### 6.2.3. Formación estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.

En lo relacionado al porcentaje de formación de estructuras callogénicas en *C. maxima*, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), bajo condiciones de incubación de oscuridad total, en la figura 27, se puede observar que existió formación de estructuras callogénicas en todos los tratamientos, destacándose el tratamiento T7 (10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) con un porcentaje de 93,33 %; seguido del T6 compuesto de 7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, con el 90 %; mientras que, el tratamiento T2 que contuvo 7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, presentó el menor porcentaje, con el 66,67 %. Según el análisis estadístico aplicado, no existió diferencia estadística significativa ( $p = 0,1721$ ) entre los tratamientos

ensayados. En la figura 28 se muestra de forma ilustrativa el aspecto que presentaron las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos T0R1F2, T6R2F2 y T7 T7R3F2, bajo diferentes concentraciones hormonales.

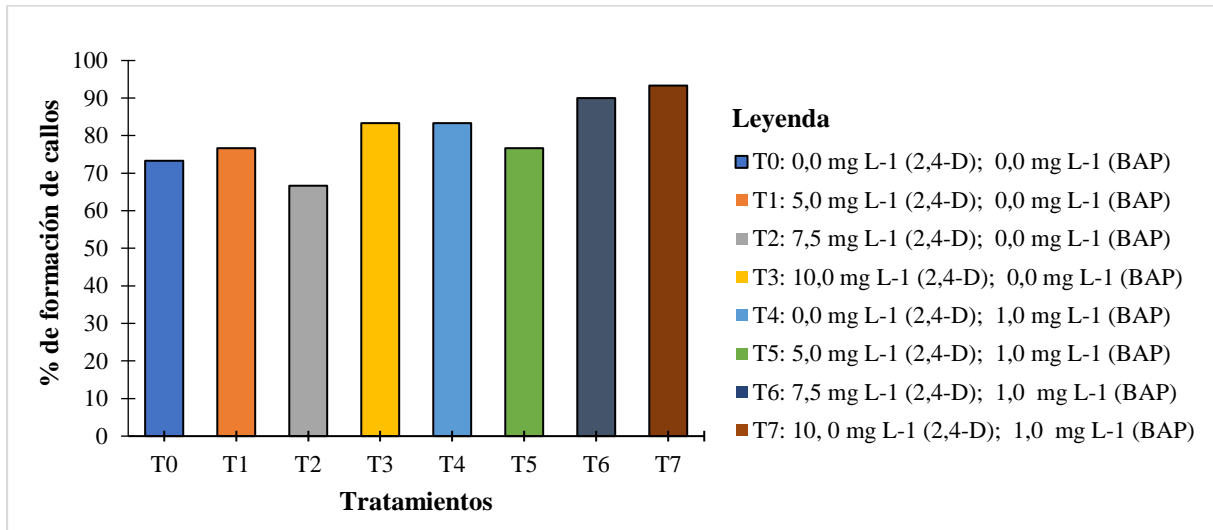


Figura 27. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

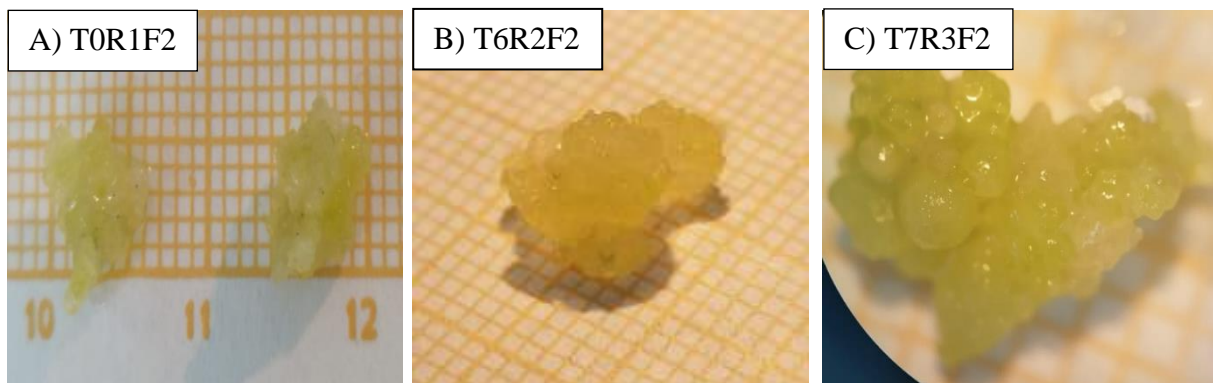


Figura 28. Ilustración de las estructuras callogénicas formadas en *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos: A) T0R1F2; B) T6R2F2 y C) T7R3F2, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

#### 6.2.4. Número de días a formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.

Con respecto al número de días a la formación de estructuras callogénicas en los explantes de *C. maxima*, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), como se observa en la figura 29, la formación de callos empezó a los 19 días incubación, en donde se registró 6,67 % de formación de callo, en el tratamiento T1, compuesto por 5,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,0

mg L<sup>-1</sup> de BAP; posteriormente, a los 28 días de evaluación, se registró en el T5 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) y T6 (7,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) el 26,67 % y 23,33% de explantes con formación de callo, respectivamente. En la figura 30, se presenta de forma secuencial la formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., inducidas bajo diferentes concentraciones hormonales, en condiciones de oscuridad total.

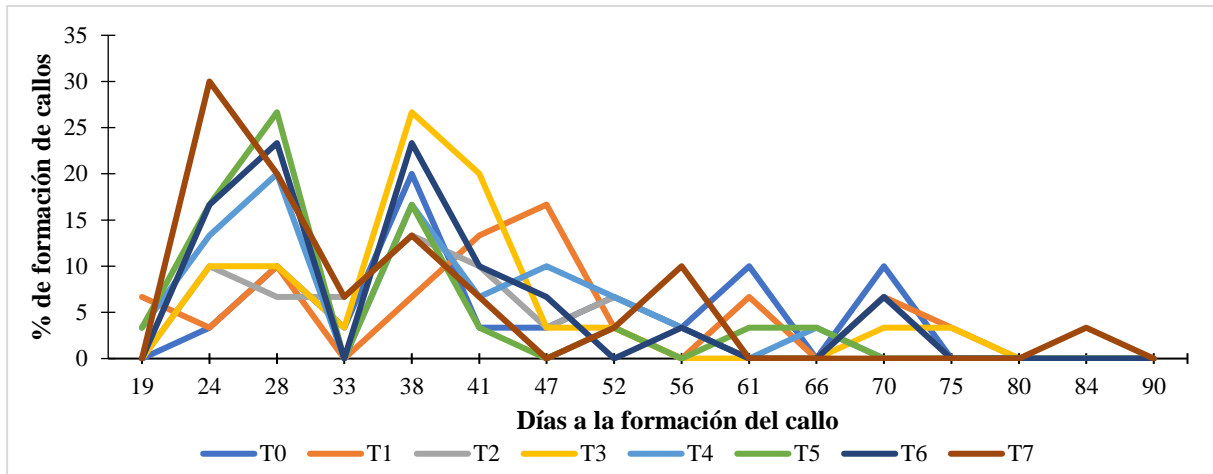


Figura 29. Número de días a la formación de callo en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

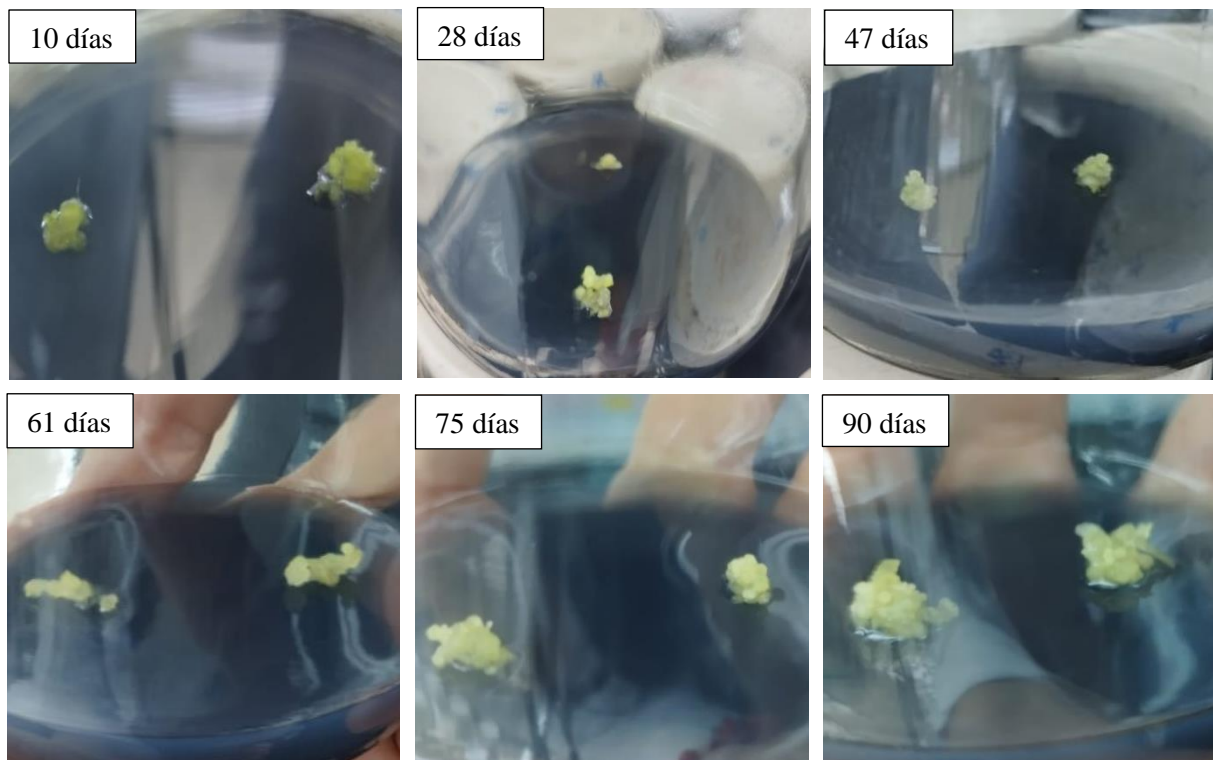


Figura 30. Ilustración de la secuencia de la formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

**6.2.5. Inducción de raíces de novo en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.**

En cuanto a los resultados de la variable formación de raíces *de novo* en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., durante los 90 días de evaluación, no se registraron resultados en ninguno de los tratamientos ensayados.

**6.2.6. Inducción de brotes de novo en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.**

El porcentaje de formación de brotes *de novo* a partir de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., fue bajo, como se muestra en la figura 31, en donde la formación de brotes, se presentó solo en el tratamiento T4 conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP con el 10 % de formación de brotes *de novo*, en el resto de tratamientos ensayados no se registraron ninguna formación, el análisis estadístico aplicado mostró que los datos obtenidos no presentaron diferencia estadística significativa ( $p= 0,4289$ ). En la figura 32, se muestran los brotes *de novo* formados a los 90 días de evaluación, en el tratamiento T4.

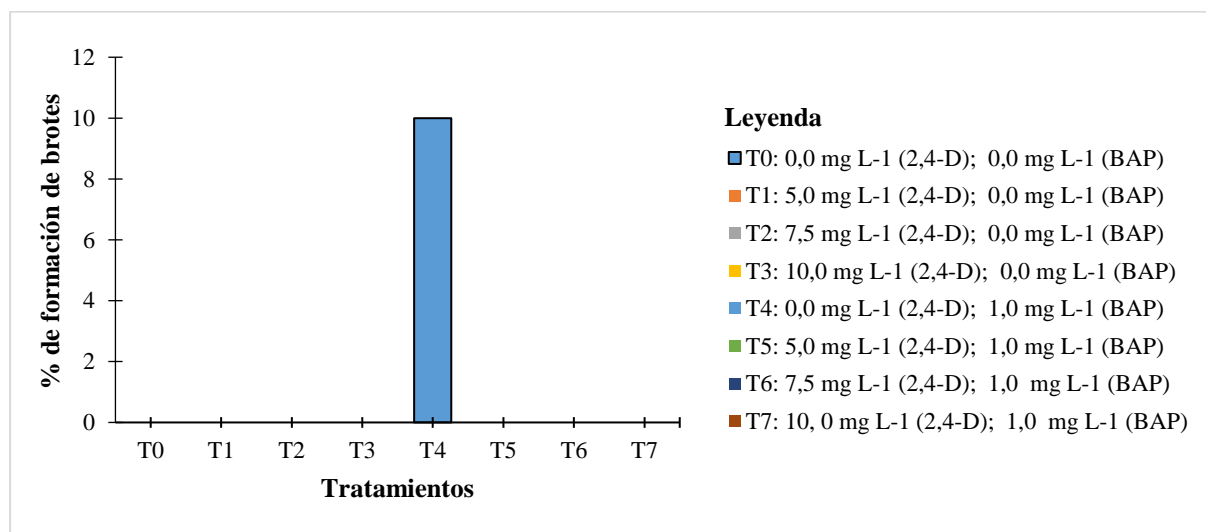


Figura 31. Porcentaje de brotes *de novo* formados en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

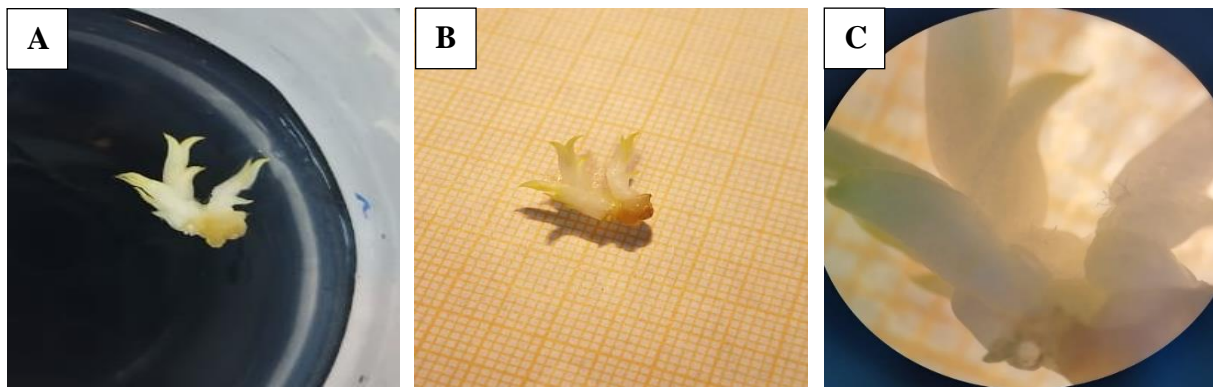


Figura 32. Ilustración de la inducción de brotes *de novo* formados en *Cattleya maxima* Lindl., en el tratamiento T4R2F3, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962) a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

#### **6.2.7. Color de las estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.**

En la figura 33, se muestra el color de las estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., las cuales presentaron tres tonalidades de coloración: café, verde y crema; donde se puede observar que en todos los tratamientos evaluados predominó el color crema; así, en el T4 ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) la tonalidad crema alcanzó el mayor porcentaje con el 76,67 % y en el T2 que estuvo compuesto por  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, disminuyó al 40 %; también, se pudo evidenciar que la tonalidad verde alcanzó el 23,33 % en el T2 y el 3,33 % en los tratamientos T4 ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) y T5 ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP); mientras, que la tonalidad café estuvo presente en los tratamientos T1 formado por  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP y T6 suplementado de  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP con el 16,67 %, siendo el mayor porcentaje registrado; y, en los tratamientos T0 ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP), T2 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) y T4 ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) disminuyó al 3,33 %. En la figura 34 se muestra la coloración obtenida en las estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., formadas en condiciones de oscuridad total luego de 90 días de evaluación, en los tratamientos: T7 (verde), T0 (crema) y T6 (café).

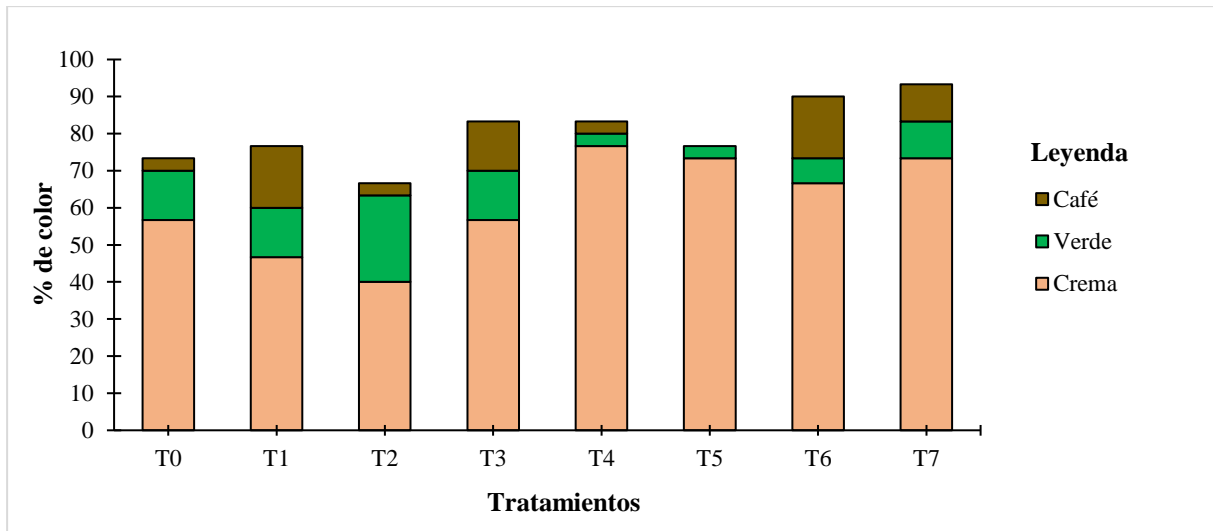


Figura 33. Porcentaje del color de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., formadas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

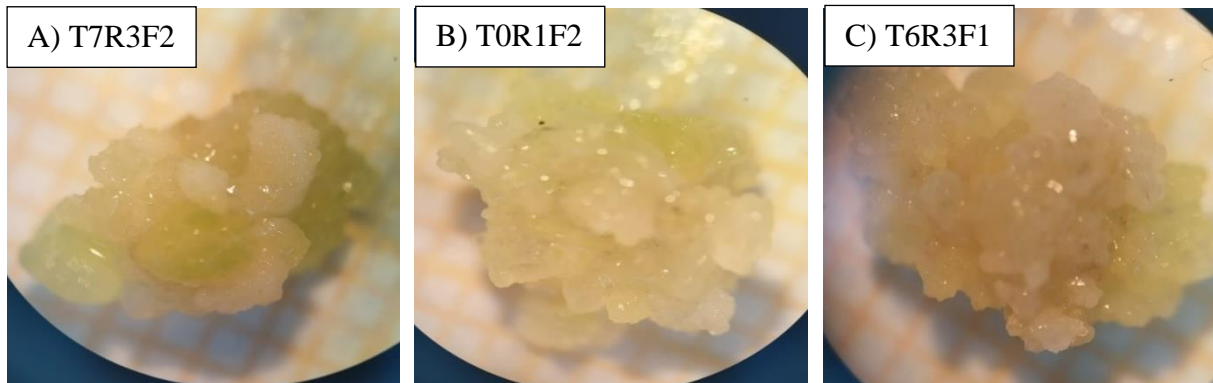


Figura 34. Ilustración del color de las estructuras callogénicas formadas en *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos: A) T7R3F2 (verde); B) T0R1F2 (crema) y C) T6R3F1 (café), en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

### 6.2.8. Friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.

En cuanto a la variable friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS); en la figura 35, se puede observar que el tratamiento T7 que estuvo formado por la combinación hormonal  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, registró el mayor porcentaje de estructuras friables, con el 26,66 %, seguido del T5 compuesto por  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP con el 20 %; mientras que, los tratamientos que registraron el menor porcentaje de estructuras friables fueron el T2 suplementado con  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP y T3 formado por  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, con 6,66 % y 10 %, respectivamente. En la figura 36 se ilustra la



friabilidad que presentaron las estructuras calogénicas friables y no friables de *C. maxima* Lindl., formadas en condiciones de oscuridad total, en 90 días de evaluación, en los tratamientos T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) y T3 (10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP).

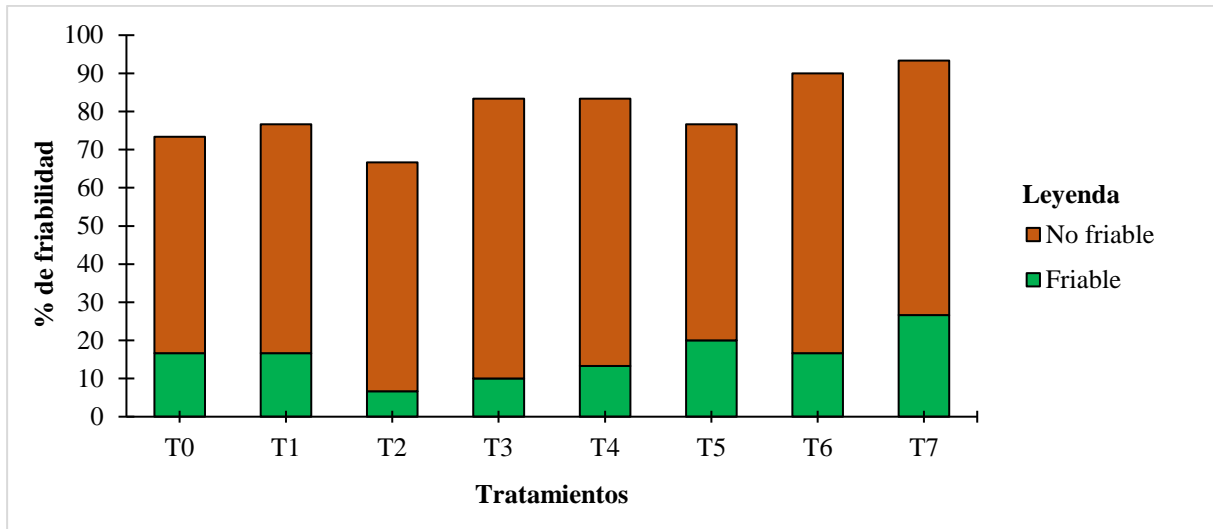


Figura 35. Porcentaje de friabilidad de las estructuras calogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total (n = 30).

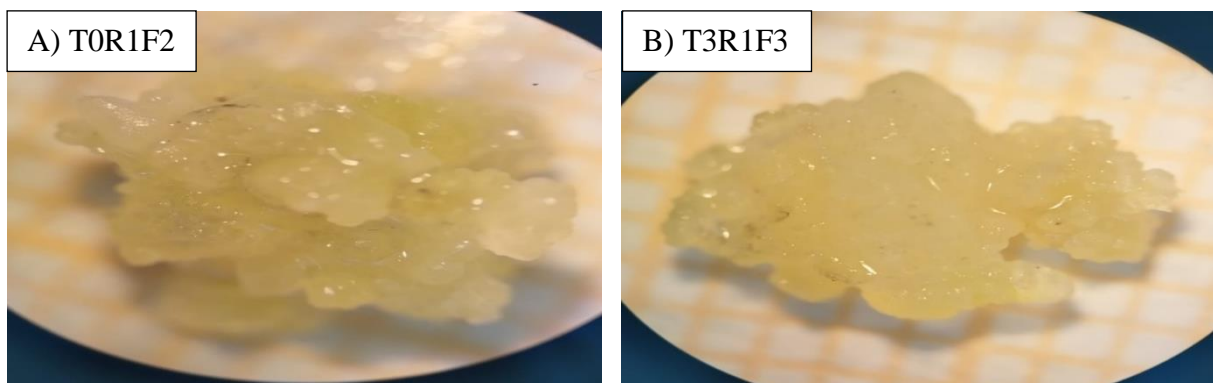
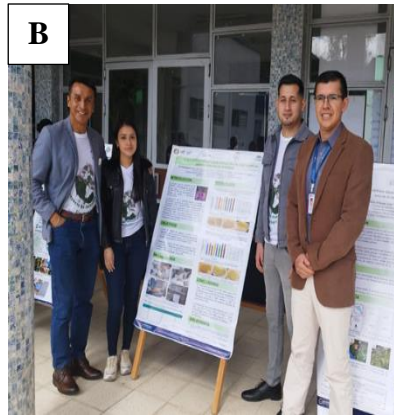
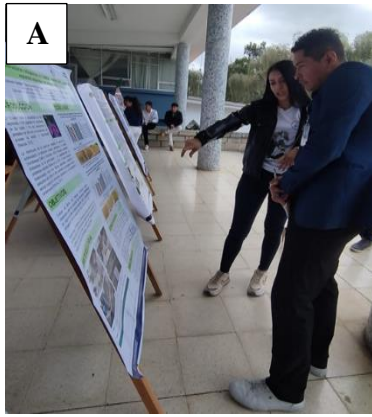


Figura 36. Ilustración de la friabilidad de las estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los tratamientos: A) T0R1F2 (friable) y B) T3R1F3 (no friable), el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

### **6.3. Difusión de los resultados de la investigación, para su conocimiento y aplicación.**

En la figura 37, se presentan las diferentes actividades que se realizaron, para la difusión de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, las mismas que se indican a continuación:

- Socialización de los resultados preliminares del Trabajo de Integración Curricular a los actores involucrados en el campo forestal, que formaron parte de la Casa Abierta de la Carrera de Ingeniería Forestal, realizada el 28 de julio del 2023.
- Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular, ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación *Cinchona*, que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un tríptico y póster para la difusión de resultados del Trabajo de Integración Curricular.
- Elaboración de un Manual técnico con los resultados obtenidos del Trabajo de Integración Curricular.
- Elaboración de un manuscrito de artículo científico, con los resultados obtenidos en la presente investigación.
- Elaboración y publicación del documento final del Trabajo de Integración Curricular.



**D** Inducción de estructuras calogénicas y morfológicas en *Cattleya maxima* Lindl.  
Induction of callogenic and morphogenic structures in *Cattleya maxima* Lindl.

Daniela Cárdenas - Quevedo<sup>1\*</sup>  
Victor Hugo - Eras Guzmán<sup>1,2</sup>  
Darlin González - Zamora<sup>1,2</sup>  
Magaly Yaguana - Arévalo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador  
<sup>2</sup> Laboratorio de Micropropagación Vegetal

\*Autor para correspondencia: [daniela.cardenas@unl.edu.ec](mailto:daniela.cardenas@unl.edu.ec)

**1. Resumen**  
Las orquídeas son especies que contribuyen a la generación, mantenimiento y flujo de servicios ecosistémicos, pero presentan limitaciones en cuanto a su germinación y establecimiento en ambientes naturales. A partir de ello, la biotecnología mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, permite la propagación de especies en peligro de extinción y con estas características. En el presente artículo se indujo la formación de estructuras calogénicas y brotes de novo en *Cattleya maxima* Lindl., utilizando dos medios de cultivo. Para la formación de estructuras calogénicas y brotes de novo se trabajó con los medios de cultivo de Knudson (KC-1946) y Murashige & Skoog (MS-1962), suplementado con la concentración hormonal auxina-citoquinina (2,4-D y BAP). La concentración hormonal auxina-citoquinina del T7 resultó mejor en cuanto a la formación de estructuras calogénicas en los dos medios de cultivo dando el 100% y 93,33% de explantes con formación de callos, respectivamente. Mientras que el T4 presentó el porcentaje más alto (43,33%) en cuanto a la formación de brotes de novo en el medio de cultivo KC. A partir de los resultados obtenidos se puede realizar la propagación *in vitro* de *C. maxima*, aportar a la propagación y conservación de las orquídeas que son especies importantes dentro de la dinámica de los ecosistemas.

**Palabras clave:** biotecnología, auxina-citoquinina, callos, brotes

**1.1. Abstract**  
Orchids are species that contribute to the generation, maintenance and flow of ecosystem services, but have limitations in terms of germination and establishment in natural environments. Therefore, biotechnology through the application of *in vitro* culture techniques allows the propagation of endangered species with these characteristics. In the present article, the formation of callogenic structures and *de novo* shoots was induced in *Cattleya maxima* Lindl. using two culture media. For the formation of callogenic structures and *de novo* shoots, the culture media of Knudson (KC-1946) and Murashige & Skoog (MS-1962), supplemented with auxin-cytokinin hormone concentration (2,4-D and BAP), were used. The auxin-cytokinin hormone concentration of T7 resulted better in the formation of callus structures in the two culture media giving 100% and 93.33% of explants with callus formation, respectively. While T4 presented the highest percentage (43.33%) in terms of *de novo* shoot formation in the KC culture medium. From the results obtained, the *in vitro* mass propagation of *C. maxima* can be

**E** UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES  
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL  
Laboratorio de Micropropagación Vegetal

MANUAL TÉCNICO:  
INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS CALOGÉNICAS EN *Cattleya maxima* LINDL... A PARTIR DE EXPLANTES OBTENIDOS DE VITROPLANTAS

RESPONSABLES:  
Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo  
Ing. For. Victor Hugo Eras Guzmán, Mg. Sc

LOJA - ECUADOR  
2023

**F** Inducción de estructuras calogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas

INTRODUCCIÓN  
El cultivo *in vitro* de orquídeas es un procedimiento que permite la propagación de especies en peligro de extinción y con estas características. En el presente artículo se indujo la formación de estructuras calogénicas y brotes de novo en *Cattleya maxima* Lindl., utilizando dos medios de cultivo. Para la formación de estructuras calogénicas y brotes de novo se trabajó con los medios de cultivo de Knudson (KC-1946) y Murashige & Skoog (MS-1962), suplementado con la concentración hormonal auxina-citoquinina (2,4-D y BAP). La concentración hormonal auxina-citoquinina del T7 resultó mejor en cuanto a la formación de estructuras calogénicas en los dos medios de cultivo dando el 100% y 93,33% de explantes con formación de callos, respectivamente. Mientras que el T4 presentó el porcentaje más alto (43,33%) en cuanto a la formación de brotes de novo en el medio de cultivo KC. A partir de los resultados obtenidos se puede realizar la propagación *in vitro* de *C. maxima*, aportar a la propagación y conservación de las orquídeas que son especies importantes dentro de la dinámica de los ecosistemas.

OBJETIVOS  
- Evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras calogénicas y brotes de novo en *Cattleya maxima* Lindl., en los dos medios de cultivo.  
- Determinar el balance hormonal más efectivo, para la inducción de estructuras calogénicas y brotes de novo en *Cattleya maxima* Lindl., en los dos medios de cultivo.

METODOLOGÍA  
Se utilizaron explantes de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., obtenidos de vitroplantas de Knudson (KC-1946) y Murashige & Skoog (MS-1962).

CONCLUSIONES  
El medio de cultivo Murashige & Skoog (MS-1962) presentó el 100% de explantes con formación de callos, mientras que el medio de cultivo Knudson (KC-1946) presentó el 93,33% de explantes con formación de callos.

BIBLIOGRAFÍA  
Cárdenas Quevedo, D. F., Eras Guzmán, V. H., González Zamora, D., & Yaguana Arévalo, M. (2023). Inducción de estructuras calogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas. *Revista de la Universidad Nacional de Loja*, 1(1), 1-10.

**G** Formación de estructuras calogénicas en protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.

Figura 1. Porcentaje de formación de estructuras calogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC), en 90 días de evaluación (n = 30).

**3.2. Formación estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.**

Figura 2. Porcentaje de formación de callo en protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS), en 90 días de evaluación (n = 30).

**CONCLUSIONES**

- La combinación hormonal auxina-citoquinina favoreció la formación de estructuras calogénicas en relación al tratamiento testigo, así en el medio de cultivo Knudson- (KC) fue del 7%, entre tanto, en el medio de Murashige & Skoog (MS) fue del 20%.
- El balance hormonal de la auxina-citoquinina comprendida por 10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP (T7), fue más efectiva en cuanto a la formación de estructuras calogénicas en los dos medios de cultivo (Knudson-C y Murashige & Skoog) debido a que obtuvo el 100% y 93,33% de los explantes formaron callo, respectivamente.
- La formación de brotes *de novo*, a partir de estructuras calogénicas registro resultados diferentes entre tratamientos y medios de cultivo, siendo la combinación hormonal del T4 con 0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP en el medio Knudson-C (KC) el que registro la mayor brotación con 43,33%, mientras que en medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS) solo alcanzó el 10%.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES  
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL  
Laboratorio de Micropropagación Vegetal  
INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS CALOGÉNICAS EN *Cattleya maxima* LINDL... A PARTIR DE EXPLANTES OBTENIDOS DE VITROPLANTAS

AUTORA:  
Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo  
DIRECTOR:  
Ing. For. Victor Hugo Eras Guzmán, Mg. Sc

LOJA - ECUADOR  
2023

Figura 37. Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados. A) Socialización de los resultados preliminares del TIC a actores sociales interesados, que asistieron a la Casa Abierta organizada por la CIF; B) Presentación del poster científico; C) Socialización de los resultados del TIC, ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona; D) Elaboración de un manuscrito del artículo científico derivado del TIC; E) Elaboración de un manual técnico; F) Elaboración de un poster científico; y, G) Elaboración de un tríptico derivado de los resultados del TIC.

## 7. Discusión

### 7.1. Contaminación de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

Según manifiesta Indacochea y Parrales (2017), la contaminación es uno de los principales problemas que se presentan en el establecimiento de los cultivos *in vitro*, a través de la presencia de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, fitoplasmas o virus.

En la presente investigación, durante la fase de implantación de los explantes (protocormos de vitroplantas) de *C. maxima* para la formación de callos, los porcentajes de contaminación registrados fueron bajos; así, en el medio de cultivo de Knudson-C (KC), el tratamiento T2 (7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) alcanzó 13,33 % de contaminación y el T1 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) 6,67 %, resultados que son inferiores a los reportados por Robles (2022), en la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de KC, donde registró 20 % de contaminación; mientras que, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) el tratamiento testigo T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) obtuvo 20 % de contaminación y el T2 (7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) 13,33 %, estos resultados son superiores a los registrados por Gonzalez (2017), quien al evaluar la contaminación durante la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en el medio de cultivo MS, obtuvo un porcentaje de contaminación bajo del 6,67 %.

Cabe señalar que, los bajos porcentajes de contaminación obtenidos en la presente investigación, se deben a la utilización de vitroplantas, que es material aséptico, obtenido del banco de germoplasma del LMV; lo cual se corrobora con lo manifestado por Mamani et al. (2022), quienes mencionan que a partir de material vegetal *in vitro* el porcentaje de contaminación aceptado es hasta el 20 %.

En este contexto, Hernández y González (2010) manifiestan que la contaminación puede tener dos orígenes: por microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante y microorganismos inducidos durante la manipulación en laboratorio y según Gonzales et al. (2022), indican que la contaminación puede aparecer entre los primeros siete y

quince días, luego de la inoculación *in vitro* y puede ser causada por hongos y bacterias. Además, Indacochea y Parrales (2017), recomiendan aumentar rigurosamente las medidas de asepsia dentro y cerca de la sala de inoculación; así como garantizar la esterilización minuciosa de los materiales y equipos a utilizar al momento de la inoculación *in vitro*.

## **7.2. Fenolización de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.**

La fenolización es un fenómeno fotoactivo, que se presenta en presencia de la luz y del oxígeno y que consiste en el oscurecimiento o necrosamiento de los tejidos (explantes) (Pierik, 1990), la cual puede ser causada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) misma que se libera cuando los tejidos sufren lesiones o cortes (Azofeifa, 2009).

En este sentido en la presente investigación, durante la incubación para la formación de estructuras callogénicas de *C. maxima*, en condiciones de oscuridad total; en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946) el T5 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) registró el 20 % de fenolización y el T1 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) 10 %; mientras que, en Murashige y Skoog (MS-1962) el tratamiento T6 (7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) registró el 20 % y el T1 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) el 16,67 %, resultados que son inferiores a los obtenidos por Robles (2022), quien reporta 30 % de oxidación fenólica al utilizar el medio de cultivo KC para la formación de callos, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de oscuridad total.

A partir de ello, Pequeño et al. (2015) mencionan que la oxidación fenólica se presenta por lesiones que se realizan en los explantes durante la disección o desinfección de los mismos; así mismo, Aguirre et al. (2010), manifiestan la fenolización se puede reducir incubando los explantes en oscuridad, reduciendo las concentraciones de fitorreguladores y utilizando sustancias antioxidantes, como el carbón activado. Además, Pedroza et al. (2010), recomiendan utilizar carbón activado de 0,1 - 5 % en el medio de cultivo, dado a que evita la oxidación de los explantes y es capaz de absorber los compuestos fenólicos tóxicos y reguladores de crecimiento que se encuentran en exceso en el medio de cultivo; así mismo, Pedroza (2009) manifiesta que el uso del carbón activado influye de manera positiva en la germinación y crecimiento de orquídeas, especialmente en aquellas que son propensas a la oxidación.

Por lo mencionado, el bajo porcentaje de oxidación fenólica alcanzado en los protocormos inoculados *in vitro*, puede atribuirse al uso de carbón activado en el medio de cultivo ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) y las condiciones de oscuridad total en que fueron incubados los explantes, en la presente investigación.

### **7.3. Formación de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.**

Según Hernández y Díaz (2019), las estructuras callogénicas o callos, consisten en la formación de una masa amorfa de células no diferenciadas, que se encuentran en constante división celular, que es influenciada por la concentración y combinación de reguladores de crecimiento, especialmente de las auxinas en altas concentraciones, adicionadas al medio de cultivo; en este contexto, en la variable formación de estructuras callogénicas de *C. maxima*, a partir de explantes (protocormos) obtenidos de vitroplantas, bajo diferentes concentraciones hormonales auxina-citoquinina, en condiciones de oscuridad total; en el medio de cultivo de Knudson-C, los tratamientos T4 ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) y T7 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) registraron el 100 % de formación de estructuras callogénicas; mientras que, en el T2 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) registró el 80 %, resultados que son superiores a los reportados por Robles (2022), quien en su investigación sobre la inducción de estructuras callogénicas, a partir de protocormos de *C. maxima*, en el medio de cultivo de Knudson-C, obtuvo el 40 % de protocormos con formación de callo.

En relación a la formación de callos en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), el T7 ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) registró 93,33 % y el T2 ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) 66,67 %, resultados que son superiores a los reportados por Gil et al. (2019) quienes utilizando la citoquinina 6-BAP, para la inducción de organogénesis *in vitro* en *C. trianae*, obtuvieron el 29,1 % de formación de estructuras callogénicas en el medio de cultivo de MS, a los 180 días de evaluación.

A partir de ello, Sánchez y Alvarenga (2015) mencionan que el empleo de las auxinas influye de manera positiva en la formación de callos, debido a la capacidad de estimular la división de las células; así mismo, Litz y Jarret (1991) manifiestan que la presencia de la auxina 2,4-D permite la iniciación de la formación de callo embriogénico; en base a ello, se puede

deducir, que en la presente investigación, el uso de la auxina 2,4-D, en una concentración hormonal alta del 10,0 mg L<sup>-1</sup> influyó positivamente en los altos porcentajes de formación de estructuras callogénicas obtenidos, en los dos medios de cultivo evaluados.

#### **7.4. Inducción de raíces *de novo* en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.**

Según Haygert et al. (2017) el enraizamiento *in vitro* se caracteriza por la inducción de raíces adventicias en explantes que se mantienen en un medio de cultivo, con el fin de obtener plantas completas; es este sentido, en cuanto la variable formación de raíces *de novo* en las estructuras callogénicas de *C. maxima* en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación, no se registró formaciones organogénicas de raíces, en ninguno de los tratamientos ensayados, tanto en el medio de cultivo de Knudson-C, como en el de Murashige y Skoog, resultados que son diferentes a los reportados por Valderrama et al. (2009), quienes al evaluar el desarrollo *in vitro* de *Epidendrum* sp., en el medio basal de Knudson suplementado con 0,5% de carbón activado y 4 mg L<sup>-1</sup> de 6-BAP, reportaron el 45 % de formación de raíces *de novo*, a los 70 días de evaluación; mientras que, Gil et al. (2019) en su investigación al utilizar la citoquinina 6-BAP en concentraciones de 0,5 y 2 mg L<sup>-1</sup> en el medio de MS obtuvieron 0,62 y 0,56 % y al prescindir de la citoquinina, este porcentaje aumento a 7,35 % de formación de raíces en la especie *C. trianae*, en 180 días de evaluación.

En este contexto, los resultados obtenidos en la presente investigación, pueden ser atribuidos a las concentraciones de la combinación hormonal auxina-citoquinina utilizadas, ya que según manifiestan George et al. (2008), debe existir un equilibrio entre las concentraciones de los reguladores de crecimiento que se utilicen, para poder iniciar el proceso de crecimiento o diferenciación de raíces *de novo*; mientras que, Skoog y Miller (1957) mencionan que la relación de citoquinina/auxina en los medios nutritivos influye en la morfogénesis de raíces y brotes en el cultivo de tejidos vegetales; así mismos, Eckardt (2003) manifiesta que en todo proceso de formación de raíces adventicias, deben prevalecer las auxinas; lo cual es corroborado por Pierik (1990), quien señala que para inducir la formación de raíces adventicias, las auxinas son mucho más activas en bajas concentraciones y en condiciones de oscuridad; mientras que, Alcantara et al. (2019), manifiestan que las citoquininas estimulan elongación de las raíces.

**7.5. Inducción de brotes *de novo* en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.**

Según Bustamante et al. (2022) la generación de brotes *de novo* puede darse a partir de la organogénesis indirecta, la cual consiste en la formación del callo y a partir de la diferenciación del tejido calloso formara los brotes *de novo*, esto dependerá del tipo de explante y la combinación de los reguladores de crecimiento vegetal que se utilicen.

En este contexto, en la presente investigación, en lo relacionado a la variable formación de brotes *de novo* a partir de callos de *Cattleya maxima* Lindl., en condiciones de oscuridad total y 90 días de evaluación; en el medio de cultivo de Knudson-C (KC) el tratamiento T4 que estuvo conformado por 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, registró 43,33 % y el tratamiento T5 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) disminuyó a 26,67 %, resultados superiores a los reportados por Robles (2022) quien al utilizar 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP en el medio de cultivo KC, obtuvo 15 % de formación de brotes *de novo* en *C. maxima*, bajo condiciones de oscuridad. En relación a la formación de brotes *de novo* en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), el T4 constituido por 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, registró 10 % de formación, resultados que son inferiores a los obtenidos por Gil et al. (2019) en *C. trianae*, quienes utilizando el medio de cultivo MS, suplementado con 0,05 mg L<sup>-1</sup> de 6-BAP obtuvieron 47,2 % de brotes, en 180 días de evaluación.

En base a los resultados obtenidos el medio de cultivo más adecuado para la formación de brotes *de novo* es Knudson-C (KC) dado a que obtuvo el mayor porcentaje de formación 43,33 %. En este contexto, el porcentaje de formación de brotes puede ser atribuido a la baja concentración hormonal de la citoquinina BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>) empleada en la presente investigación lo que es corroborado por Eras et al. (2019) quienes comprobaron que a mayor concentración de citoquininas, mayor es la estimulación de brotes *de novo*; lo cual, es ratificado también por Lee et al. (2008) quienes manifiestan que, se puede aumentar el número de brotes *de novo* por explante, con el incremento de la concentración de la citoquinina BAP.



**7.6. Color de las estructuras callogénicas formadas de *Cattleya maxima* Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.**

Según Camacho (2023) el color de las estructuras callogénicas, está relacionado con la vitalidad y proliferación de los brotes *de novo*, el color de los callos puede variar; según Lallana y Lallana (2003) los callos pueden ser amarillentos, blancos, verdes, o coloreados con antocianinas, la pigmentación puede ser en toda la estructura o solo en algunas regiones. En base a ello, las tonalidades de coloración registradas en la presente investigación fueron: café, verde y crema; así, en las estructuras callogénicas formadas en *C. maxima*, al utilizar el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946) en el tratamiento T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) predominó el color crema, en el 93,33 % de los callos, la coloración verde registró el 33,33 %, en el tratamiento testigo (T0); y, el color café presentó el 16,67 % en el T5 (5,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); mientras que, Robles (2022) en su estudio reporta que el color predominante en los callos formados en *Cattleya maxima* Lindl, en el medio de cultivo KC, en condiciones de oscuridad total, fue el verde con 86,67 %, resultado que es superior al obtenido en el presente estudio.

Con respecto, al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) en los callos formados en el tratamiento T4 predominó el color crema con el 76,67 %, la tonalidad verde alcanzó el 23,33 % en el T2 (7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) y el color café, presentó el 16,67 % en los tratamientos T1 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) y T6 (7,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP); mientras que, Ávila y Salgado (2006), en su investigación con 9 especies de orquídeas estudiadas presentaron callos de color verde claro en el medio de cultivo de Murashige y Skoog.; así mismo, en el estudio realizado por Lee et al. (2010), en la especie *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*, en el medio de cultivo MS, el callo formado fue de color verde tenue cristalino con puntos verde intenso.

En este mismo sentido, Martínez et al. (2007) manifiestan que las condiciones del cultivo *in vitro* con que se trabaje, ya sea luz u oscuridad y el tipo de reguladores de crecimiento que se utilicen, influyen en esta variable; además, Espinosa et al. (2012) manifiestan que el color y textura del callo depende del tipo de explante utilizado.

**7.7. Friabilidad de las estructuras callogénicas inducidas en *Cattleya maxima* Lindl., en los medios de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.**

Según Lallana y Lallana (2003) la friabilidad muestra la formación de células en el callo y la capacidad que tienen para separarse o disgregarse, lo que hace posible obtener varios callos viables de un callo principal.

Con respecto, a la variable friabilidad de las estructuras callogénicas formadas en *Cattleya maxima* Lindl., bajo diferentes concentraciones hormonales, en condiciones de oscuridad total, en la presente investigación, en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946) los tratamientos T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) y T5 (5,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) registraron 70 % de estructuras callogénicas friables, resultados que son inferiores a los reportados por Robles (2022), quien en su investigación obtuvo el 86,67 % de estructuras friables en callos de *C. maxima* al combinar 3,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP en el medio de cultivo KC, en lo relación al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), los resultados obtenidos fueron inferiores; así, el tratamiento T7 (10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) registró 26,67 %, seguido del T5 con el 20 %, en condiciones de oscuridad total a los 90 días de evaluación, mientras que Barrera et al. (2003), en su estudio reportan buena friabilidad en los callos formados en *Laelia speciosa* L., en el medio de cultivo MS.

En base a ello, el mejor medio de cultivo para obtener callos friables es Knudson-C dado a que presente el mayor porcentaje de friabilidad 70 %. En este contexto, Barrera et al. (2003) mencionan que la friabilidad de los callos se encuentra relacionada con el empleo de fitohormonas, como las auxinas y citoquininas en las orquídeas; así mismo, Sánchez y Alvarenga (2015) manifiestan que utilizando el regulador de crecimiento auxina (2,4-D) como inductor principal, ya sea solo o en combinación con otras auxinas o citoquininas, se obtiene buenos porcentajes de friabilidad en las estructuras callogénicas.

## 8. Conclusiones

- En la formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., la combinación hormonal auxina-citoquinina, compuesta por 10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP; resultó ser la más efectiva, registrando un alto porcentaje de formación de callo del 100 % en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946) y 93,33 % en Murashige y Skoog (MS-1962). Esta información es importante para el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* de esta especie, lo que podría tener implicaciones significativas en su propagación y conservación.
- La formación de brotes *de novo* a partir de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., varió significativamente entre los medios de cultivo, así al utilizar 1,0 mg L<sup>-1</sup> de la citoquinina BAP; en el medio de cultivo KC, se obtuvo el mayor porcentaje de formación, con el 43,33 %; mientras que, en el medio de cultivo MS, se obtuvo valores inferiores, que no sobrepasaron el 10 %. Estas diferencias destacan la importancia de seleccionar cuidadosamente el medio de cultivo para optimizar la regeneración completa de plantas.
- La coloración de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., formadas en el medio de cultivo KC, en las concentraciones de los tratamientos T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) y T7 (10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) presentaron los mejores porcentajes, con el 93,33 % y 90 % de estructuras de color crema. Lo cual indica la alta vitalidad y proliferación que poseían los callos formados bajo estas concentraciones hormonales.
- La friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl, varió significativamente entre medios de cultivo y las concentraciones hormonales, en donde Knudson-C (KC-1946) suplementado con 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, obtuvo el 70 % de friabilidad; mientras que, en Murashige y Skoog (MS-1962) disminuyó considerablemente al 26,67 %, en la combinación hormonal 10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP. Resaltando la capacidad de los callos formados para separarse o disgregarse y la influencia del medio de cultivo.
- A pesar de la inducción exitosa de estructuras callogénicas, no se observó formación significativa de raíces o brotes *de novo* en el período de evaluación de este estudio. Esto sugiere la necesidad de investigar enfoques adicionales para mejorar la regeneración completa de plantas a partir de callos inducidos en la especie *Cattleya maxima* Lindl.

## 9. Recomendaciones

- Para disminuir el porcentaje de contaminación en los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., es recomendable utilizar material vegetal *in vitro*, dado a que este cuenta con las condiciones de asepsia necesarias, para garantizar la sobrevivencia del material vegetal en las subsiguientes etapas de la micropropagación.
- Para la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., es más apropiado utilizar el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946) y adicionar la combinación hormonal  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, en condiciones de oscuridad total, por cuanto en estas condiciones se obtuvo el mayor porcentaje de formación de callos (100 %); siendo el medio de cultivo más aceptado para el cultivo *in vitro* de orquídeas.
- Para la inducción de raíces *de novo* en *Cattleya maxima* Lindl., se recomienda probar concentraciones hormonales inferiores a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de la auxina 2,4-D, dado que las auxinas en bajas concentraciones, inducen la formación de raíces adventicias.
- Para la inducción de brotes *de novo*, a partir de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., se recomienda ensayar concentraciones superiores a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de la citoquinina BAP, debido a que, a partir de esta concentración se registró el mayor porcentaje de brotación (43,33 %), en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946).

## 10. Bibliografía

- Aguirre, G., Baudoin, J., y Leigue, L. (editores). 2010. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. Cochabamba, Bolivia. 240 p. <https://doi.org/10.26820/978-9942-787-98-9>
- Alcantara, J., Acero, J., Alcántara, J., y Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Alvarado, C. (2000). *Micropropagación de Cattleya skinneri y Cattleya skinneri x Cattleya maxima por cultivo de ápices*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Álvarez, J., Nuñez, F., Gutiérrez, H., Flores, J. C., Carreño, F., y Angulo, E. (2015). Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial. Ministerio del Ambiente de Perú.
- Armijos, J. (2018). *Desarrollo investigativo de las características orgánicas “Cattleya maxima” de vida silvestre en la ciudad de Piñas y su propuesta Culinaria*. [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil].
- Arosemena, A. (2017). El Ecuador y sus orquídeas: contribución al conocimiento del desarrollo de la orquideología del Ecuador. [https://9a33b7f4-a5d0-4a56-8456-4b7c7812cbff.filesusr.com/ugd/394bc6\\_23dcc2c76b304082a692608c7273edbc.pdf](https://9a33b7f4-a5d0-4a56-8456-4b7c7812cbff.filesusr.com/ugd/394bc6_23dcc2c76b304082a692608c7273edbc.pdf)
- Arroyo, A. G., Paz, M. S., García, B. P., Álvarez, E. R., y Gutiérrez, C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de Educación Bioquímica*, 33(1), 1-10. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2014/reb141c.pdf>
- Ávila, I., y Salgado, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*, 8(1), 138-149. <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/view/9/9>
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Banda, L., Pinzón, Y., y Vanegas, L. (2017). Características físicas y germinativas de la semilla de *Prosthechea* sp. (Orchidaceae) nativa de Fusagasugá. *Biota Colombiana*, 18(1), 79-86. <https://doi.org/10.21068/c2017.v18n01a6>
- Barrera, D., Chávez, V., y Sandoval, E. (2003). Propagación *in vitro* vía organogénesis indirecta de *Laelia speciosa* L. (Orchidaceae) especie en peligro de extinción. En *Memoria del*

*XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* (Vol. 28).

- Bermúdez, I., Rodríguez, M., y Jiménez, A. (2017). Efecto del uso combinado de citoquininas en la formación de yemas adventicias en banano cv ."Gros Michel" ( *Musa AAA* ). *Biotecnología Vegetal*, 17(1), 51-56. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/537/1288>
- Bustamante, K., Rocha, S., Sharry, S., Guerra, M., y Niella, F. (2022). Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121(2), 102. <https://doi.org/10.24215/16699513e102>
- Califa, S., y Estupiñán, L. (2020). Patrones de distribución de orquídeas en un relicto de bosque altoandino, Cundinamarca-Colombia. *Colombia Forestal*, 23(1), 5-19. <https://doi.org/10.14483/2256201X.14816>
- Camacho, J. (2023). *Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de Cinchona officinalis L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad*. [Tesis de grado, Universidad Nacional De Loja].
- Castellanos, C., y Torres, G. (2018). Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá "José Celestino Mutis", Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 328 p.
- Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. <http://www.inia.uy/publicaciones/documentos/compartidos/111219220807102417.pdf>
- Cox, L., Sageth, J., y Pérez, E. (2016). Diversidad y uso de las orquídeas. *Bioagrobiencias*, 9(1), 1-6. <https://www.researchgate.net/publication/342727642>
- Cueva, A., Alberca, N., Rino, C., y Lorenzo, C. (2014). Aislamiento, análisis filogenético y expresión de un gen del receptor de embriogénesis somática como quinasa (SERK) en *Cattleya maxima* Lindl. *Science Direct*, 21, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100139>
- Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca "CVC" - Fundación Agua Viva "FUNAGUA" (ed.). (2011). Planes de manejo para la conservación de 22 especies focales de plantas en el Departamento del Valle del Cauca. Cali, Colombia. 258 p.
- Deb, C., y Pongener, A. (2011). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo de plántulas *in vitro* de *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: una orquídea multipropósito. *Revista de*

*Bioquímica y Biotecnología Vegetal*. 20 (1), 90–95. <https://doi.org/10.1007/s13562-010-0031-4>

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Eckardt, N. (2003). A New Classic of Cytokinin Research: Cytokinin-Deficient Arabidopsis Plants Provide New Insights into Cytokinin Biology. *The Plant Cell*, 15(11), 2489-2492. <https://doi.org/10.1105/tpc.151110>
- Endara, L., Hirtz, A., y Jost, L. (2006). Especies de Orchidaceae. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500330>
- Eras, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., y Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona Officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 58–68.
- Eras, V., Moreno, J., Méndez, K., Yaguana, M., y Poma, R. (2019). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 20-28.
- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Masapanta, C., y Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 35(4), 407-415. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942012000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Flores, L., Robledo, A., y Jimarezl, M. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6), 1315-1328. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i6.297>
- George, E., Hall, M., y De Klerk, J. (2008). Propagación de plantas por cultivo de tejidos 3.<sup>a</sup> edición Volumen 1. En *Plant Propagation by Tissue Culture*. <https://investigacionfitopatologiaumar.files.wordpress.com/2016/06/plant-propagation.pdf>
- Gil, A., Ariza, C., Castillo, M., Salgado, L., Banda, L., y Vanegas, L. (2019). Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2), 1-9. <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275>
- Gonçalves, L., Machado, M., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M., y Mangolin, C. (2016).

- Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laelio cattleya* (Orchidaceae). *Idesia*, 34(1), 47-54. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>
- Gonzales, A., Mori, J., Tuisima, L., y Revilla, J. (2022). Influencia de la desinfección, medios de cultivo y fitohormonas en el desarrollo morfogénico *in vitro* de germoplasma de *Guazuma crinita* Mart. *Folia Amazónica*, 31(1), 57-70. <https://doi.org/https://doi.org/10.24841/fa.v31i1.572>
- Gonzalez, K. (2017). *Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de Cinchona officinalis L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja, Ecuador* [Tesis de grado , Universidad Nacional de Loja].
- Gonzalez, M., Urquiza, A., Alcocer, K., y Suarez, U. (2018). Preparación de medios de cultivo. *Revista Multidisciplinaria de Investigación*, 4(6), 11-15. [https://www.ugr.es/~cjl/medios de cultivo.pdf](https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf)
- González, O., Silva, J., Espinosa, Á., Ros, C., Acosta, L., Meneses, S., y Hernández, M. (2002). La embriogénesis somática en *Ipomoea*: una posibilidad para la multiplicación y conservación de los recursos vegetales. Universidad de Granma, Cuba.
- Haygert, K., Antônio, D., Kielse, P., y Pimentel, N. (2017). Enraizamiento y aclimatación de *Apuleia leiocarpa* plantlets. *Agrociencia*, 51(8), 909–920.
- Hernández, A., y Díaz, H. (2019). Inducción *in vitro* de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en “papa amarilla” *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa*, 26(1), 277-286. <https://doi.org/http://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26111>
- Hernández, Y., y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000400015](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015)
- Illescas, M. (2019). *Rojo Orchidaceae* (Universidad de Cuenca (ed.); Edición 1). <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/38785>
- Indacochea, B., y Parrales, J. (2017). UNESUM Aporta a la Biotecnología de Plantas. *Grupo COMPAS*, Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Jipijapa, Ecuador. 233 p.
- Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento : Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*, 15, 1–28.
- Jorgensen, P., & Yáñez, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden Press*, 1182.
- Lallana, V., y Lallana, M. (2003). Inducción de callos, utilizando la técnica de cultivo *in vitro*. *Manual de prácticas de fisiología vegetal*, 81-84.



- Larson, C. G., Hasbún, R., Paz, M., Sánchez, M., y Ríos, D. (2017). Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en la etapa de iniciación de cultivo *in vitro* de tejido adulto de *Castanea sativa* Mill. *Gayana Botanica*, 74(1), 30-40.
- Lee, H., Laguna, A., Murguía, J., Iglesias, L., García, B., Escobedo, D., Martínez, Y., Barredo, F., y Santana, N. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 323-332. <https://doi.org/10.35196/rfm.2010.4.323>
- Lee, H., Laguna, A., Murguía, J., Iglesias, L., García, B., Galindo, M., Landero, I., Ramírez, T., Barredo, F., y Santana, N. (2008). Rescate y multiplicación de las orquídeas *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* y *Vanilla planifolia* Andrews por métodos biotecnológicos. XXI Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y I del Trópico Mexicano, 524-535.
- Leopardo, C. (2008). Estudio taxonómico preliminar de la familia Orchidaceae, en algunas localidades del Estado Sucre, Venezuela. *ResearchGate*, April 2008, 353. [https://www.researchgate.net/publication/282575017\\_Estudio\\_taxonomico\\_preliminar\\_de\\_la\\_familia\\_Orchidaceae\\_en\\_algunas\\_localidades\\_del\\_Estado\\_Sucre\\_Venezuela](https://www.researchgate.net/publication/282575017_Estudio_taxonomico_preliminar_de_la_familia_Orchidaceae_en_algunas_localidades_del_Estado_Sucre_Venezuela)
- Litz, R., y Jarret, R. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. In: Embriogénesis. T. A. Thorpe ed. *in vitro* Embryogenesis in Plants-Netherlands, 155-203.
- Llorente, B. E. (2002). Cultivo de células y tejidos vegetales: generalidades. 28-42. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4\\_-\\_Cultivo\\_in\\_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y)
- Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Ecuador "MAATE". (2021). Manual para identificación de orquídeas para la Autoridad administrativa Cites y entidades de control en puertos, aeropuertos y fronteras. 174 p. <http://otca.org/wp-content/uploads/2021/06/LibroOrquideas21x21.pdf>
- Mamani, B., Nova, M., & Espinal, J. (2022). *In vitro* germination of *Zigopetalum maculatum* with different disinfection protocols and addition of coconut water to the culture media. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(2), 26-36.
- Martínez, M., Hernández, C., y Restrepo, L. (2007). Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borjój (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX(2), 45-55.
- Mata, M., Castañeda, M., y Salazar, V. (2021). Propagación *in vitro* de orquídeas veracruzanas.

- ResearchGate*, August. <https://www.researchgate.net/publication/353669734>
- Ministerio del Ambiente de Perú "MINAM". (2017). Orquídeas del Perú y herramientas para su identificación. Lima, Perú.
- Niessen, A., y Calderon, E. (2002). Plan de acción para la conservación de orquídeas del género *Cattleya* en Colombia - Proyecto Piloto. *Biosintesis*, 4. [http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/32645/biosintesis\\_30.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/32645/biosintesis_30.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Nieto, M., y Damon, A. (2014). El microscópico mundo de las orquídeas. *Ecofronteras*, 14-17.
- Páez, T., Romero, P., y Reyes, C. (2012). Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de Romerillo (*Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito. Laboratorio de Micropropagación Vegetal. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5678/1/AC-BIO-ESPE-033915.pdf>
- Pedraza, M. (2017). La propagación masiva de orquídeas (Orchidaceae); una alternativa de conservación de especies silvestres. *Agroproductividad*, 10(6), 31-36. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1036/885>
- Pedroza, J. (2009). Efecto del carbón activado , ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 17-32.
- Pedroza, J., Serrato, L., y Castaño, M. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria* Lindl., *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 86-102.
- Pequeño, I., Martínez, G., Aguirre, V., Iracheta, L., Mojica, V., Rodríguez, G., y Ojeda, M. (2015). Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo en dos genotipos de *Jatropha curcas* L. *Bioagro*, 27(3), 167-172.
- Pérez, B., y Castañeda, S. (2016). Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología vegetal*, 16(3), 143-151. <https://biblat.unam.mx/es/revista/biotecnologia-vegetal/articulo/propagacion-in-vitro-de-orquideas-nativas-como-una-contribucion-para-la-conservacion-ex-situ>
- Pérez, M., López, A., Otálora, G., Piñero, M. C., y Marín, M. (2014). Mejora de la aclimatación de plantas *in vitro* con altas concentraciones de CO<sup>2</sup>. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), La Alberca, Murcia, España.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Tercera edición. Ediciones Mundi-

- Prensa. Madrid, España. <https://bibliotecadigital.uce.edu.ec/s/L-D/item/1393#?c=&m=&s=&cv=>
- Robles, A. (2022). *Influencia de la sacarosa en la germinación in vitro de semillas e inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de Cattleya maxima Lindl.* [Tesis de grado, Universidad Nacional De Loja].
- Rodríguez, A., Rodríguez, A., Quintero, S., Torres, M., y Fundora, Z. (2004). Influencia de los medios de cultivo en la micropropagación de plátano (*Musa spp.*) y malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.). *Cultivos Tropicales*, 25, 23-26. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193230179004>
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., y Astorga, P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111-118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Salazar, G. (2007). Orquídeas. Diversidad biológica e inventarios. Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez, A., y Rodríguez, K. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí. *Ecovida*, 1(1), 54-64. <https://doi.org/10.46380/rias.v1i1.20>
- Sánchez, N., y Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193. <https://doi.org/10.15517/am.v21i1.11836>
- Sánchez, L., y Alvarenga, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (Uña de gato). *Revista Tecnología En Marcha*, 28, 105-120. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lang=pt](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lang=pt)
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2020). Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. En *Libros de cátedra*. <https://doi.org/10.35537/10915/46738>
- Sierra, R., Calva, O., y Guevara, A. (2021). La Deforestación en el Ecuador, 1990-2018. Factores promotores y tendencias recientes. Ministerio de Ambiente y Agua del Ecuador, Ministerio de Agricultura del Ecuador, en el marco de la implementación del Programa Integral Amazónico de Conservación de Bosques y Producción Sostenible. Quito, Ecuador, 216. c
- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-

130.

- Suzuki, R., Almeida, V., Pescador, R., y Ferreira, W. (2010). Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea*, 37(4), 731-742.  
<https://doi.org/10.1590/s2236-89062010000400004>
- Valderrama, S., Tejada, P., Sanchez, R., Parimango, C., Reyes, A., Vega, A., y Chico, J. (2009). Desarrollo *in vitro* de plantulas de *Epidendrum* sp. (Orchidaceae) utilizando carbón activado y 6-bencil-amino purina (BAP). *REBIOL*, 29(1)
- Viveros, P., y Molina, J. (2001). *Inventario de la familia Orchidaceae en dos relictos de la selva del Departamento del Quindío*. Universidad de Quindío, Armenia.

## 11. Anexos

Anexo 1. Visita por parte del Director del Trabajo de Integración Curricular (TIC), Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, a los ensayos instalados en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, para la inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl, a partir de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.



Anexo 2. Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946), bajo diferentes combinaciones hormonales auxina-citoquinina, a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

<b>Inducción de estructuras callogénicas en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1946)</b>						
<b>Fecha de siembra:</b> 22 de marzo del 2023						
<b>Fecha de la última evaluación:</b> 19 de junio del 2023						
<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>Contaminación (%)</b>	<b>Ex. Fenolizados (%)</b>	<b>Ex. con callo (%)</b>	<b>Raíces por callo (%)</b>	<b>Brotos por callo (%)</b>
T0	1	0	0	90	0	40
	2	0	0	90	0	0
	3	0	0	100	0	20
T1	1	0	0	100	0	10
	2	0	20	100	0	0
	3	20	10	80	0	10
T2	1	20	0	80	0	20
	2	0	0	80	0	10
	3	20	0	80	0	10
T3	1	0	0	90	0	20
	2	0	10	100	0	20
	3	0	0	100	0	0
T4	1	0	0	100	0	20
	2	0	0	100	0	40
	3	0	0	100	0	70
T5	1	0	40	100	0	40

	2	0	10	100	0	10
	3	0	10	80	0	30
T6	1	0	0	100	0	10
	2	0	0	90	0	10
	3	0	10	100	0	0
T7	1	0	0	100	0	0
	2	0	10	100	0	10
	3	0	0	100	0	0

Anexo 3. Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), bajo diferentes combinaciones hormonales auxina-citoquinina, a los 90 días de evaluación, en condiciones de oscuridad total.

<b>Inducción de estructuras callogénicas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962)</b>						
<b>Fecha de siembra:</b> 22 de marzo del 2023						
<b>Fecha de la última evaluación:</b> 19 de junio del 2023						
<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>Contaminación (%)</b>	<b>Ex. Fenolizados (%)</b>	<b>Ex. con callo (%)</b>	<b>Raíces por callo (%)</b>	<b>Brotos por callo (%)</b>
T0	1	0	0	100	0	0
	2	20	20	60	0	0
	3	40	0	60	0	0
T1	1	0	10	70	0	0
	2	0	10	90	0	0
	3	0	30	70	0	0
T2	1	40	0	30	0	0
	2	0	10	70	0	0
	3	0	0	100	0	0
T3	1	0	0	90	0	0
	2	0	40	90	0	0
	3	20	0	70	0	0
T4	1	0	0	100	0	0
	2	0	10	60	0	30
	3	0	20	90	0	0
T5	1	0	0	80	0	0
	2	20	10	70	0	0
	3	0	20	80	0	0
T6	1	0	0	90	0	0
	2	0	10	90	0	0
	3	0	50	90	0	0
T7	1	0	0	80	0	0
	2	0	20	100	0	0
	3	0	10	100	0	0

Anexo 4. Poster científico con los resultados preliminares, para la difusión a los asistentes de la Casa Abierta, organizada el 28 de julio del 2023, por la Carrera de Ingeniería Forestal, de la UNL.



unl

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables



Ingeniería Forestal  
LOJA - ECUADOR

## Inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas

Cárdenas Quevedo Daniela <sup>1\*</sup>; Eras Guamán Víctor Hugo <sup>1,2</sup>; Yaguana Arévalo Magaly <sup>2</sup>; González Zaruma Darlin <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

<sup>2</sup>Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Proyecto de investigación Cinchona 02-DI-FARNR-2021

\*Autor para correspondencia: daniela.cardenas@unl.edu.ec

### INTRODUCCIÓN

En Ecuador hasta la actualidad se han registrado 4 032 especies de orquídeas, de las cuales 1 714 son endémicas y alrededor de 400 aún se encuentran en proceso de estudio y descripción (Illescas, 2019).



La disminución de la cobertura vegetal, el saqueo, la sobrecolecta y la extracción masiva, amenazan a la familia Orchidaceae (Califa y Estupiñán, 2020). Además, presentan limitaciones en la germinación y el establecimiento en ambientes naturales (Banda et al., 2017). En este contexto la biotecnología como una técnica alternativa, mediante la aplicación del cultivo *in vitro*, permite la propagación clonal y sexual masiva de orquídeas aportando a su propagación y conservación (Pedraza, 2017).

### OBJETIVOS

- Evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC).
- Determinar el balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

### METODOLOGÍA

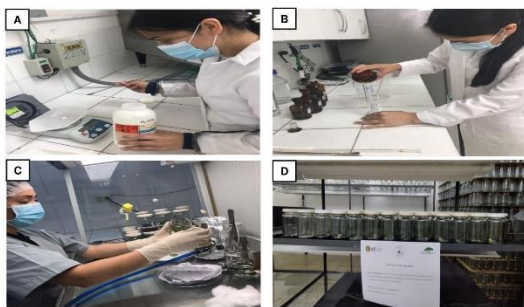


Figura 1. a y b) Preparación de los medios de cultivo; c) Inoculación *in vitro*; d) Incubación en oscuridad total de las unidades experimentales.

Tabla 1. Tratamientos evaluados para la inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas

Tratamientos	Regulador de crecimiento	
	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
T0	0,0	0,0
T1	5,0	0,0
T2	7,5	0,0
T3	10,0	0,0
T4	0,0	1,0
T5	5,0	1,0
T6	7,5	1,0
T7	10,0	1,0

### RESULTADOS

Formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), en condiciones de oscuridad total

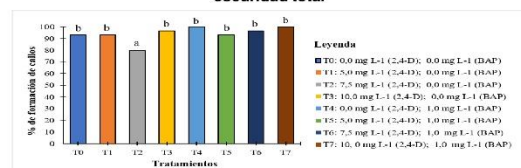


Figura 2. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a los 90 días de evaluación.



Figura 3. Estructuras callogénicas formadas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo KC, en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.

Formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), en condiciones de oscuridad total

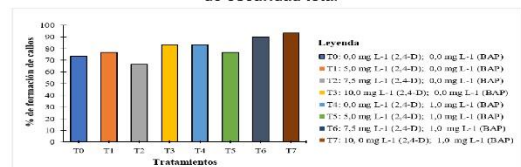


Figura 4. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a los 90 días de evaluación.



Figura 5. Estructuras callogénicas formadas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo MS, en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

### CONCLUSIONES

- El medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), resultó ser el mejor para la formación de estructuras callogénicas, en condiciones de oscuridad total, en donde T7 (10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) alcanzó el 100% de estructuras callogénicas en los explantes, obtenidos de protocormos *in vitro*.
- La combinación hormonal auxina-citoquinina del T7 (10,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP) en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), presentó el 93% de formación de estructuras callogénicas, en condiciones de oscuridad total.

### BIBLIOGRAFÍA

- Banda, L., Pinzón, Y., y Vanegas, L. (2017). Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea* sp. de la zona andina, Fusagasugá, Colombia. *Biota Colombiana*, 18(1), 79-86.
- Califa, S., y Estupiñán, L. (2020). Patrones de distribución de orquídeas en un relicto de bosque alto andino, Cundinamarca-Colombia. *Colombia forestal*, 23(1), 5-19.
- Illescas, M. (2019). *Rojo Orchidaceae*. Universidad de Cuenca. 1ª edición.
- Pedraza, M. (2017). La propagación masiva de orquídeas (Orchidaceae); una alternativa de conservación de especies silvestres. *Agroproductividad*, 10(6), 31-36.

## Cara anterior

### 3.1. Formación de estructuras callogénicas en protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), a los 90 días de evaluación.

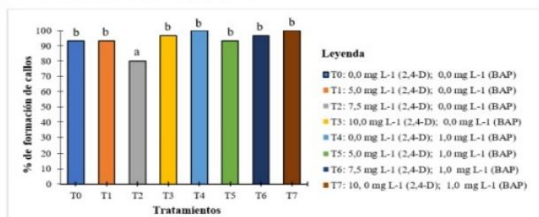


Figura 1. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC), en 90 días de evaluación (n = 30).

### 3.2. Formación estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS-1962), a los 90 días de evaluación.

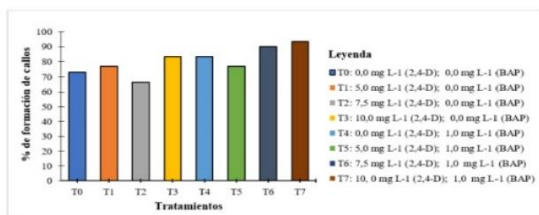


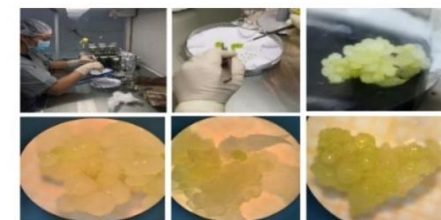
Figura 2. Porcentaje de formación de callo en protocormos de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS), en 90 días de evaluación (n = 30)

## CONCLUSIONES

- En la formación de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., la combinación hormonal auxina-citoquinina, compuesta por 10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP; resultó ser la más efectiva, registrando un alto porcentaje de formación de callo del 100 % en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946) y 93,33 % en Murashige y Skoog (MS-1962). Esta información es importante para el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* de esta especie, lo que podría tener implicaciones significativas en su propagación y conservación.
- La friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl, varió significativamente entre medios de cultivo y las concentraciones hormonales, en donde Knudson-C (KC-1946) suplementado con 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, obtuvo el 70 % de friabilidad; mientras que, en Murashige y Skoog (MS-1962) disminuyó considerablemente al 26,67 %, en la combinación hormonal 10,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP. Lo resalta la capacidad de los callos formados para separarse o disgregarse y la influencia del medio de cultivo.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
 FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES  
 CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL  
 Laboratorio de Micropropagación Vegetal  
 INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS CALLOGÉNICAS EN *Cattleya maxima* LINDL., A PARTIR DE EXPLANTES OBTENIDOS DE VITROPLANTAS



**AUTORA:**

Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo

**DIRECTOR:**

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc

LOJA – ECUADOR

2023



## Cara posterior

### INTRODUCCIÓN

En Ecuador hasta la actualidad se han registrado 4 032 especies pertenecientes a la familia Orchidaceae. Las cuales presentan condiciones fisiológicas que limitan la germinación y el establecimiento en ambientes naturales.

En este contexto, la biotecnología constituye una herramienta alternativa para la conservación y propagación de especies vegetales de difícil propagación y multiplicación. La calogénesis es una técnica que permite reproducir material vegetal *in vitro*, generando un tejido de callo a partir de un explante y mediante la adición de reguladores de crecimiento. Lo cual permite producir mayor cantidad de material vegetal, en un espacio reducido y en menor tiempo, aportando a la conservación y protección de la especie.

#### Objetivo general:

Contribuir a la generación de información científica, relacionada con la inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de vitroplantas, en dos medios de cultivo.

#### Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC).

- Determinar el balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de orquídeas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).

### METODOLOGÍA

#### 1. Área de estudio



Figura 1. Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UNL.

#### 2. Metodología

**Metodología para evaluar el efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962).**

##### 2.1. Material vegetal

Para que la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., se trabajó con semillas germinadas *in vitro* (Robles, 2022), que crecieron en condiciones asépticas en el LMV, a partir de ellas se obtuvieron protocormos, los cuales presentaban condiciones fisiológicas adecuadas en

cuanto a color y tamaño y no poseían hojas o raíces.

##### 2.2. Preparación del medio de cultivo

Se trabajo con los medios de cultivo sólidos de Knudson C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962), los cuales estuvieron suplementados, con 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de tiamina + 20, 0 g L<sup>-1</sup> de sacarosa + 2,0 g L<sup>-1</sup> de carbón activado y 6,0 g L<sup>-1</sup> de agar. También se añadió cuatro concentraciones de la auxina 2,4-D y dos concentraciones de la citoquinina BAP.

##### 2.3. Inoculación e incubación de explantes

En la cámara de flujo laminar, se inoculo dos protocormos en cada frasco de vidrio y se colocaron en el cuarto de incubación, bajo condiciones de oscuridad total, durante 90 días de evaluación.

##### 2.4. Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron fueron: contaminación, fenolización, días a la contaminación, N° de explantes con callo, N° de raíces y brotes por callo, días a la formación del callo, color y friabilidad.

### RESULTADOS

3. **Evaluación del efecto del balance hormonal auxina–citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946) y Murashige y Skoog (MS-1962).**

Anexo 6. Análisis de significancia del número de explantes contaminados de *Cattleya maxima* Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

Prueba de Kruskal Wallis									A
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p		
N° de Exp. contaminados T0		30	0,00	0,00	0,00	1,54	0,0036		
N° de Exp. contaminados T1		30	0,07	0,25	0,00				
N° de Exp. contaminados T2		30	0,13	0,35	0,00				
N° de Exp. contaminados T3		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. contaminados T4		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. contaminados T5		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. contaminados T6		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. contaminados T7		30	0,00	0,00	0,00				

Prueba de Kruskal Wallis									B
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p		
N° de Exp. contaminados T0		30	0,20	0,41	0,00	3,54	0,0032		
N° de Exp. contaminados T1		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. contaminados T2		30	0,13	0,35	0,00				
N° de Exp. contaminados T3		30	0,07	0,25	0,00				
N° de Exp. contaminados T4		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. contaminados T5		30	0,07	0,25	0,00				
N° de Exp. contaminados T6		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. contaminados T7		30	0,00	0,00	0,00				

Anexo 7. Análisis de significancia del número de explantes fenolizados de *Cattleya maxima* Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

Prueba de Kruskal Wallis									A
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p		
N° de Exp. Fenolizados T0		30	0,00	0,00	0,00	2,99	0,0038		
N° de Exp. Fenolizados T1		30	0,10	0,31	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T2		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T3		30	0,03	0,18	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T4		30	0,00	0,00	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T5		30	0,20	0,41	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T6		30	0,03	0,18	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T7		30	0,03	0,18	0,00				

Prueba de Kruskal Wallis									B
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p		
N° de Exp. Fenolizados T0		30	0,07	0,25	0,00	1,78	0,5464		
N° de Exp. Fenolizados T1		30	0,17	0,38	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T2		30	0,03	0,18	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T3		30	0,13	0,35	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T4		30	0,10	0,31	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T5		30	0,10	0,31	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T6		30	0,20	0,41	0,00				
N° de Exp. Fenolizados T7		30	0,10	0,31	0,00				

Anexo 8. Análisis de significancia del número de explantes con formación de callo de *Cattleya maxima* Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

Prueba de Kruskal Wallis								A
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	
N° de explantes con callo T0	T0	30	0,93	0,25	1,00	2,54	0,0311	
N° de explantes con callo T1	T1	30	0,93	0,25	1,00			
N° de explantes con callo T2	T2	30	0,80	0,41	1,00			
N° de explantes con callo T3	T3	30	0,97	0,18	1,00			
N° de explantes con callo T4	T4	30	1,00	0,00	1,00			
N° de explantes con callo T5	T5	30	0,93	0,25	1,00			
N° de explantes con callo T6	T6	30	0,97	0,18	1,00			
N° de explantes con callo T7	T7	30	1,00	0,00	1,00			

Prueba de Kruskal Wallis								B
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	
N° de explantes con callo T0	T0	30	0,73	0,45	1,00	4,87	0,1721	
N° de explantes con callo T1	T1	30	0,77	0,43	1,00			
N° de explantes con callo T2	T2	30	0,67	0,48	1,00			
N° de explantes con callo T3	T3	30	0,83	0,38	1,00			
N° de explantes con callo T4	T4	30	0,83	0,38	1,00			
N° de explantes con callo T5	T5	30	0,77	0,43	1,00			
N° de explantes con callo T6	T6	30	0,90	0,31	1,00			
N° de explantes con callo T7	T7	30	0,93	0,25	1,00			

Anexo 9. Análisis de significancia del número de brotes formados en las estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl: A) Medio de cultivo de Knudson-C (KC); B) Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

Prueba de Kruskal Wallis								A
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	
N° de brotes por callo T0	T0	30	0,20	0,76	0,00	4,80	0,0479	
N° de brotes por callo T1	T1	30	0,07	0,25	0,00			
N° de brotes por callo T2	T2	30	0,13	0,35	0,00			
N° de brotes por callo T3	T3	30	0,13	0,35	0,00			
N° de brotes por callo T4	T4	30	0,43	0,82	0,00			
N° de brotes por callo T5	T5	30	0,27	0,64	0,00			
N° de brotes por callo T6	T6	30	0,07	0,25	0,00			
N° de brotes por callo T7	T7	30	0,03	0,18	0,00			

Prueba de Kruskal Wallis								B
Variable	N° Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	
N° de brotes por callo T0	T0	30	0,00	0,00	0,00	0,09	0,4289	
N° de brotes por callo T1	T1	30	0,00	0,00	0,00			
N° de brotes por callo T2	T2	30	0,00	0,00	0,00			
N° de brotes por callo T3	T3	30	0,00	0,00	0,00			
N° de brotes por callo T4	T4	30	0,10	0,55	0,00			
N° de brotes por callo T5	T5	30	0,00	0,00	0,00			
N° de brotes por callo T6	T6	30	0,00	0,00	0,00			
N° de brotes por callo T7	T7	30	0,00	0,00	0,00			

## Anexo 10. Certificación de la traducción del Abstrac



Mg. Yanina Quizhpe Espinoza  
Licenciada en Ciencias de Educación mención Inglés  
Magister en Traducción y mediación cultural

Celular: 0989805087  
Email: [yaniges@icloud.com](mailto:yaniges@icloud.com)  
Loja, Ecuador 110104

Loja, 26 de marzo de 2024

Yo, Lic. Yanina Quizhpe Espinoza, con cédula de identidad 1104337553, docente del Instituto de Idiomas de la Universidad Nacional de Loja, y certificada como traductora e intérprete en la Senescyt y en el Ministerio de trabajo del Ecuador con registro **MDT-3104-CCL-252640**, certifico:

Que tengo el conocimiento y dominio de los idiomas español e inglés y que la traducción del resumen del Trabajo de Integración Curricular denominado **Inducción de estructuras callogénicas en *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas**, cuya autoría de la estudiante Daniela Fernanda Cárdenas Quevedo, con cédula 0705646453, estudiante de la Carrera de Ingeniería Forestal de la Facultad Agropecuaria y Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, es verdadero y correcto a mi mejor saber y entender.

Atentamente

YANINA BELEN QUIZHPE ESPINOZA  
Firmado digitalmente por YANINA BELEN QUIZHPE ESPINOZA  
Fecha: 2024.03.26 19:37:09 -0500

Mg. Yanina Quizhpe Espinoza.

**Traductora freelance**

*Full text translator: servicios de traducción*