



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Forestal

Influencia de la sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas e inducción de estructuras calogénicas, a partir de vitroplantas de

***Cattleya maxima* Lindl**

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

Autora:

Ana Cristina Robles Lara

Director:

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg.Sc.

Loja- Ecuador

2022

Certificación

Loja, 18 de agosto de 2022

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACION CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Influencia de la sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas e inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl** de la autoría de la estudiante Ana Cristina Robles Lara, con cedula de identidad Nro. 1106081118, previa a la obtención del título de Ingeniera Forestal. Una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Nacional de Loja, apruebo y autorizo la presentación para los trámites de titulación.



Firmado electrónicamente por:

VICTOR HUGO

ERAS GUAMAN

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

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Ana Cristina Robles Lara**, 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 o acciones legales, por el contenido de la misma. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Institucional- Biblioteca Virtual.

A handwritten signature in blue ink that reads "Ana C. Robles". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

Firma:

Autora: Ana Cristina Robles Lara

C.I. 1106081118

Fecha: 01/12/2022

Correo electrónico: ana.c.robles@unl.edu.ec/ critinarobleslara18@gmail.com

Celular: 0969414160

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

Yo, **Ana Cristina Robles Lara**, declaro ser autora del presente trabajo de integración curricular denominado **Influencia de la sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas e inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima Lindl***, 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 de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional (RDI).

Los usuarios puedan hacer uso de este documento para consultas de los contenidos de este trabajo en el RDI, 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 de del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para la constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los un días del mes de diciembre dos mil veintidós.



Firma:

Autora: Ana Cristina Robles Lara

C.I: 1106081118

Dirección: Loja, Turunuma alto (Cadiz y Burgos)

Correo electrónico: ana.c.robles@unl.edu.ec

Celular: 0969414160

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director del Trabajo de Integración Curricular

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

Dedicatoria

A Dios, por regalarme sabiduría, amor y salud, por estar presente en cada una de mis decisiones de vida, por la capacidad de permitirme aprovechar las oportunidades que se me han presentado hasta este momento y así en un futuro, por las personas lindas y maravillosas que aportaron en mi proceso constantemente.

Esta meta me la dedico en especial a mí por todas las ganas que le puse a mi estudio y esfuerzo emitido en cada ciclo con cada asignatura, me dedico este logro por tener mi propósito muy claro, al amor que me tengo y tengo a las personas que han estado muy directamente a lo largo de mi vida apoyándome y motivándome.

A ella, que dio todo el amor incondicional, la paciencia y la confianza, su esfuerzo y trabajo constante, con apoyarme en absolutamente todo, a la fortaleza que me transmitió cada día, por formarme una mujer, hermana e hija de bien, porque ella es el pilar indispensable del cual el por qué yo mantuve y mantendré mis propósito.

A mi Neider que se ha encargado de sacarme risas y ser un hermano maravilloso, con su música y su criterio de siempre, las discusiones que siempre fueron productivas y en especial hacer que mi formación académica tenga algo de divertido siempre con cada ocurrencia, Robinson mi niño ternura, que su cariño ha sido increíble y a Mario por estar presente como gran amigo.

A mis padres, hermanos y sobrinos, que han aportado con las experiencias y enseñanzas propias para motivarme y hacerme fuerte, enseñarme que todo tiene un porque y una razón de ser, por estar y enseñarme que puedo con todo lo que me proponga y que los retos son parte fundamental para crecer.

A esas personitas que en última instancia motivaron parte del proceso, por la ternura y sobre todo la paciencia, por el sarcasmo, las risas y a mis angelitos que del cielo me cuidan.

A las personas más que amo y aman, infinitas gracias

Ana Cristina Robles Lara

Agradecimiento

Agradecer primeramente a Dios, por lo bueno de mi vida, por su infinita sabiduría que en mi ha expresado, por el amor preciso en cada momento que lo he requerido, por ponerme personas maravillosas, que me han ayudado a crecer como ser humano emocional y físicamente, la presencia de Él ha sido fundamental para culminar esta etapa universitaria. A mi director de tesis, Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, por la paciencia, la entrega a su profesión y a sus estudiantes, por la dedicación y amor que deposito en mi trabajo, por confiar en mi al integrarme en su extraordinario equipo de investigación, gracias por transmitirme valiosos conocimientos académicos y experiencias para mi formación personal y recordarme cada día que la base fundamental del éxito es el amor y el esfuerzo diario.

Al equipo de investigación del laboratorio, Ing. Agrónoma Magaly Yaguana Arévalo por su predisposición absoluta en transmitirme sus conocimientos, por el cariño y confianza, por las experiencias compartidas; al Ing. For. Darlin González Zaruma por su tiempo y por enseñarme que existen distinta formas de conseguir buenos resultados dedicándome constantemente.

A Eva María Robles por ser y estar, gracias por el amor absoluto y la confianza y enseñarme a que todo lo puedo hacer con mucho trabajo y amor, por enseñarme a ser persona de bien y hacer las cosas bien por mí y por las personas que amo, a Neider y Robinson por la ternura, a mi familia, mi madre, padre y hermanos por las sonrisas, que con sus acciones me han ayudado a reflexionar cada una de las oportunidades que he tenido en mi corta vida.

Finalmente y no menos importante a mi grupo Ciatío, por ser esa parte importante en todo el periodo académico, apoyarme con sus conocimientos y risas en los momentos más oportunos y la amistad incondicional, al Ing. For. Darío Veintimilla que en su momento me enseñó que debo esforzarme y que todo es posible cuando uno se dedica, que las clases no deben ser monótonas y existen diferentes formas de aprender y enseñar.

A todos mis docentes en el proceso infinitas gracias

Ana Cristina Robles Lara

Índice de contenido

Portada	i
Certificación	ii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenido	vii
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiv
Índice de anexos	xvii
1. Título	1
2. Resumen	2
2.1 Abstract	4
3. Introducción	6
Objetivo General:	8
Objetivos Específicos:	8
4. Marco Teórico	9
4.1. Generalidades de la familia Orchidaceae	9
4.2 Descripción de género <i>Cattleya</i>	9
4.2.1 Descripción de <i>Cattleya maxima</i> Lindl	9
4.2.2 Descripción taxonómica	10
4.2.3 Distribución de <i>Cattleya maxima</i> Lindl	10
4.2.4 Uso de <i>Cattleya maxima</i> Lind.	10
4.3 Métodos de propagación <i>in vivo</i> de la especie	10
4.3.1 Propagación sexual	11
4.3.2 Multiplicación asexual	11
4.4 Características de la micropropagación <i>in vitro</i>	11
4.4.1 Ventajas del cultivo <i>in vitro</i>	12
4.4.2 Desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	12
4.4.3 Fases de la micropropagación	12

4.4.3.1 Fase 0: Selección y preparación de la planta madre.....	13
4.4.3.2 Fase 1: Desinfección del material vegetal	13
4.4.3.3 Fase 2: Implantación del material <i>in vitro</i>	13
4.4.3.4 Fase 3: Multiplicación de los brotes	14
4.4.3.5 Fase 4: Enraizamiento de los explantes	14
4.4.3.6 Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados.....	14
4.5 Medio de cultivo.....	15
4.5.1 Composición química del medio de cultivo Knudson-C (KC-1922)	15
4.5.2 Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962) ...	16
4.6 Reguladores de crecimiento.....	17
4.6.1 Auxinas.....	17
4.6.2 Citoquininas o citocininas	18
4.6.3 Giberelinas.....	18
4.6.4 Etileno.....	19
4.7 Vitaminas.....	19
4.8 Factores que intervienen en el cultivo de tejidos vegetales.....	20
4.8.1 El inóculo o explante	20
4.8.2 Factores físicos	20
4.8.2.1 Temperatura	20
4.8.2.2 Humedad relativa.....	20
4.8.2.3 Luz.....	20
4.8.2.4 pH	21
4.9.1 Callogénesis <i>in vitro</i> de <i>Cattleya maxima</i> Lindl	21
4.9.2 Cultivo de callos	22
5. Metodología.....	24
5.1 Ubicación del área de estudio.....	24
5.1.1 Fase de campo	24
5.1.2 Fase de laboratorio.....	24
5.1.3 Fase de laboratorio.....	24
5.2 Metodología para evaluar la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1922), probando tres concentraciones de sacarosa.....	25
5.2.1 Selección y desinfección de las cápsulas.....	25
5.2.2 Preparación del medio de cultivo	25
5.2.3 Inoculación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.	26

5.2.4 Incubación <i>in vitro</i> de las semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.....	27
5.2.5 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo en el cuarto de incubación del laboratorio.....	27
5.2.6 Diseño experimental	28
5.2.6.1 Especificaciones del diseño experimental	28
5.2.6.2 Variables evaluadas	28
5.2.6.3 Análisis estadístico	29
5.3.1 Selección de material vegetal de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.....	29
5.3.2 Preparación de medio de cultivo	30
5.3.3 Inoculación <i>in vitro</i> de los explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en condiciones de oscuridad	30
5.3.4 Incubación de los explantes en total oscuridad	31
5.3.5 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo en el laboratorio, en total oscuridad.....	31
5.3.6 Diseño experimental para el ensayo en oscuridad.....	32
5.3.6.1 Especificaciones del diseño experimental de oscuridad.....	32
5.3.6.2 Incubación de los explantes en condiciones de fotoperiodo.....	33
5.3.6.3 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo en el cuarto de incubación en fotoperiodo.	33
5.3.6.4 Diseño experimental para ensayo de fotoperiodo.....	33
5.3.6.5 Especificaciones del diseño experimental en fotoperiodo.....	34
5.3.6.6 Variables evaluadas en condiciones de oscuridad y fotoperiodo	35
5.3.6.7 Análisis estadístico	37
5.4 Metodología para la difusión de los resultados de investigación, a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.....	37
6. Resultados.....	39
6.1 Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en medio de cultivo Knudson C (KC-1922), probando tres concentraciones de sacarosa	39
6.1.2 Contaminación de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson C (KC-1922)	39
6.1.3 Germinación de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson C (KC-1922), probando tres concentraciones de sacarosa.	39
6.2 Influencia de la oscuridad en la formación de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.	40
6.2.1 Contaminación de los explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en condiciones de oscuridad.	40
6.2.2 Oxidación fenólica de los explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en oscuridad	41
6.2.3 Mortalidad de los explantes <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en la oscuridad.....	42

6.2.4 Formación de estructuras callogénicas en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en la oscuridad	43
6.2.4.1 Días a la formación de estructuras callogénicas en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en la oscuridad.....	45
6.2.4.2 Porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas en condiciones de oscuridad	46
6.2.4.3 Color de callo en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en oscuridad a los 60 días de evaluación	46
6.2.4.4 Friabilidad del callo en total oscuridad.....	47
6.2.5 Porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en oscuridad.....	48
6.2.5.1 Días a la formación de brotes en estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en oscuridad a los 60 días de evaluación.....	49
6.3 Influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.	50
6.3.1 Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	50
6.3.2 Porcentaje de oxidación fenólica en callos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	51
6.3.3 Porcentaje de mortalidad de callos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	52
6.3.3.1 Formación de estructuras callogénicas en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	53
6.3.3.2 Días a la formación de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	55
6.3.3.3 Porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas, bajo condiciones de fotoperiodo	55
6.3.3.4 Color del callo de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	56
6.3.3.5 Friabilidad del callo de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	57
6.4 Formación de brotes en estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo	58
6.5 Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales	60
7. Discusión	61
7.1 Efecto de tres concentraciones de sacarosa en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl, en el medio de cultivo Knudson C (KC-1922).....	61
7.1.2 Porcentaje de contaminación	61
7.1.3 Porcentaje de germinación.....	61
7.2 Fase de inducción de callos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas.....	62

7.2.1. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en la formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo 16/8 y oscuridad.....	62
7.2.2 Porcentaje de Contaminación	62
7.2.3 Porcentaje de Oxidación Fenólica	63
7.2.4 Porcentaje de formación de estructuras callogénicas	63
7.2.5 Porcentaje de protocormos que formaron brotes, a partir de estructuras callogénicas	64
7.2.6 Porcentaje de color de los callos.....	65
7.2.7 Porcentaje de friabilidad del callo	65
7.3 Difusión de información generada	66
8. Conclusiones.....	67
9. Recomendaciones.....	68
10. Bibliografía.....	69
11. Anexos.....	74

Índice de tablas

Tabla 1: Composición química del medio de cultivo Knudson-C (KC -1922).	16
Tabla 2: Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962)...	16
Tabla 3: Reguladores de crecimiento.	17
Tabla 4: Descripción de los niveles de sacarosa aplicados en cada tratamiento.	26
Tabla 5: Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el laboratorio, para evaluar los distintos niveles de sacarosa aplicados.	27
Tabla 6: Tratamientos para evaluar el efecto de tres concentraciones de sacarosa, en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.	28
Tabla 7: Descripción del factor y niveles, para evaluar el efecto de tres concentraciones de sacarosa en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.	28
Tabla 8: Hoja de registro para la toma de datos de número de frascos de contaminación, días a la germinación y porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.	29
Tabla 9: Descripción del balance hormonal de auxina- citoquinina, para la inducción <i>in</i> <i>vitro</i> de estructuras callogénicas de orquídea de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., provenientes de vitroplantas.	30
Tabla 10: Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación en condiciones de oscuridad, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl.....	31
Tabla 11: Tratamientos para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina- citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya</i> <i>maxima</i> Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas.	32
Tabla 12: Descripción de factores y niveles de ANA y BAP utilizados, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in</i> <i>vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.	32
Tabla 13: Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación bajo condiciones de fotoperiodo.	33
Tabla 14: Tratamientos para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina- citoquinina en fotoperiodo, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras	

calogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.	34
Tabla 15: Descripción de factores y niveles de ANA y BAP a utilizar, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina en fotoperiodo, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras calogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.	34
Tabla 16: Hoja de registro de datos para evaluar el número de explantes contaminados, número de explantes muertos y número de explantes fenolizados, en la inducción de estructuras calogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.	35
Tabla 17: Hoja de registro para la toma de datos de las variables, para evaluar la inducción de estructuras calogénicas de la <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.	36

Índice de figuras

Figura 1: <i>Cattleya maxima</i> Lindl.	9
Figura 2: Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.	24
Figura 3: A) Pesaje de vitaminas y hormonas utilizadas. B) Disolución de vitaminas y hormonas C) Distribución y medición del medio de cultivo para cada tratamiento D) Tratamientos distribuidos con distintos niveles de sacarosa.	26
Figura 4: Inoculación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el Medio de Cultivo Knudson-C (KC-1922); A) Materiales utilizados para inoculación, B) Cápsulas fisiológicamente maduras, C) Apertura de cápsulas, D) Inoculación de semillas E) Identificación de frascos, F) Incubación de las semillas.	27
Figura 5: Inoculación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el Medio de Cultivo Murashige y Skoog (MS-1962); A) Protocormos B) Disección de explantes, C) Inoculación de explantes.	30
Figura 6: Curva acumulativa del porcentaje de contaminación de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 90 días de evaluación.	39
Figura 7: Curva acumulativa del porcentaje de germinación de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Knudson C, a los 90 días de evaluación.	40
Figura 8: Curva acumulativa de contaminación de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 60 días de evaluación en la oscuridad.	41
Figura 9: Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.	42
Figura 10: Porcentaje de mortalidad de los explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.	43
Figura 11: Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.	44
Figura 12: Aspecto de la formación de estructuras callogénicas en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 60 días de valuación en la oscuridad, A: T0 (0,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); B: T1 (1,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); C: T2 (2,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); D: T3 (3,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); E: T4 (0,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP); F: T5 (1,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg	

	L ⁻¹ BAP); G: T6 (2,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP); H: T7 (3,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP).....	44
Figura 13:	Días a la formación de estructuras callogénicas en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.....	45
Figura 14:	Porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas, a los 60 días de evaluación en la oscuridad.....	46
Figura 15:	Porcentaje de color del callo en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.....	47
Figura 16:	Porcentaje de friabilidad del callo en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.	48
Figura 17:	Porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl, a los 60 días de evaluación en la oscuridad.....	49
Figura 18:	Días a la formación de brotes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl, a los 60 días de evaluación en la oscuridad.....	50
Figura 19:	Porcentaje de contaminación de callos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperíodo, a los 60 días de evaluación.....	51
Figura 20:	Porcentaje de oxidación fenólica de callos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl, bajo condiciones de fotoperíodo a los 60 días de evaluación.....	52
Figura 21:	Porcentaje de mortalidad de callos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperíodo a los 60 días de evaluación.	53
Figura 22:	Porcentaje de formación de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperíodo, a los 60 días de evaluación.....	54
Figura 23:	Formación de estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperíodo, a los 60 días de evaluación, A:T0 (0,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); B: T1 (1,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); C: T2 (2,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); D: T3 (3,0 mg L ⁻¹ ANA+0,0 mg L ⁻¹ BAP); E: T4 (0,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP); F: T5 (1,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP); G: T6 (2,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP); H: T7 (3,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP).....	54
Figura 24:	Días a la formación de callos de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperíodo, a los 60 días de evaluación.....	55
Figura 25:	Porcentaje de protocormos que formaron callo, bajo condiciones de fotoperíodo, a los 60 días de evaluación.	56

Figura 26: Porcentaje de color del callo en explantes de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo a los 60 días de evaluación.	57
Figura 27: Friabilidad del callo de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.	58
Figura 28: Porcentaje de formación de brotes, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.....	59
Figura 29: Días de formación de brotes en estructuras callogénicas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.	60

Índice de anexos

Anexo 1. Recolección de cápsulas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl., en una colección de germoplasma en el orquideario de propiedad del Ing. Marco Vallejo, en la parroquia Malacatos.....	74
Anexo 2. Datos recolectados de porcentajes de contaminación del ensayo en el primer objetivo implementado.....	75
Anexo 3. Datos recolectados en la variable de germinación de semillas de <i>Cattleya maxima</i> Lindl del ensayo en el primer objetivo implementado.	75
Anexo 4. Prueba de Kruskal Wallis (alfa=0.05), entre fotoperiodo y oscuridad bajo distintas combinaciones hormonales de auxina-citoquinina.	76
Anexo 5. Certificado de traducción.....	76

1. Título

Influencia de la sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas e inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl

2. Resumen

Las orquídeas tienen gran importancia ornamental por su belleza escénica; así, *Cattleya* es un género de alta comercialización, que presenta flores grandes y de colores vistosos muy atractivos. En el hábitat natural de la especie se registran pocos individuos con limitada producción de cápsulas, donde existe una baja tasa de germinación. Sin embargo, debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro*, y otras metodologías para la generación de diversos procesos morfogénicos, a partir de estructuras callogénicas obtenidas de vitroplantas, las mismas que permiten la multiplicación potencial de la especie, aprovechando la totipotencialidad de las células callogénicas. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo fundamental generar información científica sobre la germinación *in vitro* de semillas y la inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl. La metodología para el primer objetivo consistió en seleccionar cápsulas fisiológicamente maduras, de donde se obtuvieron las semillas, las cuales fueron sometidas a un proceso de desinfección con solución de hipoclorito de sodio, luego en la cámara de flujo laminar se extrajeron las semillas y se inocularon en el medio de cultivo Knudson-C (1922) suplementado con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 0,5 mg L⁻¹ de tiamina (Vitamina B1) + 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina + 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico + 200 mg L⁻¹ de agua de coco + 2,0 g L⁻¹ de carbón activado y 5,8 g L⁻¹ de agar, respectivamente, al cual se adicionó diferentes concentraciones de sacarosa en los cuatro tratamientos. En el segundo objetivo se ensayó la inducción de callos, a partir de vitroplantas, las mismas que fueron inoculados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962), con una combinación hormonal de Auxinas (ANA) y citoquininas (BAP), en diferentes concentraciones, en dos condiciones de incubación: uno expuesto en total oscuridad y otro bajo condiciones de fotoperiodo (16/8). En cada ensayo se empleó un diseño estadístico completamente al azar, con ocho tratamientos y con tres repeticiones, respectivamente. Los resultados muestran que en el tratamiento testigo (T0) se obtuvo el 91,1 % de germinación; sin embargo, se obtuvieron altos porcentajes en todos los tratamientos adicionados con diferentes niveles de sacarosa de esta manera se pudo comprobar así, la capacidad de *Cattleya maxima* Lindl., para germinar bajo concentraciones de sacarosa, con un 86,7 %, siendo el más alto. Por otra parte, en la combinación hormonal de 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, correspondiente al

tratamiento T5, expuesto en total oscuridad, se presentó el mayor porcentaje de formación de callos, con el 16,67 %, resultado que fue bajo en la capacidad de la especie para formar estructuras callogénicas, a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas, en las diferentes combinaciones hormonales de auxina y citoquinina ensayadas.

La efectividad de la sacarosa en la germinación asimbiótica *in vitro* de *Cattleya maxima* Lindl y las diferentes concentraciones en el balance hormonal auxina-citoquinina, son una alternativa para la propagación de la especie, ya que contribuye a incrementar un mayor número de plántulas por unidad de superficie, en un corto periodo de tiempo.

Palabras clave: Orquídeas, simbiosis, sacarosa, callo

2.1 Abstract

Orchids are of great ornamental importance for their scenic beauty; thus, *Cattleya* is a highly marketable genus, which has large flowers and very attractive showy colors. In the natural habitat of the species there are few individuals with limited production of capsules, where there is a low germination rate. However, due to the difficulty of orchid seeds to germinate naturally, asymbiotic germination methodologies have been developed under *in vitro* conditions, and other methodologies for the generation of various morphogenic processes, from callogenic structures obtained from vitroplants, which allow the potential multiplication of the species, taking advantage of the totipotentiality of callogenic cells. In this context, the main objective of this research was to generate scientific information on the *in vitro* germination of seeds and the induction of callogenic structures from vitroplants of *Cattleya maxima* Lindl. The methodology for the first objective consisted of selecting physiologically mature capsules, from which the seeds were obtained, which were subjected to a disinfection process with sodium hypochlorite solution, then in the laminar flow chamber the seeds were extracted and inoculated in Knudson-C (1922) culture medium supplemented with 100 mg L⁻¹ of myo-inositol + 0,5 mg L⁻¹ thiamine (Vitamin B1) + 0.5 mg L⁻¹ pyridoxine + 0.5 mg L⁻¹ nicotinic acid + 200 mg L⁻¹ coconut water + 2.0 g L⁻¹ activated charcoal and 5.8 g L⁻¹ agar, respectively, to which different concentrations of sucrose were added in the four treatments. In the second objective, the induction of callus was tested, starting from vitroplants, which were inoculated in the culture medium of Murashige and Skoog (MS, 1962), with a hormonal combination of Auxins (ANA) and cytokinins (BAP), in different concentrations, in two incubation conditions: one exposed in total darkness and the other under photoperiod conditions (16/8). In each trial, a completely randomized statistical design was used, with eight treatments and three replicates, respectively. The results show that in the control treatment (T0) 91.1% germination was obtained; however, high percentages were obtained in all the treatments added with different levels of sucrose, thus proving the capacity of *Cattleya maxima* Lindl. to germinate under sucrose concentrations, with 86.7% being the highest. On the other hand, in the hormonal combination of 1.0 mg L⁻¹ ANA+0.5 mg L⁻¹ BAP, corresponding to treatment T5, exposed in total darkness, the highest percentage of callus formation was presented, with 16.67 %, a result that was low in the capacity of the species to form callogenic structures, from

protocorms obtained from vitroplants, in the different hormonal combinations of auxin and cytokinin tested.

The effectiveness of sucrose in the *in vitro* asymbiotic germination of *Cattleya maxima* Lindl and the different concentrations in the auxin-cytokinin hormonal balance, are an alternative for the propagation of the species, since it contributes to increase a greater number of seedlings per unit area, in a short period of time.

Keywords: Orchids, symbiosis, sucrose, callus.

3. Introducción

El Ecuador es reconocido a nivel mundial por su riqueza florística que se encuentra amenazada. Se estima que el país tiene más especies de plantas por unidad de superficie que cualquier otro país de América del Sur (Baquero et al., 2004); siendo las tierras bajas de la Costa del Ecuador, entre la Cordillera de los Andes y el Océano Pacífico, una región de alta biodiversidad y un alto nivel de endemismo de plantas vasculares (Sánchez, 2018).

Ecuador es considerado como el país con la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, el número de especies presentes supera a países vecinos de mayor extensión territorial, como Colombia, Perú y Brasil, debido a factores como convergencia de las floras originarias e importantes de América Central, la Amazonía y la parte sureña de América del Sur y por ende una extrema diversidad de hábitats y microclimas en el país, producidos por la altura de las cordilleras andinas, el encuentro de las corrientes: fría de Humboldt y la cálida de El Niño; además, de la pluviosidad proveniente de la Amazonía (Jiménez, 2014).

Las orquídeas son la familia que aporta con el mayor número de especies al Fito endemismo del Ecuador, pues un tercio de las plantas endémicas del Ecuador son orquídeas (Fernandez et al., 2018). Las orquídeas presentan factores intrínsecos que limitan su propagación sexual y la variación genética que en ellas se puede presentar. Estos factores están relacionados con el pequeño tamaño de las semillas y sus escasas reservas alimenticias en el embrión, que las llevan a establecer asociaciones simbióticas, principalmente con hongos micorrízicos para lograr su germinación (Pérez et al., 2016).

Cattleya es un género de orquídea con alrededor de 55 especies y se encuentra distribuida naturalmente en zonas tropicales o bosques húmedos que están dentro de las condiciones para su cultivo y desarrollo, se han encontrado evidencias que el Ecuador es hogar de cuatro, de las cinco subfamilias de *Cattleya* de todo el mundo (Shim et al., 2018). Las orquídeas tienen gran importancia ornamental por la belleza de sus flores; así, *Cattleya* es un género de alta comercialización y agrupa a miles de híbridos que presentan flores grandes y de colores vivos muy atractivos (Rodríguez et al., 2015).

Las orquídeas dependen de hongos micorrízicos para germinar y muchas de las características únicas que las distinguen están asociadas con el hongo que las coloniza (Chavez et al., 2014); por tanto, las semillas en condiciones naturales necesitan ser colonizadas por hongos, generalmente del género *Rhizoctonia*, entablando una relación

simbiótica denominada simbiosis micorrízica, estableciéndose así un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos que contribuyen a la germinación, quedando rodeada la semilla de una densa red de hifas fúngicas (Cumbe, 2018).

El bajo porcentaje de germinación de semillas de orquídeas en estado silvestre, se debe a la poca reserva de nutrientes en el embrión, lo cual es un factor limitante para su propagación; por tanto, es necesario establecer asociaciones simbióticas, para lograr su germinación en condiciones naturales. Lewis Knudson en 1922, desarrolló un método para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas, que fue el primer procedimiento práctico para la propagación *in vitro* de cualquier planta en condiciones asépticas, demostrando así, que era posible la germinación asimbiótica sobre un medio de cultivo simple que contuviera minerales y azúcares (Salazar, 2012).

Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro*; sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar; por lo que, hay que determinar cuál es el medio de cultivo de germinación adecuado para cada una de ellas (Ruíz et al., 2008).

Por los antecedentes antes señalados, la presente investigación titulada: “Influencia de la sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas e inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl”, tuvo como finalidad generar información científica, sobre la importancia de la sacarosa en diferentes concentraciones en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1922), en la germinación de las semillas, considerando que está constituye la fuente de energía y carbono para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas; además, establecer la metodología más apropiada para la generación de estructuras callogénicas, a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas que permita la multiplicación potencial de la especie, aprovechando la totipotencialidad de las células callogénicas, utilizando para ello diferentes concentraciones en el balance hormonal auxina-citoquinina, como una alternativa para la propagación de la especie, debido a la creciente pérdida de la misma, razón por la cual la presente investigación es de gran importancia, ya que contribuyó a incrementar un mayor número de plántulas por unidad de superficie, en un corto periodo de tiempo.

Los objetivos que orientaron la presente investigación fueron:

Objetivo General:

Contribuir a la generación de información científica relacionada con la germinación *in vitro* de semillas y la inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl.

Objetivos Específicos:

Evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl, en el medio de cultivo Knudson C (KC), probando tres concentraciones de sacarosa.

Determinar el efecto de la combinación hormonal auxina– citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl.

Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación

4. Marco Teórico

4.1. Generalidades de la familia Orchidaceae

Las orquídeas son apreciadas en todo el mundo por ser las plantas ornamentales con mayor diversidad de formas y por tener flores, también, de formas muy vistosas y colores llamativos desde un rojo intenso hasta el negro, y otras con múltiples tonos en la misma flor o inflorescencia. Orchidaceae es una de las familias más diversas en el mundo con cerca de 30 000 especies (MINAM, 2017). Todas las especies de orquídeas se encuentran incluidas en los Apéndices de CITES, constituyendo uno de los grupos de plantas ornamentales más comercializados en todo el mundo; cabe decir que este comercio de especímenes de orquídeas está permitido, siempre y cuando procedan de la reproducción artificial (MINAM, 2017).

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial, las orquídeas se distribuyen en todos los continentes (excepto la Antártida) pero su mayor diversidad se concentra en las regiones tropicales (Garcia, 2017).

4.2. Descripción de género *Cattleya*

El nombre del género *Cattleya* se dio en honor al botánico y horticultor inglés William Cattley, el cual en 1818 recibió musgos y líquenes provenientes de Brasil que venían envueltos en hojas de lo que hoy se conoce como *Cattleya labiata*. El señor Cattley cultivó las hojas hasta obtener floración, siendo la primera *Cattleya* en descubrirse (Costa et al., 2000).

4.2.1 Descripción de *Cattleya maxima* Lindl



Orquídea epífita que se caracteriza por presentar los pseudobulbos cilíndricos con 2 a 3 nudos de unos 25 cm de largo (Figura 1). Su inflorescencia tiene su origen desde el ápice de los pseudobulbos, presenta de 5 a 13 flores y estas son bastante grandes pudiendo llegar a medir hasta 15 cm de longitud, de color rosado-lila con nervaduras de color más claro en la porción inferior del labelo (MINAM, 2017).

Figura 1: *Cattleya maxima* Lindl.

4.2.2 Descripción taxonómica

Clase:	Equisetopsida C. Agarch
Sub. clase:	Magnoliidae Novák ex Takht
Super orden:	Lilianaes Takht.
Orden:	Asparagales
Familia:	Orchidaceae Juss
Género:	<i>Cattleya</i>
Especie:	<i>maxima</i>
Nombre común:	Catleya, Amancay, Magdalena

4.2.3 Distribución de *Cattleya maxima* Lindl

Existen dos variedades de *C. maxima*; localizadas en Ecuador y Perú. La variedad ecuatoriana es robusta y producen más flores que aquellas que se desarrollan en Perú. Aunque la forma peruana (que se extiende en Ecuador, Colombia y Venezuela) que tiene menos flores, es superior en forma y color. Ambas formas poseen un atractivo labelo encrespado con una vena color rojo cereza, lo cual es distintivo de *C. maxima* y adaptable en la mayoría de las condiciones de crecimiento siempre que posea un buen drenaje y no salga del rango de temperatura de 10 °C a 29 °C. Necesita bastante luz en la época cercana a la floración (Costa et al., 2000).

4.2.4 Uso de *Cattleya maxima* Lind.

Las flores comestibles atribuyen mejorías en la parte estética en los alimentos, estas brindan tonalidades de frescura y sabor poco inusual, sus colores y olores logran ser un gran atractivo estimulando así los sentidos, cabe indicar que de los componentes presentes en las flores es el agua conteniendo más del 80 % de su totalidad, por ello es bajo en caloría y su uso principal es aportar apariencia y sabor agradable en los alimentos (Shim et al., 2018).

4.3 Métodos de propagación *in vivo* de la especie

La propagación vegetativa o clonación se define como la reproducción de una planta a partir de una célula un tejido, un órgano (raíces, tallos, ramas, hojas). En teoría, cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de iguales características según sean las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, nutrientes. sanidad) (Escobar et al., 2004).

4.3.1 Propagación sexual

La reproducción sexual es el proceso de crear un nuevo organismo descendiente a partir de la combinación de material genético de dos organismos con material genético similar, comenzando con un proceso que se denomina meiosis, que es un tipo especializado de división celular; el cual se produce en organismos eucariotas en donde interviene el proceso biológico de la reproducción, la cual necesita de la existencia de sexos (masculino y femenino), que a través del proceso de polinización-fecundación se da la formación de la semilla, la cual dará origen a una nueva planta, es decir, que la propagación se hace por medio de semillas (Naranjo, 2019).

La semilla es la unidad de dispersión y supervivencia de una especie vegetal, sea esta silvestre o cultivada, que lleva en sí el germoplasma. La propagación por semillas es uno de los métodos de reproducción de plantas más usados en la naturaleza y además de los más eficientes, pues se encarga de mantener las características genéticas que les confieren a las plantas la resistencia necesaria para su supervivencia (Ambrona, 2015).

4.3.2 Multiplicación asexual

La multiplicación asexual también llamada reproducción vegetativa, se da por simple fragmentación de la planta madre, en donde las plantas hijas son idénticas a la madre, al no existir intercambio de material genético (Pérez, 2007).

Muchas plantas tienen la capacidad de reproducirse asexualmente, ya sea por regeneración de órganos vegetativos como raíces y tallos o por semillas apomícticas. Estas son semillas con embriones donde el origen es totalmente materno y provienen de tejido diploide que rodea el saco embrionario. La multiplicación asexual interviene o bien la reproducción vegetativa cuando esta ocurre de forma natural y espontánea; o bien, la reproducción vegetativa artificial o asistida por el hombre que permite con técnicas como el estaquillado, el acodo, el injerto y la micro propagación obtener nuevas plantas (Ambrona, 2015).

4.4 Características de la micropropagación *in vitro*

La micropropagación es un método de propagación vegetativa, que permite la producción a gran escala de plantas madres libres de agentes patógenos, incluyendo virus; este método está siendo aplicado principalmente en cultivos de plátano, banano, cítricos, piña, plantas ornamentales y algunas especies perennes o forestales de interés comercial como el eucalipto, palma de aceite, caucho, entre otras (Escobar et al., 2004). El término

micropropagación fue utilizado por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester en su conocido libro sobre propagación de plantas, parece haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación.

4.4.1 Ventajas del cultivo *in vitro*

- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos.
- Facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo.
- Permite la ampliación de la base genética de una especie.
- Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año.
- El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) o sanitarios.
- Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.
- Permite someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales) (Aquino, 1998).

4.4.2 Desventajas del cultivo *in vitro*

- Los equipos, materiales, insumos y reactivos empleados en la preparación de los medios de cultivos son costosos y poco disponibles en nuestro medio.
- Requiere de la implementación de una infraestructura y equipos costosos, como la cámara de flujo laminar.
- No es posible instalar laboratorios *in vitro* donde no se cuenta con fluido eléctrico o se presentan interrupciones periódicas.
- Escasa literatura relacionada al cultivo *in vitro* de especies forestales.
- Se requiere de personal de laboratorio especializado: biólogos, químicos fisiólogos, fitomejoradores, agrónomos y forestales (Aquino, 1998).

4.4.3 Fases de la micropropagación

Según Castillo (2014) dentro del proceso de micropropagación se diferencian cinco fases:

- Fase 0: Selección y Preparación de la planta madre
- Fase 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- Fase 2: Introducción del material seleccionado *in vitro*
- Fase 3: Multiplicación de brotes
- Fase 4: Enraizamiento
- Fase 5: Aclimatación

4.4.3.1 Fase 0: Selección y preparación de la planta madre

Para establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2014)

4.4.3.2 Fase 1: Desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Estos pueden ser yemas, segmentos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraerlos es necesario la desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabaja en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos se introducen en un tubo de ensayo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluida durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada (Castillo, 2014).

4.4.3.3 Fase 2: Implantación del material *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o

quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2014).

4.4.3.4 Fase 3: Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo, por tanto permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2014).

4.4.3.5 Fase 4: Enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente segmentos individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2014).

4.4.3.6 Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que éstos han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la

planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Castillo, 2014).

4.5 Medio de cultivo

El medio de cultivo es un elemento de la técnica de cultivo *in vitro* que funciona a la vez como sustrato y fuente energética para el desarrollo de los tejidos. Es una combinación de diferentes componentes, los cuales varían proporcionalmente de acuerdo con las características del tejido a desarrollar (callo, porciones de hoja, células, porciones de tallo, etc.) y el proceso morfogénico que se desea seguir (cultivo de meristemas, organogénesis, embriogénesis somática) (Suárez, 2020).

4.5.1 Composición química del medio de cultivo Knudson-C (KC-1922)

La investigación desarrollada por Knudson-C (KC -1922) demostró que las semillas de *Cattleya maxima* Lind. y de otras especies de orquídeas tienen la capacidad de germinar asimbióticamente *in vitro* (Salazar., 2012), en base a la implementación de medio de cultivo bajo en sales (Universitat de Lleida., 1946) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Knudson-C (KC -1922).

Nutrientes	Componentes	Concentración (mg L⁻¹)
Macronutrientes		
NH₄NO₃	Nitrato de amonio	1.65
KNO₃	Nitrato de potasio	1.9
MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnesio	0.37
CaCl₂.aq	Cloruro de calcio	0.33
KH₂PO₄	Fosfato dipotásico	0.17
Micronutrientes		
KI	Yoduro de potasio	0.83
H₃BO₃	Ácido trixobórico	6.2
MnSO₄.4H₂O	Sulfato de magnesio	22.3
ZnSO₄.7H₂O	Sulfato de zinc	8.6
Na₂MoO₄.2H₂O	Molibdato de sodio	0.25
CuSO₄.5H₂O	Sulfato de cobre	0.025
CoCl₂.6H₂O	Cloruro de cobalto	0.025
Na₂.EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	37.3
FeSO₄.7H₂O	Sulfato de hierro	27.8
AGUA DE COCO	Agua de coco	200

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

Es el medio más conocido en laboratorio de cultivo de tejidos; se elaboró tomando el cultivo *in vitro* de tabaco como modelo y siguiendo un procedimiento cuantitativo se determinaron las concentraciones más adecuadas de todos los nutrientes. Es apto para la mayoría de las especies, por lo que es de amplia utilización, excepto para las más sensibles a la salinidad ya que se caracteriza por tener una elevada concentración salina (Selecció et al., 2006). Las sales minerales que componen Murashige y Skoog (MS-1962) se dividen en macro y micro nutrientes (Tabla 2).

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

Solución Madre	Componentes	Concentración (mg L⁻¹)
Nitratos	Nitrato de amonio	1 560,00
	Nitrato de potasio	1900,00
Sulfatos	Sulfato de magnésio	370,00
	Sulfato de magnésio	16,90
	Sulfato de zinc	8,60
	Sulfato cúprico	0,03
Haloides	Cloruro de potasio	440,00
	Yoduro de potasio	0,83
P, B, Mo	Fosfato de potasio	170,00

		Ácido bórico	6,20
		Molibdato de sodio	0,25
Na,	Fe,	Sulfato ferroso	27,80
EDTA		Ácido Etildiaminotetraacético	37,30

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 cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos a nivel celular en los organismos vegetales Universidad Nacional de La Plata (2019) (Tabla 3).

Tabla 3: Reguladores de crecimiento.

Clase de reguladores	Abreviatura	Nombre químico
AUXINAS	AIA	Ácido 3-indolacético
	ANA	Ácido Naftalenoacético
	AIB	Ácido Indolbutírico
	ApCFA	Ácido (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
	Picloran	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico
	ANON	Ácido naftoxiacético
CITOQUININAS	Kinetina (KIN)	6-furfurilaminopurina
	BAP	6-benzilaminopurina.
	(BA)	6-benziladenina
	2Ip	Isopentiladenina
	Zeatina (ZEA)	N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina
	PBA	(6-benzilamino)-9-2-tetrahidropiranyl-9H-purina
	Tidiazurón (TDZ)	1-fenil-3(1,2,3-tidiazol-5il)urea
GIBERELINAS	Ac. Giberélico (GA3)	2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metilen-gib-3-ene1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona
INHIBIDORES	ABA	Ácido abscísico
ETILENO	Etileno	C ₂ H ₄
	Ethephon, Ethrel	Ácido 2-cloroetilfosfónico

Fuente: Universidad Nacional de La Plata (2019).

4.6.1 Auxinas

Las auxinas son hormonas que participan durante todo el ciclo de vida de las plantas y son particularmente interesantes ya que se distribuyen diferencialmente dentro de los tejidos lo que da lugar a diferentes procesos morfogénicos (Elmawati, 2014).

Las auxinas son el grupo principal de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal, estos compuestos orgánicos son de bajo peso molecular y actúan a muy bajas concentraciones en sitios distantes de donde son sintetizados; además, las auxinas más utilizadas en cultivo *in vitro* son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido Naftalenoacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). Él IBA y ANA son usados frecuentemente para enraizamiento (Montañez, 2017).

Las altas concentraciones de 2,4-D (2.0 a 3.0 mg L⁻¹) favorecen la inducción de callos embriogénicos con una alta capacidad de formación de embriones somáticos (Mejía, 2021).

4.6.2 Citoquininas o citocininas

La citoquinina regula una serie de procesos de la planta, incluyendo la división celular, el crecimiento de los brotes y raíces, el rendimiento de grano y la funcionalidad. Las citoquininas forman un numeroso grupo de fitohormonas, en el que son reconocidas más de 30 entre formas activas e inactiva (Julio y Aleixo, 2008).

Las funciones destacables de las citoquininas son la estimulación de la división celular, la inhibición de desarrollo de raíces laterales, el rompimiento de la latencia de yemas axilares, retrasan la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales y promueven la organogénesis en los callos celulares (National y Pillars, 1993).

Las citoquininas más utilizadas se encuentran la bencil amino purina (BAP), 2 isopentil adenina (2IP), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,01- 3 mg L⁻¹, según el tipo de desarrollo que se desee inducir (Chamorro et al., 2007).

4.6.3 Giberelinas

Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. La hormona no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como el observado para la auxina, aunque en algunas especies existe un movimiento basipétalo en el tallo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis).

Además, de ser encontradas en el floema, las giberelinas también han sido aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento más generalmente bidireccional de la molécula en la planta (Gonzalez, 1999).

La aplicación de fitohormonas reguladoras del crecimiento como las giberelinas se ha constituido en un tratamiento químico eficaz con el fin de incrementar los porcentajes de germinación de semillas. La giberelinas están involucradas en muchos procesos metabólicos durante distintas etapas del desarrollo vegetal, tales como la germinación de semillas, el crecimiento del tallo, la inducción floral, el desarrollo de polen y el crecimiento del fruto, existen muchos tipos de giberelinas, pero la más usada comercialmente es el ácido giberélico (GA_3) que es aplicado exógenamente (Bohorquez et al., 2011).

4.6.4 Etileno

El etileno, siendo un hidrocarburo, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se ha sabido desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta el año de 1960 que se empezó a aceptar como una hormona vegetal. Se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de las plantas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud, dormancia, floración y otras respuestas. El etileno parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la cantidad de producción varía con el órgano y tejido específicos de la planta; además, de su estado de crecimiento y desarrollo (Gonzalez, 1999).

El etileno como tal es utilizado dentro de la propagación *in vitro* debido a su gran potencial como estimulante a la maduración de productos vegetales debido a que provocan la expresión de genes que decodifican las enzimas relacionadas con los cambios durante la maduración; además, de presentar un control de la maduración y senescencia de frutos, hortalizas y flores (Balaguera et al., 2015).

4.7 Vitaminas

La vitamina que se encuentra consistentemente con mayor frecuencia en la elaboración de medios de cultivo es la tiamina, conocida también como la vitamina B1, ayuda a convertir los alimentos que consume en energía que necesita. La tiamina es importante para el crecimiento, desarrollo y funcionamiento de las células del organismo (Health, 2016).

El mío inositol es una hexosa cíclica hidroxilada, que se incorpora al medio MS y a la mayoría de los medios de cultivo usados en la actualidad. Su presencia es necesaria en todas las células para lograr la ciclación de la glucosa. Debido a que la biosíntesis no siempre se verifica *in vitro*, se hace imprescindible su incorporación a los medios. Posee efecto

estimulador para el crecimiento de callos y en la organogénesis directa de algunas especies. Se usa en concentraciones de 100 mg L⁻¹. Actualmente se sabe que el mio-inositol se incorpora a las moléculas de fosfolípidos de la membrana plasmática. Otra función estaría asociada a la conjugación de auxinas, formando un complejo auxina-inositol, que es inactivo como regulador de crecimiento (Universidad Nacional de La Plata, 2019).

4.8 Factores que intervienen en el cultivo de tejidos vegetales

4.8.1 El inóculo o explante

Se puede decir que cuando un inóculo con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables (balance hormonal apropiado) regenera un nuevo individuo, generalmente se considera que son los tejidos de las plantas intactas y sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la esterilización superficial (Roca, 2000).

4.8.2 Factores físicos

4.8.2.1 Temperatura

La temperatura juega un papel importante ya que produce una reducción en la actividad metabólica y, en consecuencia, en el crecimiento de los explantes, al disminuir la temperatura de cultivo (esta temperatura depende de los requerimientos de cada especie). Generalmente se utilizan temperaturas alrededor de los 4 °C para cultivos de clima templado y entre 10 y 15 °C para el germoplasma tropical (Jim, 2010).

4.8.2.2 Humedad relativa

Para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos es necesario un nivel de humedad adecuada, ya sea en el medio de cultivo como en la atmosfera, dicha temperatura mínima desde 35-37 grados centígrados (Hylary, 2014).

Las plantas cultivadas *in vitro* crecen en condiciones especiales, como una humedad relativa extremadamente alta, bajas concentraciones de CO₂, baja intensidad de luz o un medio de cultivo con altas concentraciones de nutrientes y azúcares (Jiménez et al., 2014).

4.8.2.3 Luz

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar (Hylary, 2014). La luz influye en la germinación de los embriones a

través del fitocromo. Los embriones absorben la luz de la zona activa del infrarrojo que interacciona con los mecanismos endógenos, y se desencadenan numerosos cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que inducen la germinación (Pérez, 2007)

4.8.2.4 pH

La acidez o alcalinidad de un medio de cultivo se expresa por su pH. Para la mayoría de ensayos el pH óptimo de está entre 6,5 y 7,5 aun cuando algunas pocas especies pueden crecer en los extremos del rango de pH. Las levaduras y los mohos pueden crecer a valores de pH más bajos (Saravia, 2008).

Es necesario ajustar el pH de la solución con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y considerando que el pH también incide en la capacidad de absorción de sales minerales (Universidad Nacional de La Plata, 2019).

4.9 Germinación *in vitro* de semillas de orquídea

La germinación artificial de semillas de orquídeas terrestres de zonas templadas es extremadamente difícil y requiere formulaciones de nutrientes muy específicas en medios asépticos de germinación (Ospina y Bayman, 2009).

Knudson (1922) demostró que en ausencia de hongos era posible la germinación de semillas de orquídeas en un medio simple, rico en minerales y azúcares. Este investigador además encontró que las semillas de algunos géneros, entre las que se encuentran *Cattleya* y *Epidendrum*, germinaban en forma asimbiótica en condiciones *in vitro* ; no obstante se estimó que no siempre es posible desarrollar un medio de cultivo en el cual una determinada orquídea pueda germinar y desarrollarse (Chávez et al., 2014). Se estima que una cápsula de *Cattleya* puede contener entre 200 000 y 600 000 semillas, estas sólo son aprovechables naturalmente si hay presencia de sacarosa, suministrada por el hongo (micorriza) en simbiosis (Cadavid y Salazar, 2008).

4.9.1 Callogénesis *in vitro* de *Cattleya maxima* Lindl

El callo se define como una masa amorfa de células indiferenciadas las cuales presentan un crecimiento continuo y acelerado a partir de explantes colocados en un medio de cultivo suplementado con reguladores de crecimiento. La formación de callos utilizando las técnicas *in vitro* , se ha incluido en muchos tejidos vegetales y órganos en los que normalmente no era costumbre observar callos. La callogénesis es uno de los métodos más eficientes para poder reducir masivamente material vegetal *in vitro* . A partir de la inducción a callogénesis y con la ayuda de reguladores de crecimiento se puede obtener la formación

de órganos mediante organogénesis indirecta o de embriogénesis somáticos mediante embriogénesis somática indirecta (Rivero, 2012).

Callogénesis como tal es el proceso por el que se forma un callo, que corresponde a una masa de células indiferenciadas que al seguir un determinado proceso forma la plántula. Se puede definir el callo en cultivo *in vitro* como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido (Gutierrez, 2019).

4.9.2 Cultivo de callos

Los callos son conjuntos de células sin diferenciación, los cuales son utilizados en los procesos *in vitro* para innumerables objetivos, como la transformación genética, la producción de metabolitos secundarios, el cultivo de células en suspensión y embriogénesis somática. Los callos pueden originarse a partir de cualquier parte de la planta con un balance hormonal de auxina/citoquinina moderado, el cultivo de callos puede multiplicarse a través de subcultivos cada 30 a 45 días dependiendo de la especie; generalmente se utiliza el mismo medio de cultivo de formación para la proliferación celular. Los callos pueden ser utilizados posteriormente para diversos estudios en los sistemas *in vitro* (Perea, 2009).

La inducción de callo dentro de la multiplicación vegetal representa un proceso muy importante ya que de este se da desdiferenciación y división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento como también su concentración y combinación (Espinoza, 2020).

En la micropropagación, los explantes cultivados pueden ser diversos. Si lo único que se quiere lograr es un sistema de callos para estudiar algún proceso fisiológico, se puede cultivar cualquier órgano, tejido o célula viva. En este caso lo ideal es cultivar explantes jóvenes, derivados de semillas en germinación, donde se obtienen respuestas rápidas y, en general, hay menores problemas de contaminación con microorganismos (Paniego et al., 2010).

La capacidad genética de muchas orquídeas de formar híbridos interespecíficos e intergenéricos ha resultado en la creación de un sinnúmero de híbridos artificiales, muchos de los cuales adquieren precios elevados en el mercado. El género *Cattleya* es uno de los más utilizados en hibridación. La forma de mantener un híbrido, una vez que ha sido producido, es por vía vegetativa (Costa et al., 2000). La callogénesis se expresa como el porcentaje de explantes que forman callos, los callos pueden ser utilizados para hacer

suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos. Normalmente, esta vía requiere de una elevada concentración de auxinas en la etapa de inducción de callo (Rodríguez et al., 2014).

5. Metodología

5.1 Ubicación del área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal (Z10.Soz.MD.B2.Lab 101), perteneciente a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, de la Universidad Nacional de Loja, ubicado entre las coordenadas geográficas: 04° 00' 00" S y 79° 12' 00" O (Figura 2).

La investigación se desarrolló en dos fases: Una fase de campo y una de laboratorio.



Figura 2. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

5.1.2 Fase de campo

La recolección del material vegetal se realizó en la colección de germoplasma de orquídeas ubicado en la parroquia Malacatos, donde se obtuvo cápsulas fisiológicamente maduras (sin abrirse) de *Cattleya maxima* Lindl, las cuales se trasladaron al Laboratorio de Micropropagación Vegetal, en una cámara húmeda, con el fin de evitar la deshidratación.

5.1.3 Fase de laboratorio

En el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, se realizó el proceso de desinfección y extracción de las semillas de *Cattleya maxima* Lindl., de las cápsulas recolectadas en el campo; posteriormente, en la cámara de flujo laminar se realizó la extracción e inoculación *in vitro* de las semillas, bajo condiciones de total asepsia.

5.2 Metodología para evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1922), probando tres concentraciones de sacarosa.

5.2.1. Selección y desinfección de las cápsulas

Las cápsulas de *Cattleya maxima* Lindl., previo a ser ingresadas en la cámara de flujo laminar, fueron lavadas externamente con una solución de detergente y agua corriente, para retirar impurezas se colocaron en vasos de precipitación y fueron llevadas a la cámara, en donde se realizó la desinfección de las cápsulas con alcohol del 70 % por un minuto y luego se realizó un enjuague con agua destilada estéril, a continuación se adicionó una solución de hipoclorito de sodio al 20 % más tres gotas de Tween 80, durante 10 minutos; posteriormente, se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril, para eliminar el exceso de solución desinfectante. Finalmente terminado el proceso de desinfección, las cápsulas quedaron listas para la extracción de semillas e inoculación *in vitro* en condiciones asépticas.

5.2.2 Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo de Knudson-C (KC-1922) suplementado con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 0,5 mg L⁻¹ de tiamina (Vitamina B1) + 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina + 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico + 200 mg L⁻¹ de agua de coco + 2,0 g L⁻¹ de carbón activado y 5,8 g L⁻¹ de agar. Posteriormente, se ajustó el pH del medio de cultivo a $5,8 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico y se distribuyó en frascos de vidrio tipo compota, a razón de 30 ml por frasco y se procedió a esterilizar en el autoclave, a una temperatura de 120 °C, presión de 1,5 kg/cm², por un tiempo 15 minutos (Figura 3).



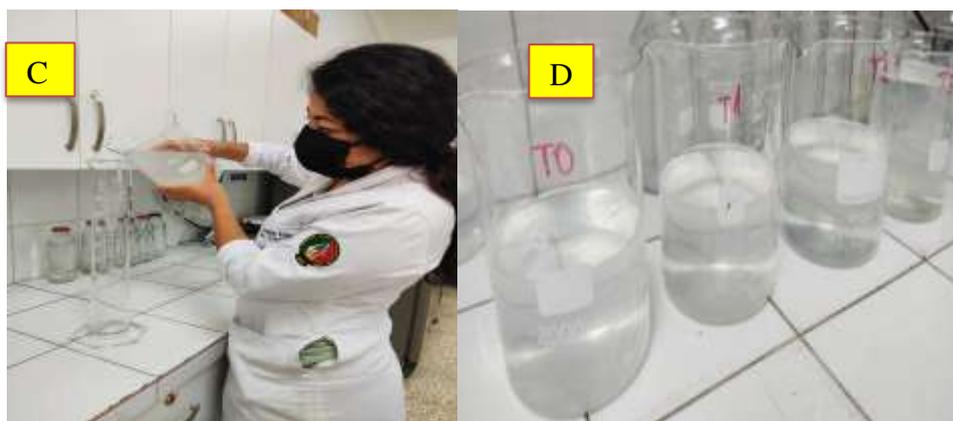


Figura 3. A) Pesaje de vitaminas y hormonas utilizadas. B) Disolución de vitaminas y hormonas C) Distribución y medición del medio de cultivo para cada tratamiento D) Tratamientos distribuidos con distintos niveles de sacarosa.

Para evaluar el efecto de la sacarosa en la germinación *in vitro* de las semillas, se aplicaron los siguientes tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Descripción de los niveles de sacarosa aplicados en cada tratamiento.

No.	Tratamientos	Concentración de sacarosa (g L ⁻¹)
1	T0	0
2	T1	20
3	T2	30
4	T3	40

5.2.3 Inoculación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl.

En la cámara de flujo laminar y con la ayuda del bisturí y pinzas y cerca del mechero bunsen, se abrieron las valvas de las cápsulas longitudinalmente, para dejar expuestas a las semillas, las cuales con la ayuda de una espátula fueron inoculadas de forma superficial sobre el medio de cultivo, distribuyéndolas homogéneamente, en los frascos de vidrio con 30 ml del medio de cultivo Knudson-C (KC-1922), con distintos niveles de sacarosa, según cada tratamiento y finalmente se identificaron (Figura 4).

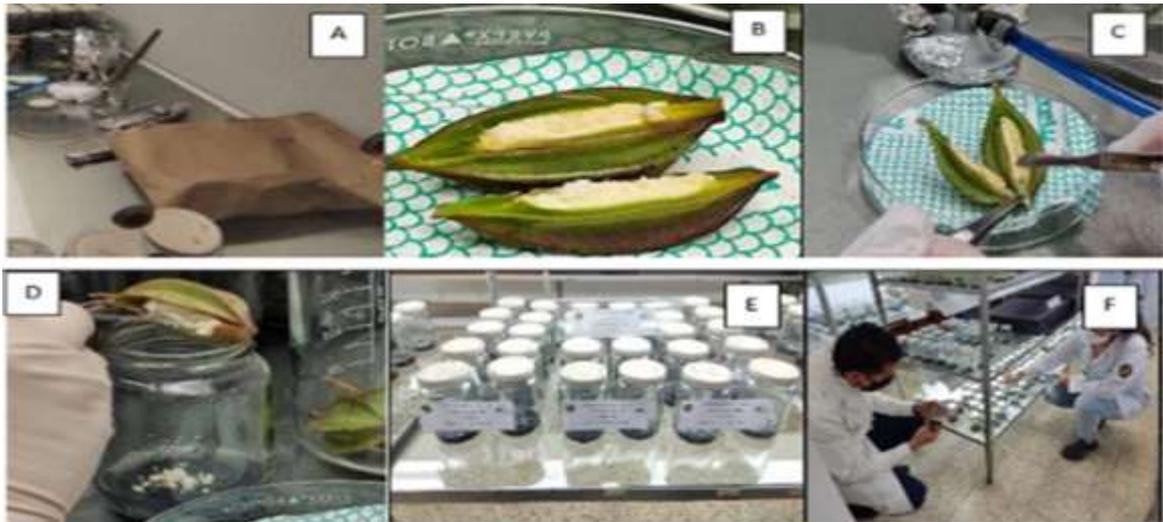


Figura 4. Inoculación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el Medio de Cultivo Knudson-C (KC-1922); A) Materiales utilizados para inoculación, B) Cápsulas fisiológicamente maduras, C) Apertura de cápsulas, D) Inoculación de semillas E) Identificación de frascos, F) Incubación de las semillas.

5.2.4 Incubación *in vitro* de las semillas de *Cattleya maxima* Lindl

Los frascos con medio de cultivo y semillas fueron ubicados en el cuarto de luces o cuarto de incubación *in vitro* , bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 2 °C), intensidad lumínica, por medio de lámparas fluorescentes blancas (3 000 a 5 000 lux) y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, para inducir la germinación y el crecimiento.

5.2.5 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo en el cuarto de incubación del laboratorio

Los tratamientos y repeticiones ensayados en la evaluación de la germinación *in vitro* de *Cattleya maxima* Lindl., con tres niveles de sacarosa, fueron distribuidos en el cuarto de incubación, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el laboratorio, para evaluar los distintos niveles de sacarosa aplicados.

	T0S0			T1S2		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	
	T2S3			T3S4		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	

T0S0= Tratamiento y concentración de sacarosa; R1=Número de repetición

5.2.6 Diseño experimental

Para evaluar el efecto de las tres concentraciones de sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con 4 tratamientos y tres repeticiones (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos para evaluar el efecto de tres concentraciones de sacarosa, en la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl.

No.	Tratamientos	Concentración de sacarosa(g L ⁻¹)	Codificación
1	T0	00,0	T0S0
2	T1	20,0	T1S1
3	T2	30,0	T2S2
4	T3	40,0	T3S3

5.2.6.1 Especificaciones del diseño experimental

Unidad Experimental (un frasco):	1
Número de tratamientos:	4
Número de repeticiones:	3
Número de frascos por tratamiento:	30
Número de frascos del ensayo:	90
Número total de frascos:	360

Tabla 7. Descripción del factor y niveles, para evaluar el efecto de tres concentraciones de sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl.

Factor	Nivel de sacarosa(g L ⁻¹)
A. Concentración de sacarosa (S).	0,00
	20,0
	30,0
	40,0

5.2.6.2 Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- Número de frascos contaminados
- Porcentaje de contaminación
- Días a la germinación
- Porcentaje de germinación

La germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en las tres concentraciones de sacarosa ensayadas, fueron evaluadas a partir del quinto día posterior a la siembra, en intervalos de 4 días, por un periodo de 90 días.

Para registrar los datos de los parámetros de evaluación de este objetivo, se utilizó la matriz que consta en la Tabla 8.

Tabla 8. Registro para la toma de datos de número de frascos de contaminación, días a la germinación y porcentaje de germinación *in vitro* de *Cattleya maxima* Lindl.

Fecha de siembra:			Tratamiento:											
N° de días	Fecha	N° total de frascos	N° Frasco. Cont.			% de Cont			N° Frasco. Germ			% de Germ.		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3

5.2.6.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el presente objetivo, fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) por medio del software R versión 4.2.0 (R Core Team, 2022); por tanto, para evaluar el efecto de los tratamientos utilizados, se realizó una prueba de significancia a 5 % de probabilidad; además, en el caso que no se obtuvo normalidad y homogeneidad de varianza, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

5.2.6.4 Hipótesis del modelo

H0: Las diferentes concentraciones de sacarosa adicionadas al medio de cultivo Knudson-C (KC-1922), no influyen en el porcentaje de germinación de *Cattleya maxima* Lindl.

H1: Las diferentes concentraciones de sacarosa adicionadas al medio de cultivo Knudson-C (KC-1922), influyen en el porcentaje de germinación de *Cattleya maxima* Lindl.

5.3 Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina–citoquinina, en la inducción de estructuras callogénicas de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de oscuridad y fotoperiodo.

5.3.1 Selección de material vegetal de *Cattleya maxima* Lindl

En la cámara de flujo laminar, se procedió a seleccionar protocormos de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl, de una colección de germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, cabe recalcar que las mismas no fue necesario desinfectarlas, por permanecer en condiciones de asepsia.

5.3.2 Preparación de medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS-1962), suplementado con 100 mg L^{-1} de mio-inositol + $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de tiamina (Vitamina B1) + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de piridoxina + $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido nicotínico + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de glicina + $20,0 \text{ g L}^{-1}$ de sacarosa + $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de carbón activado y $6,0 \text{ g L}^{-1}$ agar; a continuación, se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.8 ± 0.2 , utilizando ácido clorhídrico, el cual fue distribuido en frascos de vidrio tipo compota, a razón de 25 ml. Finalmente, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave, a una temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$, presión de $1,5 \text{ kg/cm}^2$, por un tiempo de 15 minutos.

5.3.3 Inoculación *in vitro* de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en condiciones de oscuridad

En la cámara de flujo laminar, se inocularon dos protocormos en cada frasco de vidrio, los cuales fueron ligeramente introducidos en el medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog (MS-1962) (Figura 5). Finalmente, se identificaron los frascos con sus respectivos tratamientos, de acuerdo a lo que se detalla en la Tabla 9.



Figura 5. Inoculación *in vitro* de explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en el Medio de Cultivo Murashige y Skoog (MS-1962); A) Protocormos B) Disección de explantes, C) Inoculación de explantes.

Tabla 9: Descripción del balance hormonal de auxina- citoquinina, para la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de orquídea de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas.

No.	TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
1	T0	$0,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP
2	T1	$1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP
3	T2	$2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP
4	T3	$3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP

5	T4	0,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP
6	T5	1,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP
7	T6	2,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP
8	T7	3,0 mg L ⁻¹ ANA+0,5 mg L ⁻¹ BAP

5.3.4 Incubación de los explantes en total oscuridad

Una vez realizada la inoculación *in vitro* de los explantes e identificado según el tratamiento y repetición, se procedió a ubicarlos en el cuarto de incubación, donde se mantuvieron incubados a una temperatura de 26 ±2 °C, en condiciones de total oscuridad, para lo cual se utilizó cajas de cartulina de color negro, para generar esta condición, durante un periodo de evaluación 60 días.

5.3.5 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo en el laboratorio, en total oscuridad

En la Tabla 10, se indica la distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación que se utilizó para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas.

Tabla 10. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación en condiciones de oscuridad, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl.

T0			T1A1C0OSC		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T2A2C0OSC			T3A3C0OSC		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T4A4C0OSC			T5A1C1OSC		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T6A2C1OSC			T7A3C1OSC		
R1	R2	R3	R1	R2	R3

T= Tratamiento A=Auxina C=Citoquinina OSC=Oscuridad; R1=Número de repetición.

5.3.6 Diseño experimental para el ensayo en oscuridad

Para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción de estructuras callogénicas, a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., en la oscuridad, se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con un arreglo factorial de 4 x 2, con 8 tratamientos y tres repeticiones (Tabla 11).

Tabla 11. Tratamientos para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas.

No.	TRATAMIENTOS	REGULADOR DE CRECIMIENTO		CODIFICACIÓN
		ANA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	
1	T0	0,0	0,0	T0
2	T1	1,0	0,0	T1A1C0OSC
3	T2	2,0	0,0	T2A2C0OSC
4	T3	3,0	0,0	T3A3C0OSC
5	T4	0,0	0,5	T4A4C0OSC
6	T5	1,0	0,5	T5A1C1OSC
7	T6	2,0	0,5	T6A2C1OSC
8	T7	3,0	0,5	T7A3C1OSC

5.3.6.1 Especificaciones del diseño experimental de oscuridad

Unidad experimental (un frasco con dos explantes):	1
Número de tratamientos:	8
Número de repeticiones:	8
Número de frascos por tratamiento:	3
Número de frascos por repetición:	15
Número de frascos/ensayo:	5
Número de explantes por frasco:	120
Número de explantes por repetición:	2
Número de explantes por tratamiento:	10
Número total de explantes del ensayo:	30
	240

Tabla 12. Descripción de factores y niveles de ANA y BAP utilizados, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.

Factores	Nivel (mg L ⁻¹)
A. Concentración de auxina (ANA).	0,0 (A0)
	1,0 (A1)
	2,0 (A2)

	3,0 (A3)
B. Concentración de citoquinina (BAP).	0,0 (C0)
	0,5 (C1)

5.3.6.2 Incubación de los explantes en condiciones de fotoperiodo

Una vez realizada la inoculación *in vitro* de los explantes, se identificó cada frasco de vidrio, según su tratamiento y repetición y se procedió a ubicarlos en el cuarto de luces o cuarto de incubación, donde se mantuvieron incubados a una temperatura de 26 ± 2 °C, en fotoperiodo con 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, durante un periodo de evaluación de 60 días.

5.3.6.3 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del ensayo en el cuarto de incubación en fotoperiodo.

En la Tabla 13, se indica la distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación en fotoperiodo, que se utilizó para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.

Tabla 13. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación bajo condiciones de fotoperiodo.

T0			T1A1C0FTP		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T2A2C0 FTP			T3A3C0 FTP		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T4A4C0 FTP			T5A1C1 FTP		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T6A2C1 FTP			T7A3C1 FTP		
R1	R2	R3	R1	R2	R3

T= Tratamiento A=Auxina C=Citoquinina FTP=Fotoperiodo; R1=Número de repetición.

5.3.6.4 Diseño experimental para ensayo de fotoperiodo

Para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., en condiciones de fotoperiodo (16/8) se utilizó un diseño

experimental completamente al azar (DCA), con un arreglo factorial de 4 x 2, con 8 tratamientos y tres repeticiones (Tabla 14).

Tabla 14. Tratamientos para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina en fotoperiodo, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.

No.	TRATAMIENTOS	REGULADOR DE CRECIMIENTO		CODIFICACIÓN
		ANA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	
1	T0	0,0	0,0	T0
2	T1	1,0	0,0	T1A1C0FTP
3	T2	2,0	0,0	T2A2C0FTP
4	T3	3,0	0,0	T3A3C0FTP
5	T4	0,0	0,5	T4A4C0FTP
6	T5	1,0	0,5	T5A1C1FTP
7	T6	2,0	0,5	T6A2C1FTP
8	T7	3,0	0,5	T7A3C1FTP

5.3.6.5 Especificaciones del diseño experimental en fotoperiodo

Unidad experimental (un frasco con dos explantes):	1
Número de tratamientos:	8
Número de repeticiones:	3
Número de frascos por tratamiento:	9
Número de frascos por repetición:	3
Número de frascos/ensayo:	72
Número de explantes por frasco:	2
Número de explantes por repetición:	6
Número de explantes por tratamiento:	18
Número total de explantes del ensayo:	144

Tabla 15: Descripción de factores y niveles de ANA y BAP a utilizar, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina en fotoperiodo, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.

Factores	Nivel (mg L ⁻¹)
B. Concentración de auxina (ANA).	0,0 (A0)
	1,0 (A1)
	2,0 (A2)
	3,0 (A3)
C. Concentración de citoquinina (BAP).	0,0 (C0)

5.3.6.6 Variables evaluadas en condiciones de oscuridad y fotoperiodo

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- Número de explantes contaminados
- Número de explantes fenolizados
- Número de explantes muertos
- Número de explantes con callo
- Número de raíces por callo
- Número de brotes con callo
- Color del callo
- Friabilidad del callo

Para evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de la *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas, las observaciones se realizaron a partir del quinto día posterior a la inoculación *in vitro*, cada 4 días, por un periodo de tiempo de 60 días.

Para el registro de datos de número de explantes contaminados, número de explantes muertos y número de explantes fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas en los explantes de orquídea de *Cattleya maxima* Lindl, provenientes de vitroplantas, se utilizó la siguiente matriz (Tabla 16).

Tabla 16. Hoja de registro de datos para evaluar el número de explantes contaminados, número de explantes muertos y número de explantes fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.

Fecha de siembra:												
Tratamiento:												
N° de días	Fecha	N° de frasco	N° total de explantes	N° Exp. Cont.			N° Exp. Muerto			N° de Exp. fenolizados		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3
			1									

Para evaluar cada una de las variables, para la inducción de estructuras callogénicas en los explantes de orquídea de *Cattleya maxima* Lindl., provenientes de vitroplantas, se utilizó la siguiente matriz (Tabla 17).

Tabla 17: Hoja de registro para la toma de datos de las variables, para evaluar la inducción de estructuras callogénicas de la *Cattleya maxima* Lindl., a partir de protocormos obtenidos de vitroplantas.

		Ensayo:					
		Fecha de siembre:	# de explantes				
				
		Variable N°.....					
N° Tratamiento	Repetición	#de frasco	Días			Total	Observaciones
			3	7	1		
n	1	1					
		2					
		3					
		4					
		...					
	2	1					
		2					
		3					
		4					
		...					
	3	1					
		2					
3							
4							
	...						

LEYENDA:		
Tn= Tratamientos; R= Repeticiones; F= Número de frascos/repetición		
EVALUACIÓN DE CALLO		
FORMACIÓN DE CALLO:	COLOR:	FRIABILIDAD :
- =	0 % Sin formación	CR= Crema  C= Carmelita  A= Amarillo  V= Verde 
+=	25 %: pobre (formado en ¼ del explante)	
++=	50 %: regular (formado en ½ del explante)	
+++=	75 %: bueno (formado en ¾ del explante)	
++++=	100 %: muy bueno (formado en todo el explante).	
		F= Friable NF= No Friable

5.3.6.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del ensayo fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, tal el caso de datos normales se realizó pruebas paramétricas por comparación de medias por medio análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey, en caso de datos no normales, se utilizó pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis por medio del software R versión 4.2.0 (R Core Team, 2022).

5.3.6.8 Hipótesis del modelo

H0: El balance hormonal auxina-citoquinina, no influye en la formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl, en explantes obtenidos de vitroplantas.

H1: El balance hormonal auxina-citoquinina, influye en la formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl, en explantes obtenidos de vitroplantas.

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

Los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, fueron socializados al Equipo Técnico de investigación y a los actores interesados, mediante las siguientes actividades:

- Exposición de los resultados obtenidos, ante el Equipo Técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja.

- Tríptico informativo con los resultados obtenidos en el trabajo de investigación.
- Poster informativo
- Manual técnico para la difusión de los resultados obtenidos en la presente investigación
- Elaboración de un artículo científico, con los resultados de la investigación.
- Elaboración y publicación del documento del Trabajo de Integración Curricular.

6. Resultados

6.1 Germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en medio de cultivo Knudson C (KC-1922), probando tres concentraciones de sacarosa

6.1.2 Contaminación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson C (KC-1922)

La evaluación del porcentaje de contaminación de las semillas de *Cattleya maxima* Lindl., se realizó durante un periodo de evaluación de noventa días, en el cual se registró que la contaminación inicio al quinto día de instalado el ensayo y se estabilizo a los setenta y siete días en los cuatro tratamientos. Así, se presentó los menores porcentajes de contaminación en los tratamientos T0 con 0 g L⁻¹ con 6 %, T2 con 30 g L⁻¹ y T3 con 40 g L⁻¹, con 11 % mientras que el tratamiento T1 con 20 g L⁻¹ obtuvo el mayor porcentaje de contaminación con 12 %. El análisis estadístico mostró que el T0 con 0 g L⁻¹ es estadísticamente diferente ($p < 0,05$) a los otros tres tratamientos, en donde la contaminación en los frascos y medio de cultivo fue causada principalmente por bacterias y hongos (Figura 6).

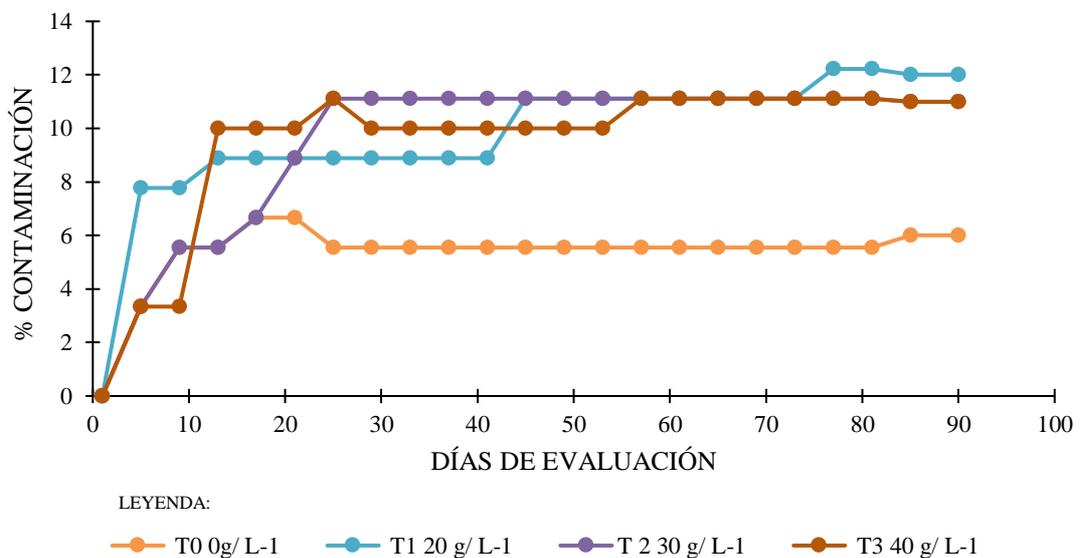


Figura 6. Curva acumulativa del porcentaje de contaminación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., a los 90 días de evaluación.

6.1.3 Germinación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson C (KC-1922), probando tres concentraciones de sacarosa.

La curva acumulativa de germinación de semillas en un periodo de evaluación de 90 días se presenta en la Figura 7, donde el tratamiento testigo T0 con 0 g L⁻¹ registro 91 % y

los tratamientos con distintos niveles de sacarosa, registraron en el T1 con 20 g L⁻¹, un 87 % de germinación, siendo el mayor porcentaje de germinación y T3 con 40 g L⁻¹, evidenció una disminución en el porcentaje de germinación con 74 %. Al aplicar el análisis estadístico y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, se encontró que no existían diferencias significativas entre tratamientos y entre sus medias ($p > 0,05$); sin embargo, todos los tratamientos mostraron altos porcentajes de germinación de las semillas.

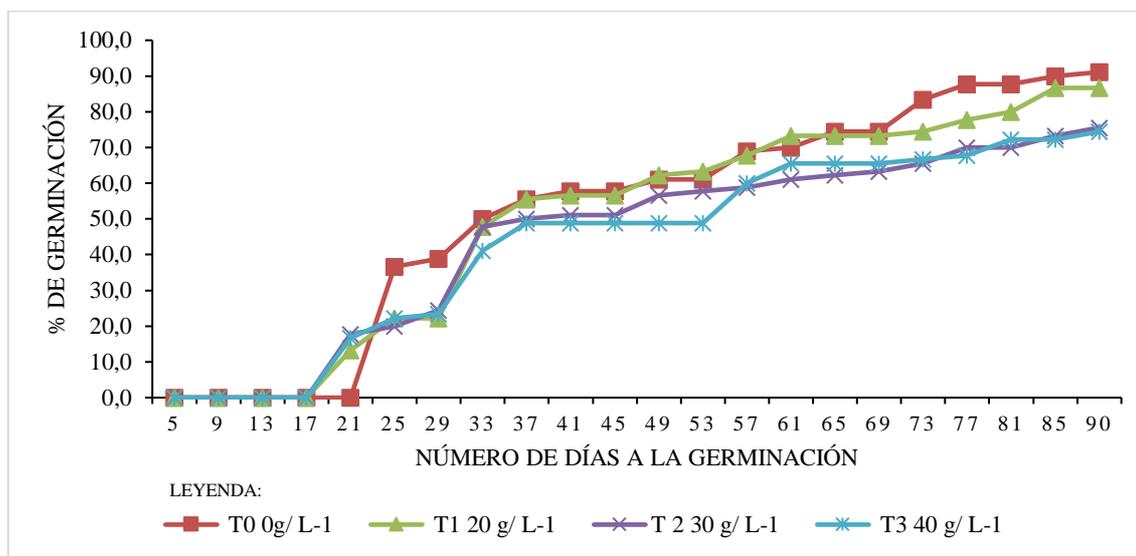


Figura 7. Curva acumulativa del porcentaje de germinación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson C, a los 90 días de evaluación.

6.2 Influencia de la oscuridad en la formación de estructuras calogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl.

6.2.1 Contaminación de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en condiciones de oscuridad.

Como se muestra en la figura 8, la contaminación de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl se expresó a partir del día nueve, registrando en el T0 y T1 con 7 % respectivamente. Así también, el T6 y el T7 presentaron contaminación a partir día 17 y 21 de evaluación, con 20 %; posteriormente, el porcentaje de contaminación se estabilizó al finalizar los 60 días de evaluación. Los tratamientos restantes T2, T4 y T5 mostraron un porcentaje promedio de contaminación de entre 10 y 13 %; sin embargo, el T3 no mostro ningún tipo de contaminación. Mediante la aplicación del análisis de variancia no paramétrico de Kruskal Wallis, registró que no existían diferencias estadísticas entre tratamientos ($p > 0,05$).

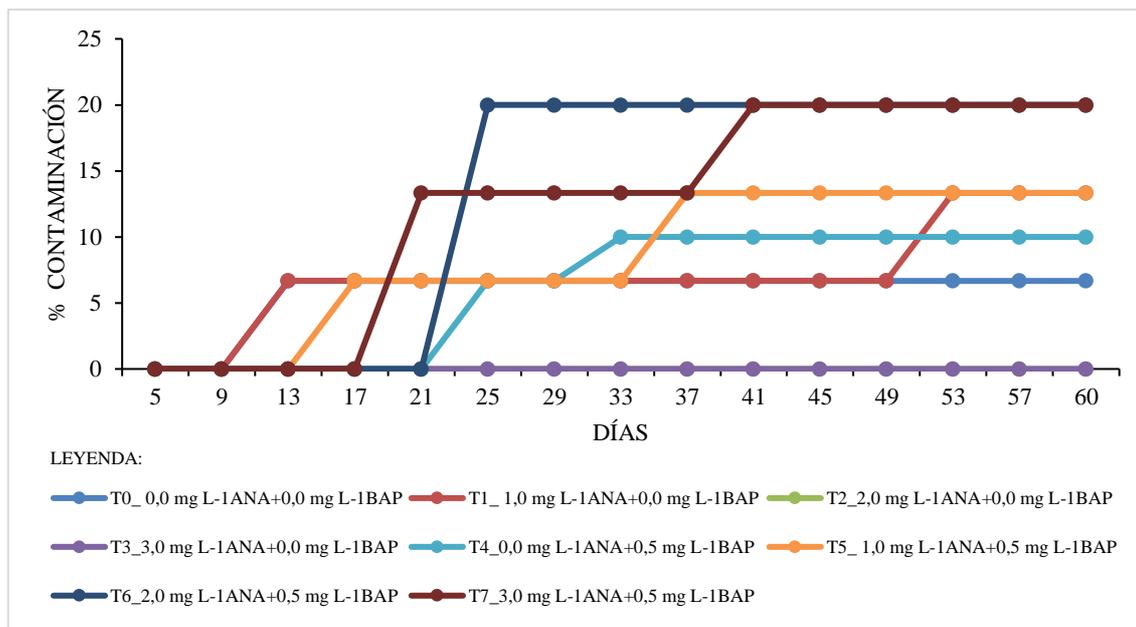


Figura 8. Curva acumulativa de contaminación de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962), a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.2 Oxidación fenólica de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en oscuridad

En la variable de oxidación fenólica se observó que los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP); T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP); T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T7 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP), obtuvieron mayor porcentaje de oxidación fenólica, con 30 % respectivamente. Así también, se registró en el T2 y T3 un porcentaje de oxidación fenólica de 17 y 23 % respectivamente, siendo los tratamientos en los cuales se obtuvieron lo menores porcentajes. Al aplicar el análisis estadístico se determinó que no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0,05$) (Figura 9).

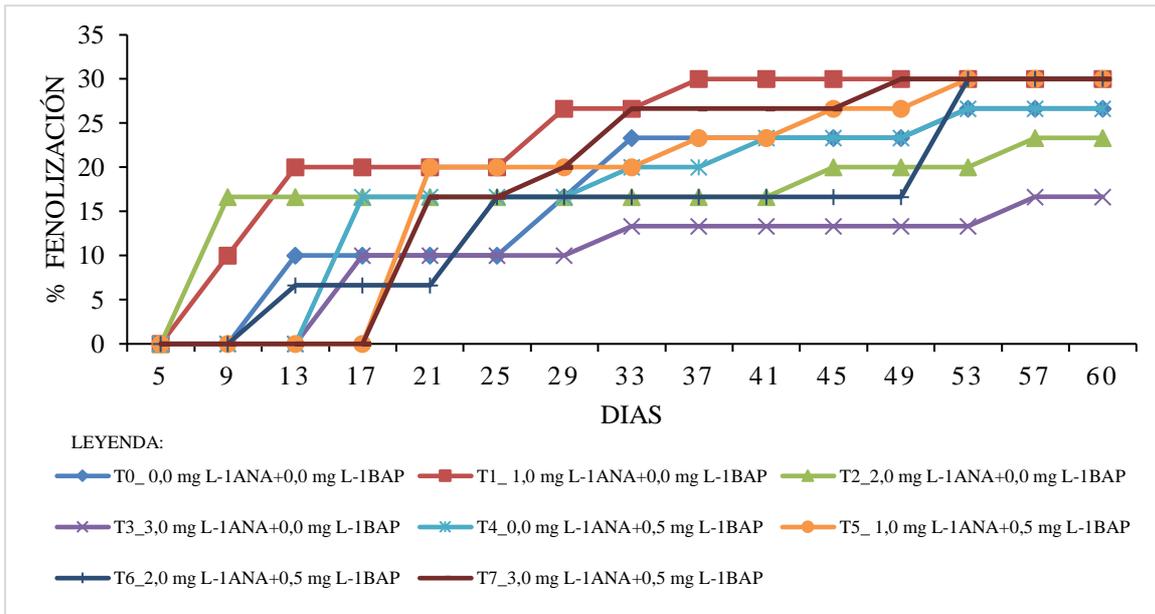


Figura 9. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.3 Mortalidad de los explantes *Cattleya maxima* Lindl., en la oscuridad

En la figura 10 se muestra la variable de mortalidad de los explantes inoculados de *Cattleya maxima* Lindl., en donde los tratamientos T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) y T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) no presentaron mortalidad, a excepción de T1 conformado por 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP, fue el único tratamiento que obtuvo un 7 % de mortalidad. Al aplicar el análisis estadístico se determinó que no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos (p>0,05).

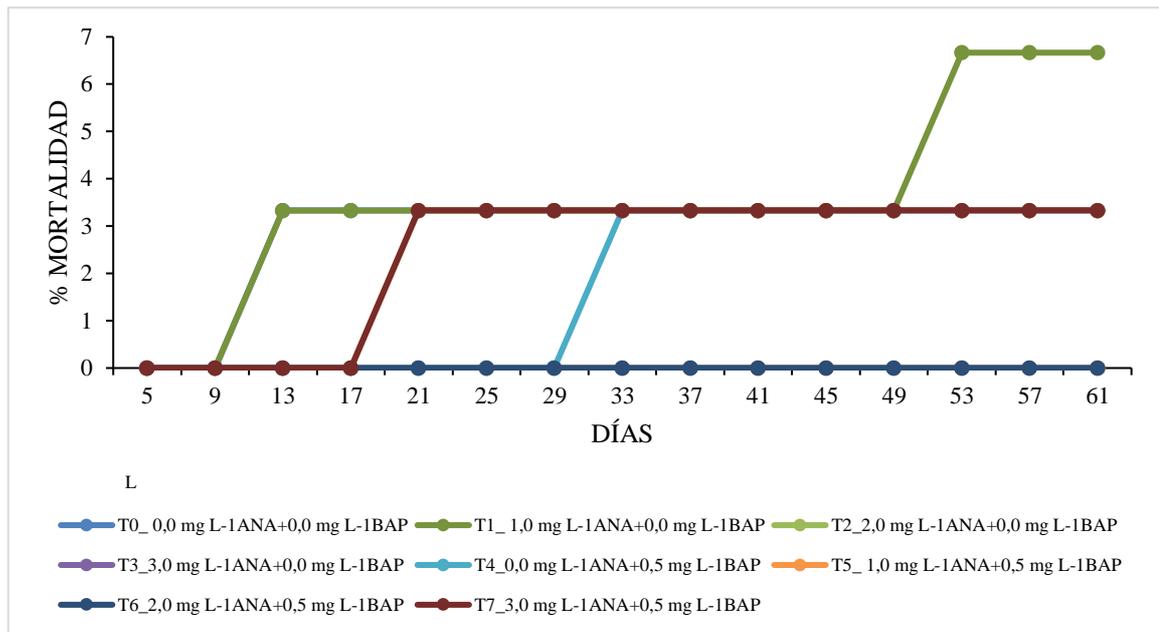


Figura 10. Porcentaje de mortalidad de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.4 Formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en la oscuridad

Como se puede ver en la Figura 11, en la variable de formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., el T5 formado por 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T6 por 2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, presentó la mayor formación de estructuras callogénicas con 16 % y 17 %, respectivamente, mientras que el T0 conformado por 0,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP y el T1 por 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP, presentaron un menor porcentaje, con 8,92 % y 10,04 %, respectivamente; Sin embargo, fueron valores bajos a los esperados. Según el análisis de varianza aplicado se demuestra que no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0,05$). En la figura 12 se puede observar con mayor claridad el aspecto de la formación de estructuras callogénicas a los 60 días de evaluación en condiciones de total oscuridad en cada uno de los tratamientos con distintos niveles de auxinas y citoquininas.

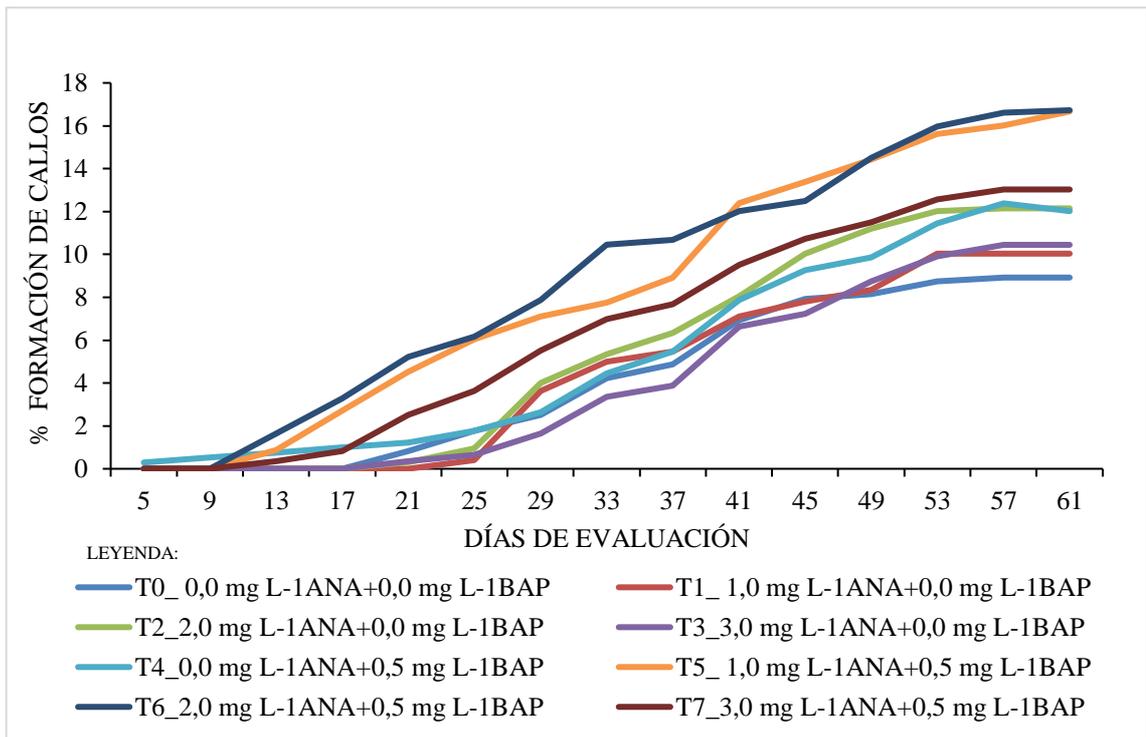


Figura 11. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

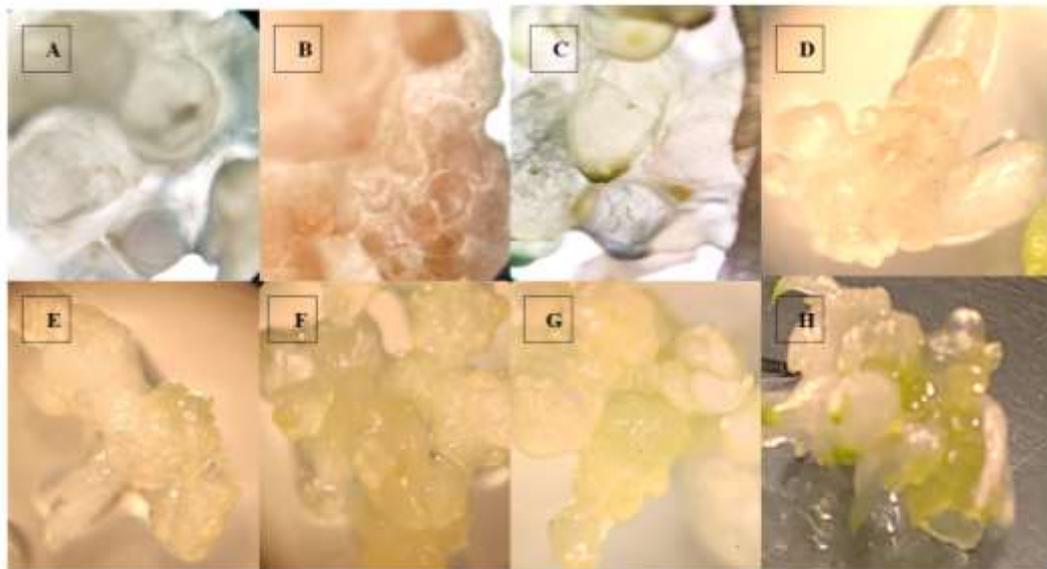


Figura 12. Aspecto de la formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., a los 60 días de valuación en la oscuridad, **A: T0** (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP); **B: T1** (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP); **C: T2** (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP); **D: T3**(3,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP); **E: T4** (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP); **F: T5** (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP); **G: T6** (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP); **H: T7** (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP).

6.2.4.1 Días a la formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en la oscuridad

En la figura 13, se muestran los resultados de la formación de estructuras callogénicas en los explantes inoculados, donde los tratamientos T5 conformado por 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP y T6 por 2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, empezó a registrarse formación de callos a los trece días de evaluación, con un porcentaje de 15% y 28%, respectivamente. Así también, al noveno día de evaluación, en el T4 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) se presentó un valor menor, correspondiente al 9%; Finalmente, el T0 (testigo) formó callo en una mínima cantidad, con el 8%, ya que en el medio en el que se desarrollaron los explantes no contenía ninguna fitohormona. Según el análisis de varianza aplicado se demuestra que no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0,05$).

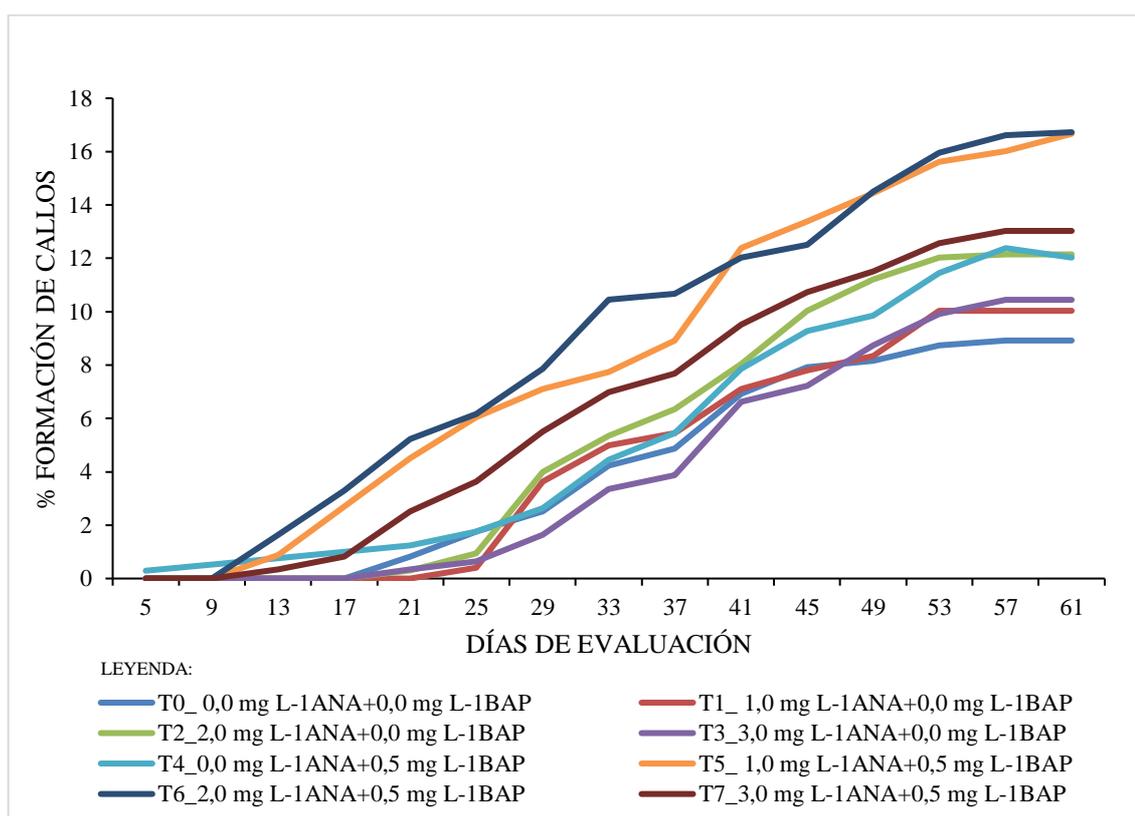


Figura 13: Días a la formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.4.2 Porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas en condiciones de oscuridad

En la figura 14 se presenta el porcentaje de protocormos que formaron callo dentro de cada uno de los tratamientos, en los cuales el T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) registraron un alto porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas, con el 38 % y 40 % respectivamente; por otro lado, los tratamientos T0 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) presentaron bajos porcentajes de protocormos que formaron callo, con un 19 %. Según el análisis de varianza aplicado se demostró que no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0,05$).

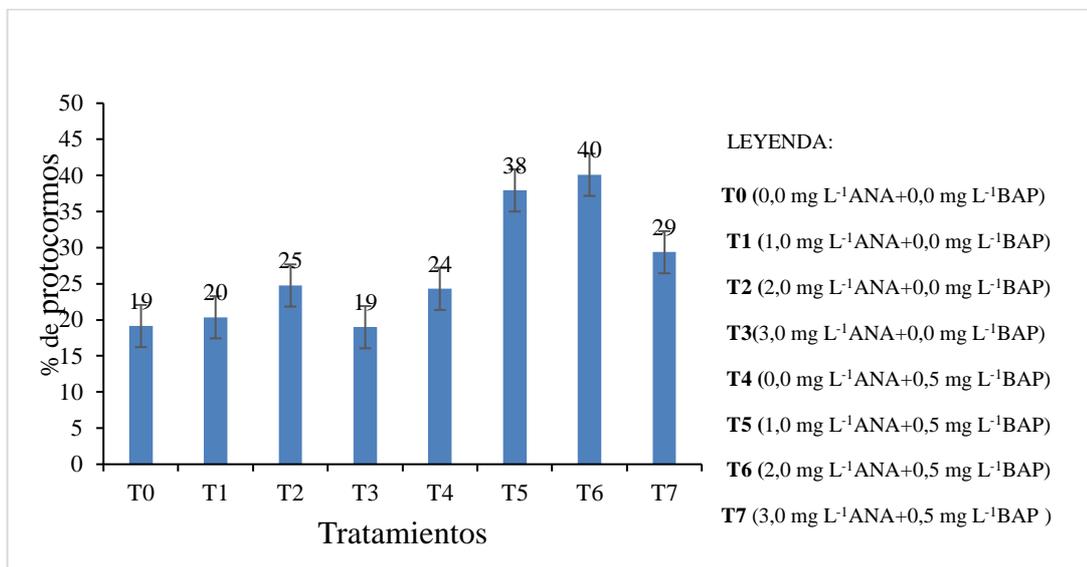


Figura 14: Porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas, a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.4.3 Color de callo en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., en oscuridad a los 60 días de evaluación

En la figura 15 se evidencia la variable coloración del callo en *Cattleya maxima* Lindl., donde se registró diversas tonalidades, variando de verde, crema y carmelita en todos los tratamientos. Así también, se pudo evidenciar que el color predominante fue el verde en el T7, que estuvo conformado por 3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, presentando un 86,67 % y en el T4 formado por 0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, con

63,33 %. Otro color que presentaron los callos fue el color carmelita en el T4, con un porcentaje de 16,67 % y en el T7 con un porcentaje de 6,67 %. Otra tonalidad que se evidencio en la formación de callos fue el color crema, en el T4 con 20 %, siendo el mayor porcentaje obtenido; y, en el T7 con un porcentaje de 6,67 %. Según el análisis de varianza aplicado se demostró que no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0,05$).

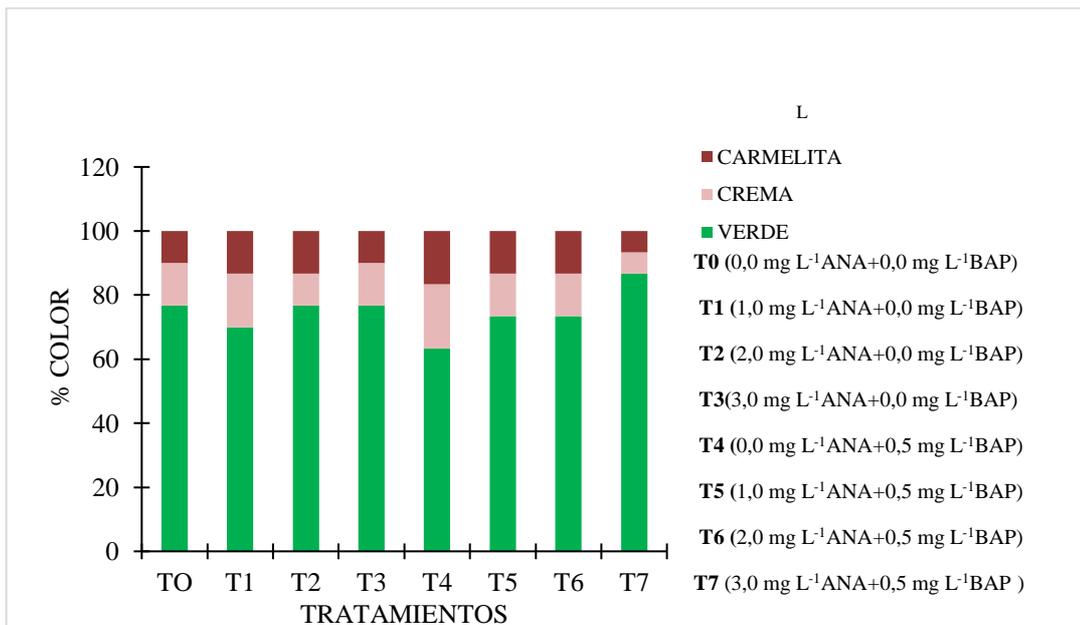


Figura 15. Porcentaje de color del callo en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.4.4 Friabilidad del callo en total oscuridad

En la Figura 16, se presenta la friabilidad del callo, la misma que se define como la capacidad que tiene para disgregarse. Así, todos los callos registrados, en el T1(1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) fueron friables con un porcentaje de 36,67 % y 43,67 %, respectivamente; mientras que, el T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) presentaron un bajo porcentaje de callos friables, con 13,33 % y 20 %, respectivamente. El análisis de varianza aplicado mostró que no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0,05$).

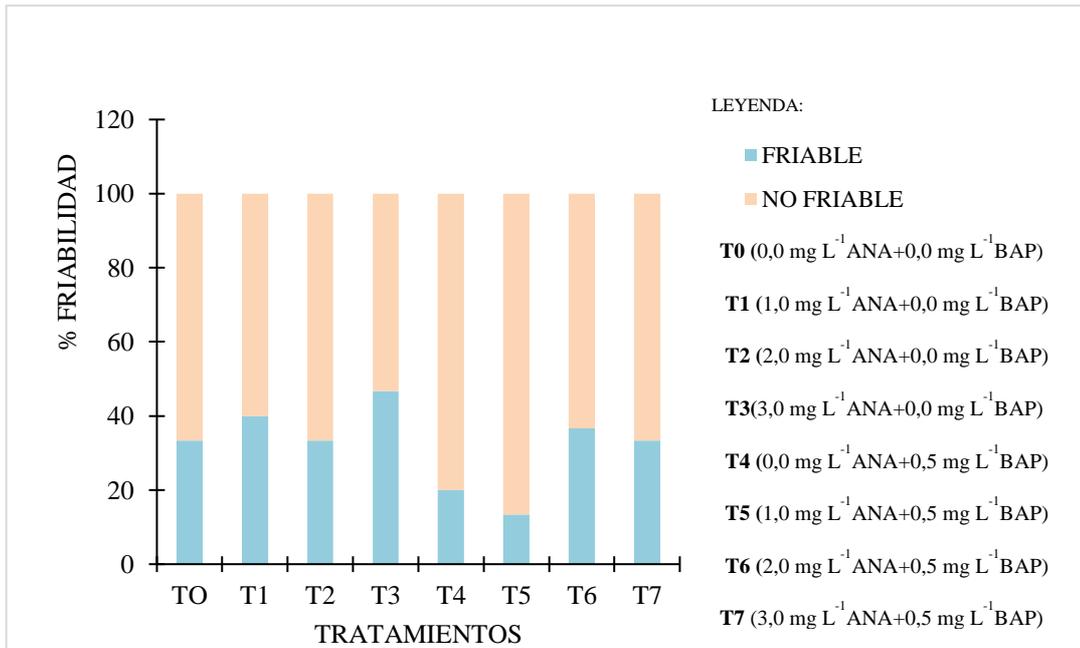


Figura 16. Porcentaje de friabilidad del callo en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.5 Porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en oscuridad

A los 60 días de evaluación se observó la formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en donde el T4 conformado por 0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, presentó el mayor porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas con el 15 %; mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP), T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP), T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T7 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP), registró un bajo porcentaje con 11 %. Según el análisis de varianza aplicado se demuestra que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0,05$) (Figura 17).

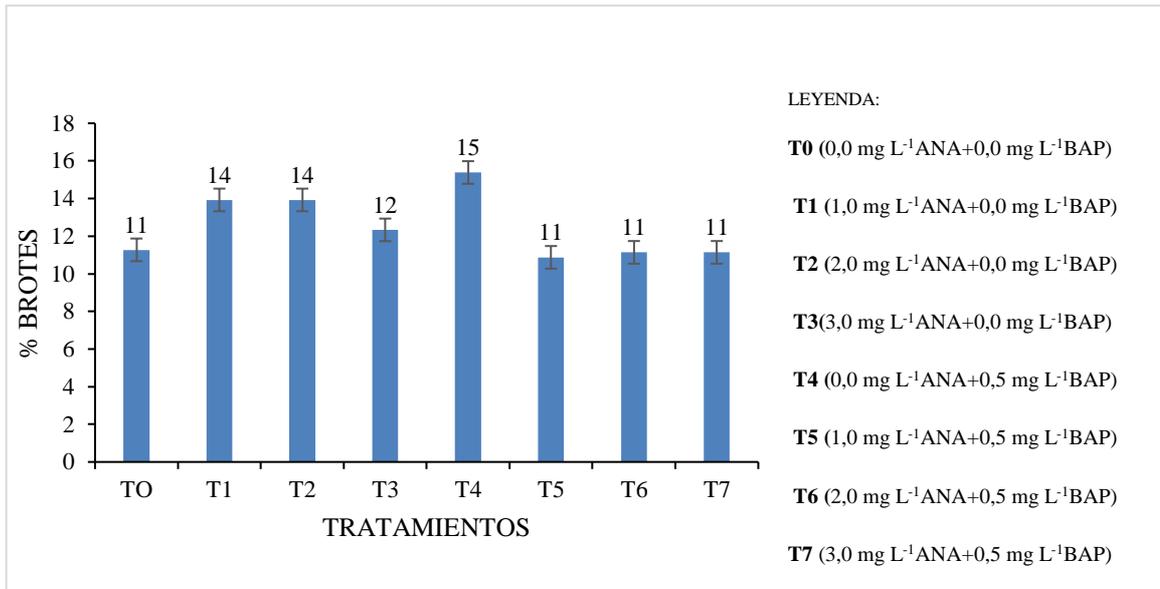


Figura 17. Porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl, a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.2.5.1 Días a la formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en oscuridad a los 60 días de evaluación.

En la figura 18, se presentan la evaluación de los explantes, quienes expresaron la formación de brotes a partir del día 5, donde el T4 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzo un promedio de 116 brotes; sin embargo, a partir de la primera evaluación todos los tratamientos presentaron formación de brotes, estabilizándose de manera consecutiva a los 60 días de evaluación. Así también, el T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) presentó una baja formación, con 82 brotes. El análisis de varianza no paramétrico de Kruskall Wallis, en donde se compararon todos los tratamientos registró que no presentaron diferencias estadísticas significativa entre tratamientos ($p > 0,05$).

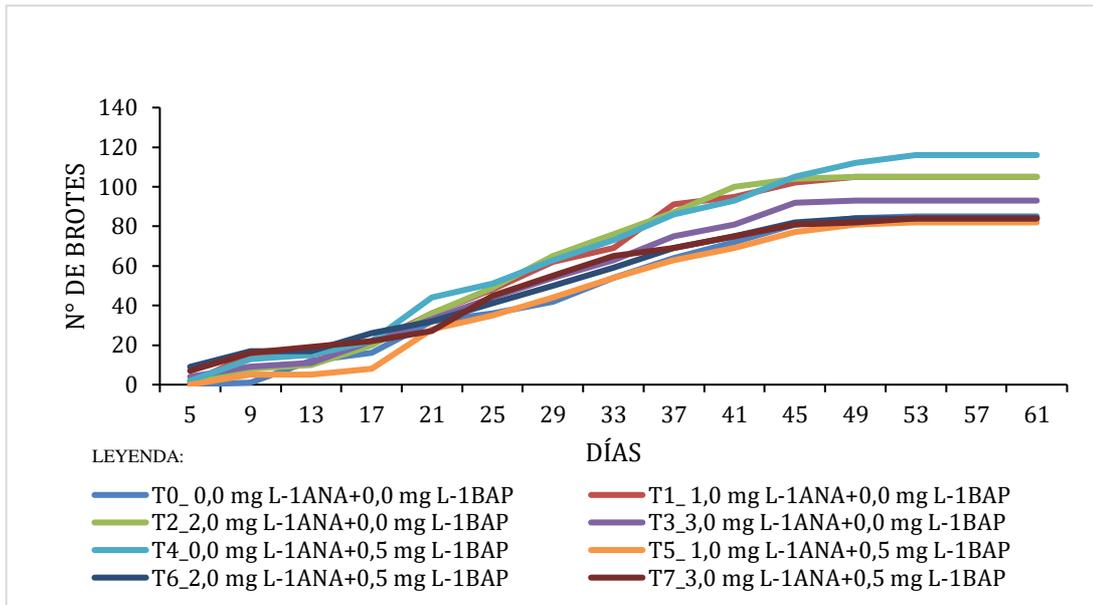


Figura 18. Días a la formación de brotes de *Cattleya maxima* Lindl, a los 60 días de evaluación en la oscuridad.

6.3 Influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl.

6.3.1 Porcentaje de contaminación en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo

El análisis de varianza mostró que existió diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$); Así, se registró a partir del día 5 de evaluación en el T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) un porcentaje de 11,11 % , siendo el único tratamiento que presentó contaminación después de la inoculación *in vitro* ; así mismo, los tratamientos restantes, T0 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP), T4 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP), T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T7 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP), no presentaron ningún tipo de contaminación durante un tiempo de evaluación de 60 días (Figura 19).

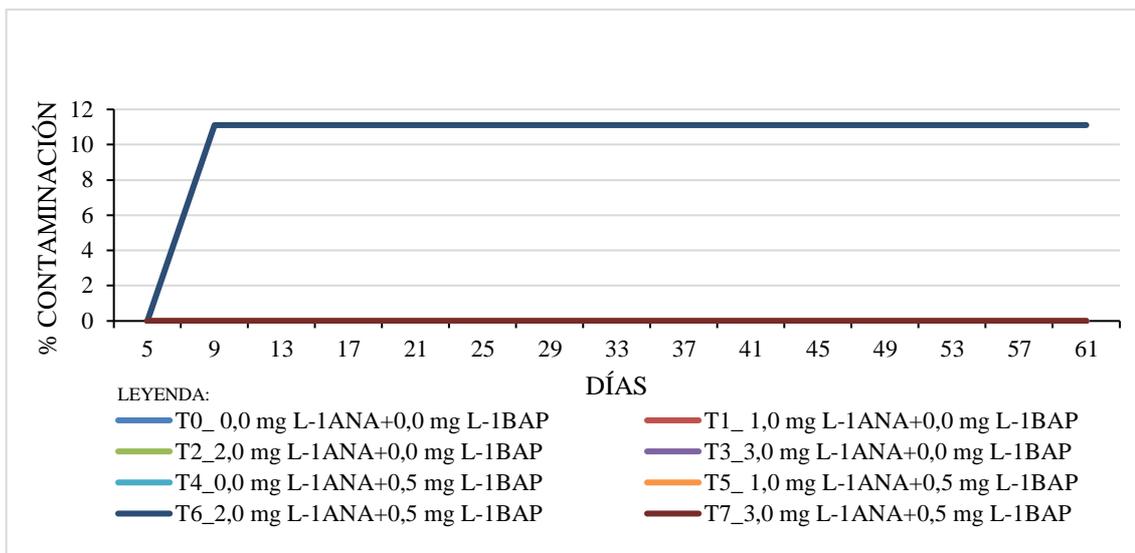


Figura 19. Porcentaje de contaminación de callos de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperíodo, a los 60 días de evaluación.

6.3.2 Porcentaje de oxidación fenólica en callos de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperíodo

A los 60 días de evaluación no se observó diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) en cuanto a la variable de oxidación fenólica en callos de *Cattleya maxima*., en donde se registró 72,22 % en el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP), siendo el mayor porcentaje; mientras que, el T0 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP); T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP); T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T7 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) registraron un porcentaje de 30 %, los cuales fueron los que presentaron el más bajo porcentaje de oxidación fenólica (Figura 20).

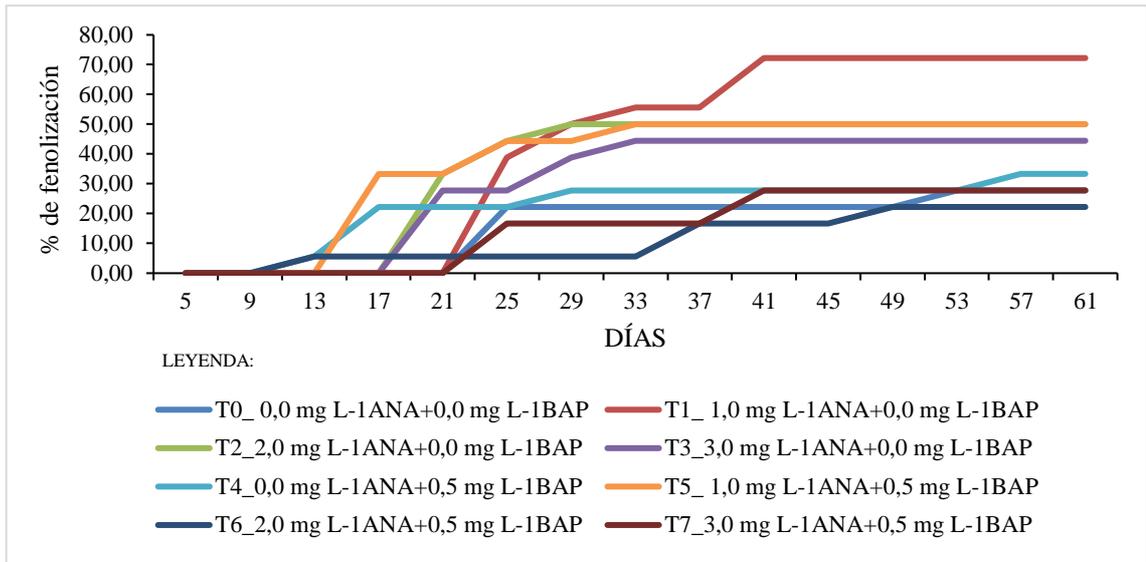


Figura 20. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cattleya maxima* Lindl, bajo condiciones de fotoperiodo a los 60 días de evaluación.

6.3.3 Porcentaje de mortalidad de callos de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo

En la variable de porcentaje de mortalidad de callos, los menores valores de mortalidad se registraron en el T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) con un 5,56 %; mientras que, el T2 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) presentó la mayor mortalidad de los explantes con 11,11 %. Según el análisis de varianza aplicado se observó que no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos (p>0,05) (Figura 21).

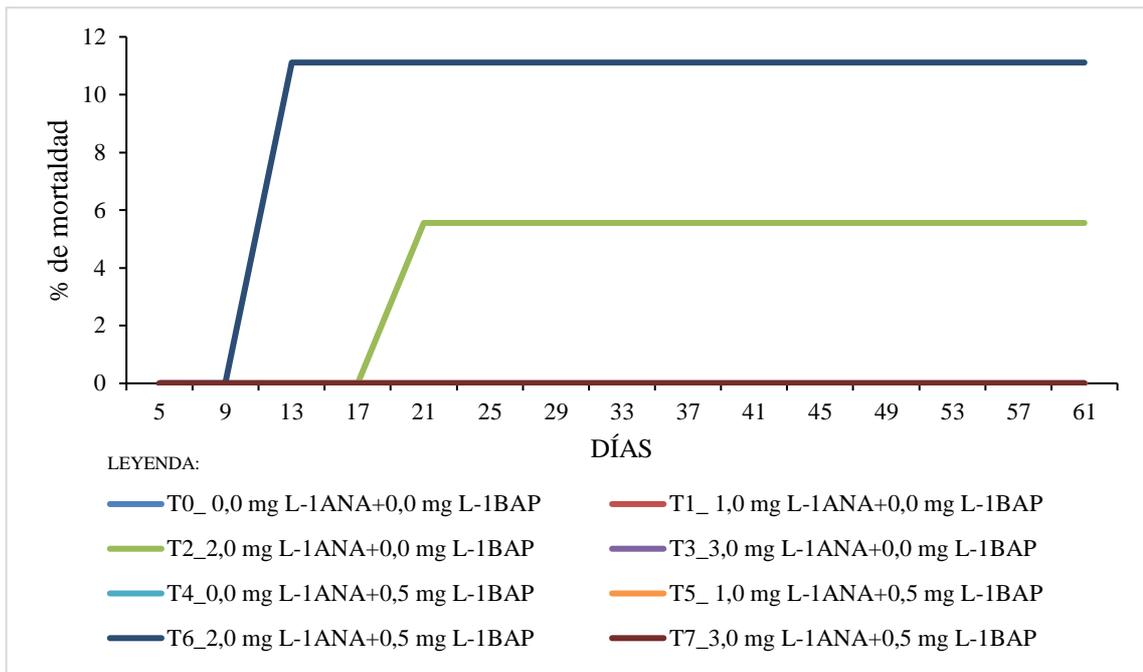


Figura 21. Porcentaje de mortalidad de callos de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo a los 60 días de evaluación.

6.3.3.1 Formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo

Como se puede evidenciar en la Figura 22, el T4 conformado por 0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP y T7 formado por 3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, obtuvo el mayor porcentaje de formación de estructuras callogénicas, con el 14,28 % y 16,36 %, respectivamente; mientras el T1 que estuvo constituido por 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP, presentó un menor valor, con 9,61 %. El análisis de varianza aplicado evidenció que no existió diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p > 0,05$; $F = 0,44$).

Para poder observar de una mejor forma el aspecto de formación de los callos bajo condiciones de fotoperiodo, obtenidos en cada uno de los tratamientos con distintos niveles de auxinas y citoquininas., se realizó una secuencia de fotografías, al finalizar los 60 días de evaluación. (Figura 23).

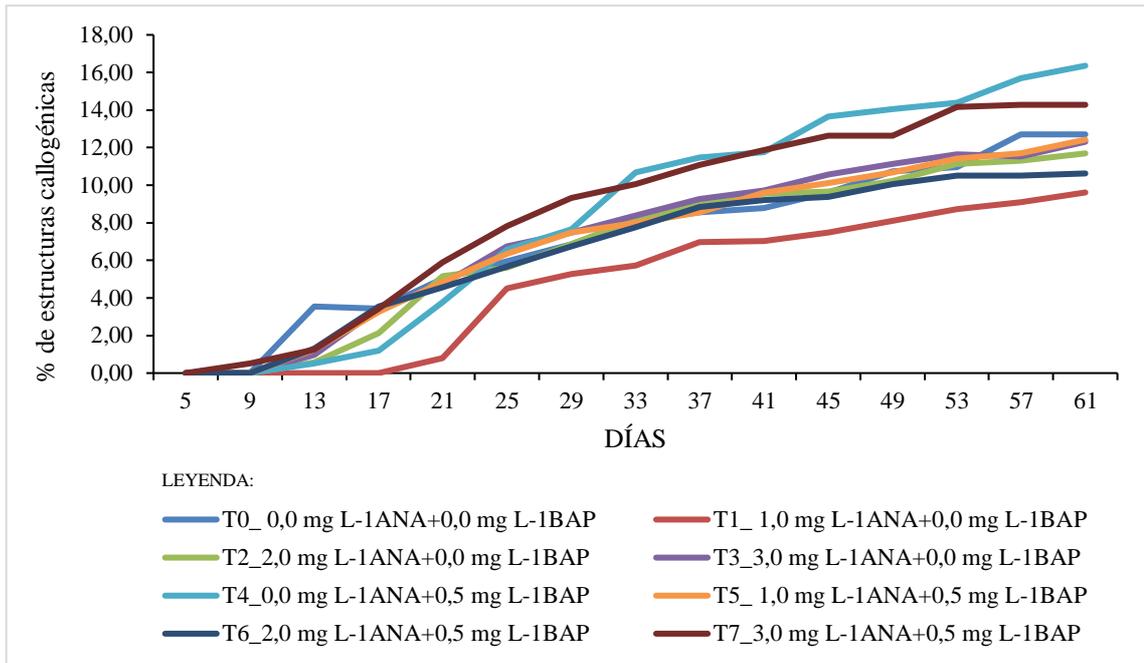


Figura 22. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.

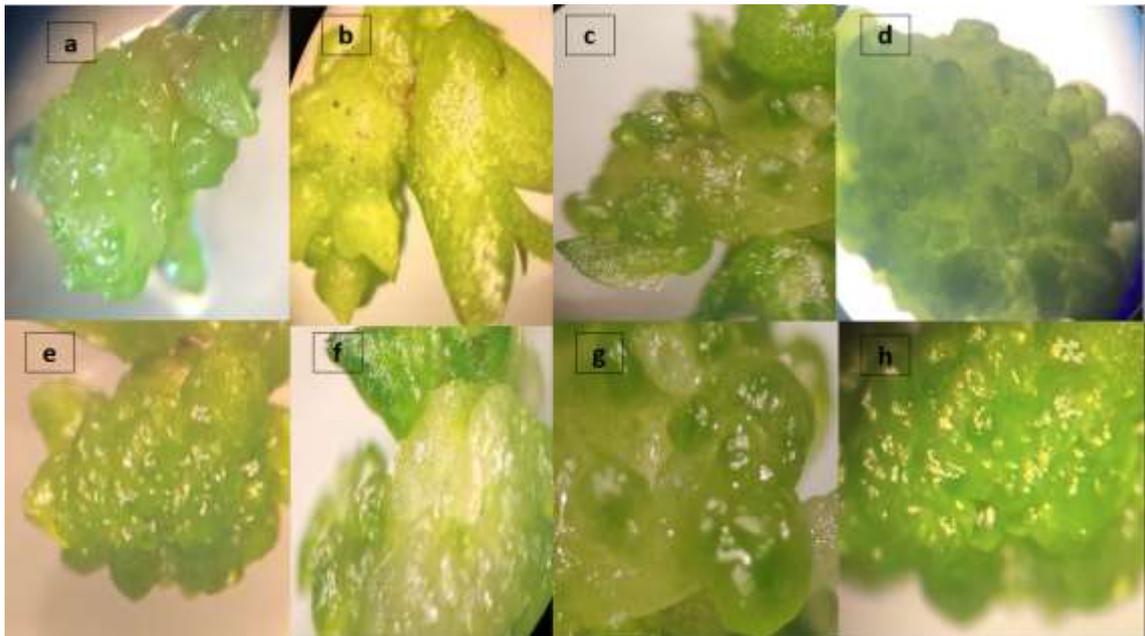


Figura 23. Formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación, **A: T0** (0,0 mg L⁻¹ANA+0,0 mg L⁻¹BAP); **B: T1** (1,0 mg L⁻¹ANA+0,0 mg L⁻¹BAP); **C: T2** (2,0 mg L⁻¹ANA+0,0 mg L⁻¹BAP); **D: T3**(3,0 mg L⁻¹ANA+0,0 mg L⁻¹BAP); **E: T4** (0,0 mg L⁻¹ANA+0,5 mg L⁻¹BAP); **F: T5** (1,0 mg L⁻¹ANA+0,5 mg L⁻¹BAP); **G: T6** (2,0 mg L⁻¹ANA+0,5 mg L⁻¹BAP); **H: T7** (3,0 mg L⁻¹ANA+0,5 mg L⁻¹BAP).

Fuente: Proyecto de investigación *Cattleya maxima* Lindl, 2022

6.3.3.2 Días a la formación de estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo

Como se puede ver en la Figura 24, al noveno día de evaluación se empezó a evidenciar la formación de estructuras callogénicas, donde el T7 formado por 3 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, obtuvo un porcentaje de 9 %; Así también, cabe recalcar que a los 60 días de evaluación en todos los tratamientos se evidenció una ligera estabilización en la formación de estructuras callogénicas. Al aplicar la prueba no paramétrica Kruskal Wallis se encontró que no existió diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

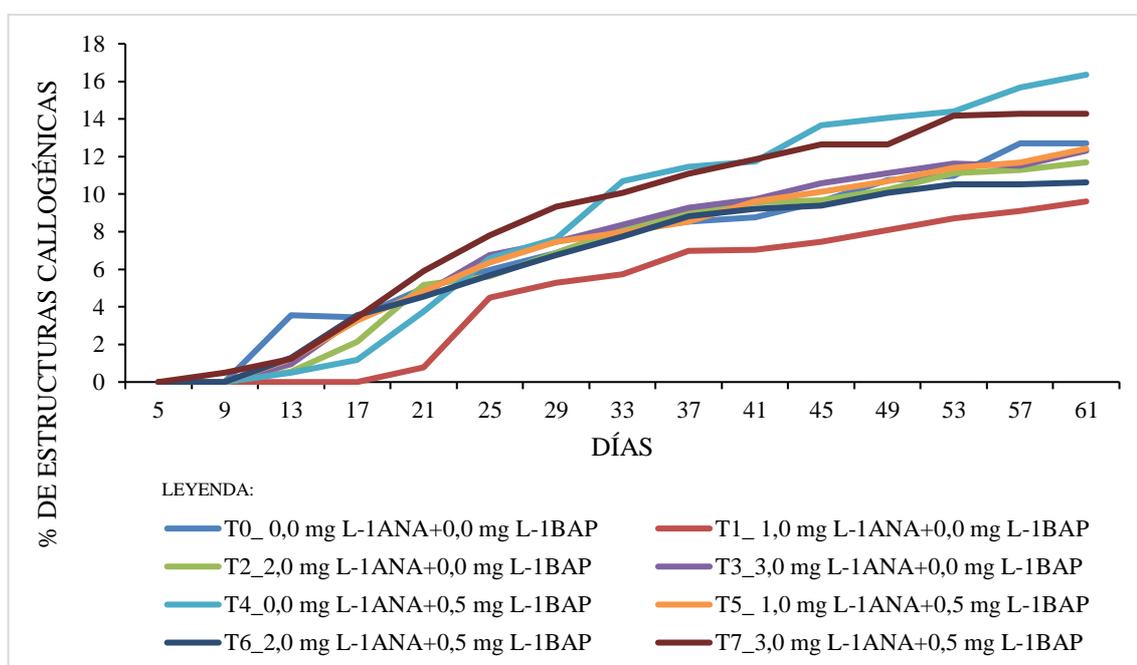


Figura 24. Días a la formación de callos de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.

6.3.3.3 Porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas, bajo condiciones de fotoperiodo

En la figura 25, se presentan los resultados del porcentaje de protocormos que formaron estructuras callogénicas, en donde el T6 que estuvo conformado por la combinación hormonal de 2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP y T5 por 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, presentó el mayor porcentaje, siendo este del 40 %; por otro

lado, los tratamientos T0 formado 0,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP y T3 con 3,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP, presentaron el 19 %, respectivamente. La prueba estadística realizada a los tratamientos, demostró que no se presentó diferencias estadísticas significativas entre los mismos ($p < 0,05$).

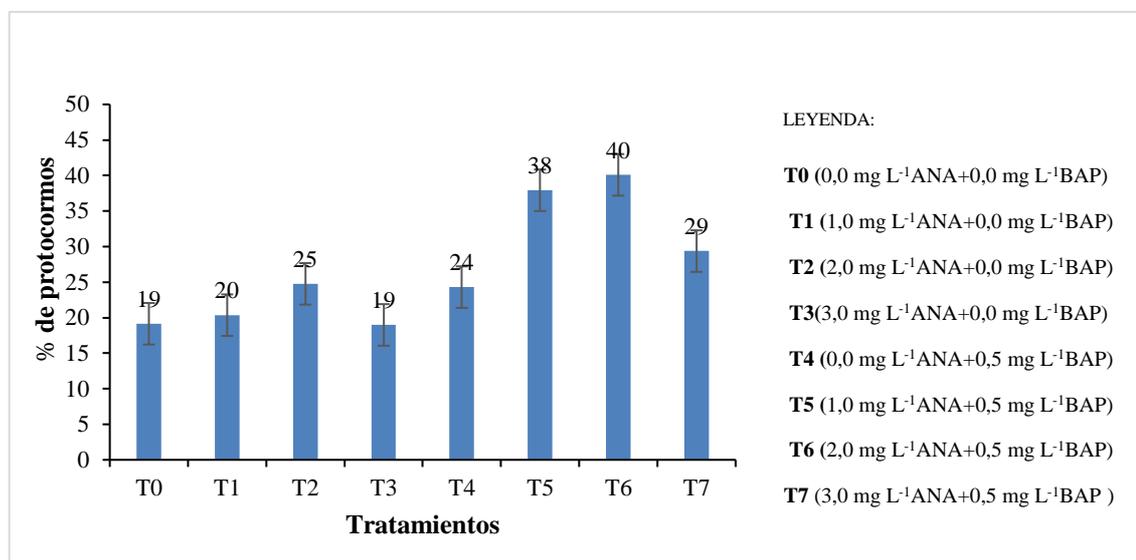


Figura 25. Porcentaje de protocormos que formaron callo, bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.

6.3.2.4 Color del callo de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo

La coloración del callo en *Cattleya maxima* Lindl., presentó cuatro coloraciones en los tratamientos establecidos. Así, el T4 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) mostró una coloración verde, con 88,89 %; carmelita con 5,56 % y amarillo con 5,56 %, respectivamente; mientras que el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó un bajo porcentaje de tonalidad verde, con el 38,89 %; 27,78 % crema y 27,78 % carmelita. Al aplicarse el análisis estadístico, no se presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p > 0,05$) (Figura 26).

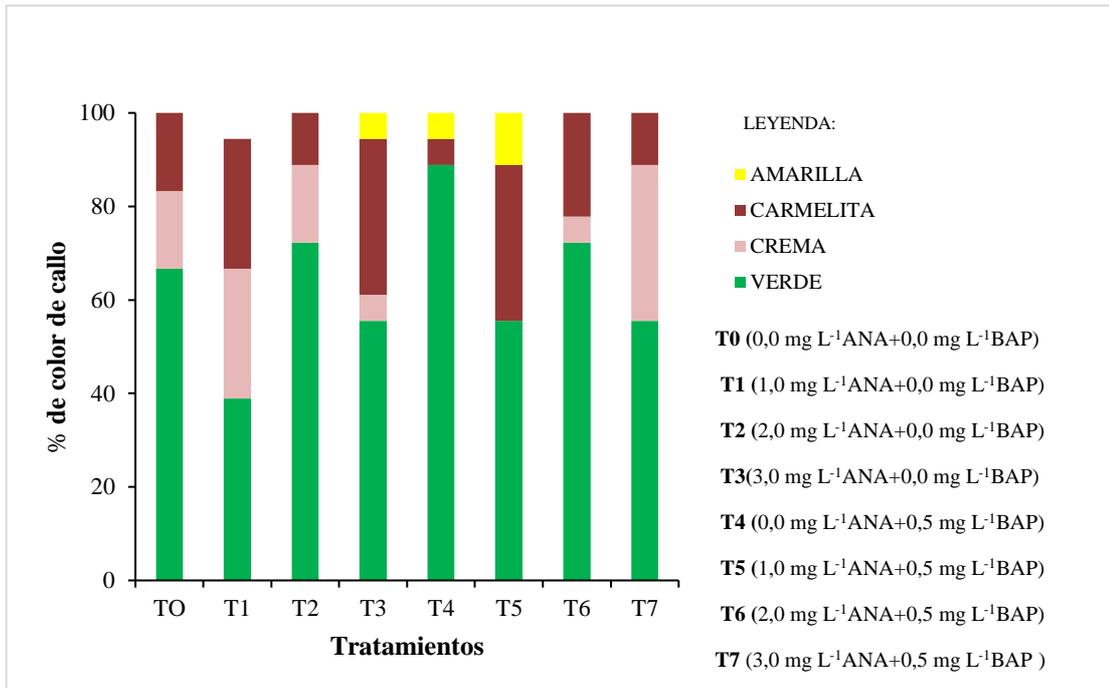


Figura 26: Porcentaje de color del callo en explantes de *Cattleya maxima Lindl.*, bajo condiciones de fotoperiodo a los 60 días de evaluación.

6.3.3.5 Friabilidad del callo de *Cattleya maxima Lindl.*, bajo condiciones de fotoperiodo

La variable friabilidad se muestra en la figura 27, la cual se define como la capacidad que posee el callo para disgregarse; así, el T7 formado por 3,0 mg L⁻¹ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP registro un 44,44 % de callos friables y un 55,56% de callos no friables en el mismo tratamiento; mientras que, el T2(2,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó un porcentaje de 38,89 % de callos friables; así mismo, un porcentaje de callos no friables de un 61,11 %. Al aplicarse el análisis estadístico no presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p > 0,05$).

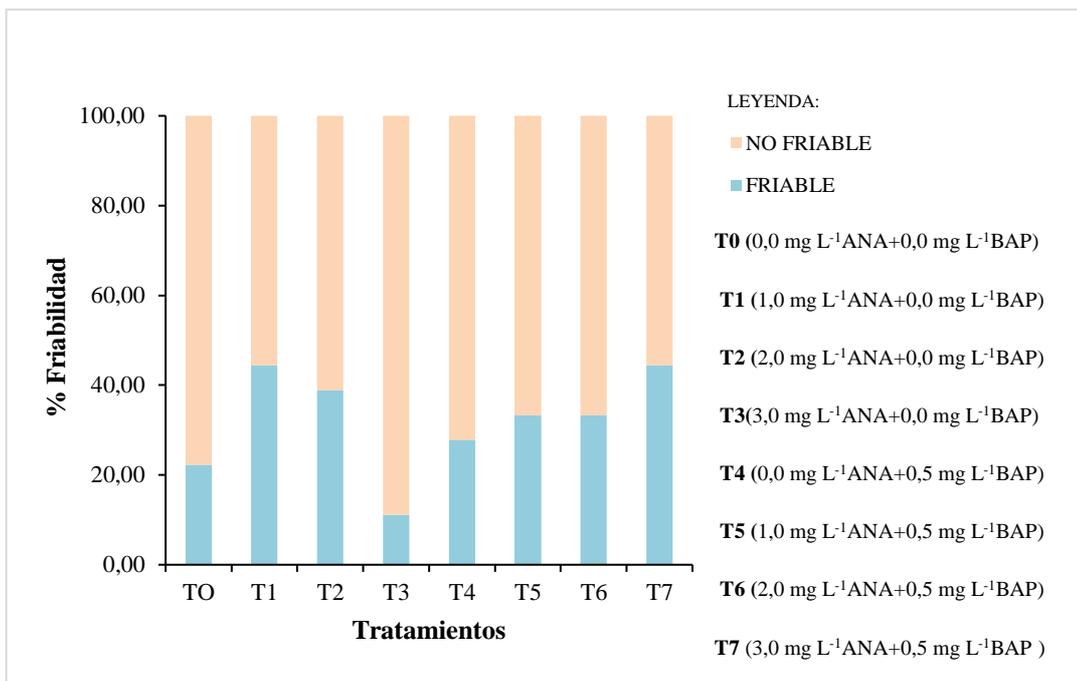


Figura 27. Friabilidad del callo de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.

6.4 Formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo

En cuanto a la variable de formación de brotes, se registró en el T4 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) un mayor porcentaje de formación de brotes con 14 %; mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) y T7 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) manifestaron un bajo porcentaje del 10 %, respectivamente. Según el análisis estadístico y la prueba de significancia aplicada mostró que existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos (Figura 28).

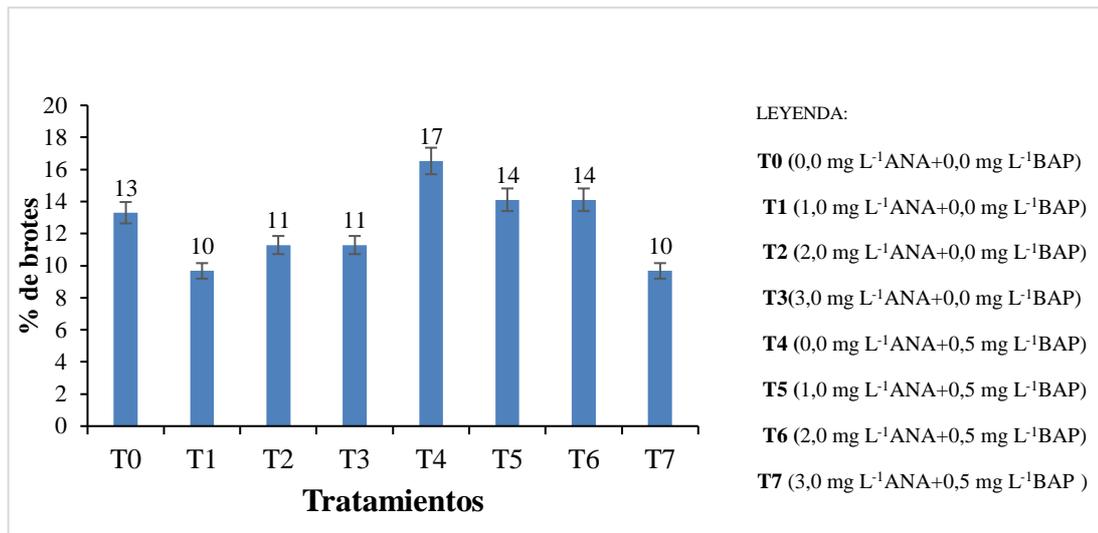


Figura 28. Porcentaje de formación de brotes, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.

6.4.1 Días a la formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., en fotoperiodo

La aparición de brotes en estructuras callogénicas, se evidencio a los 29 días de inoculación de los explantes. En los tratamientos T4 conformado por 0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP y T5 por 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, con 2 y 7 brotes, respectivamente. Así también, a los 60 días de evaluación presentaron una ligera estabilización en la formación de brotes, con valores promedios entre 20 y 40 %. Según el análisis estadístico y la prueba de significancia aplicada mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos (Figura 29).

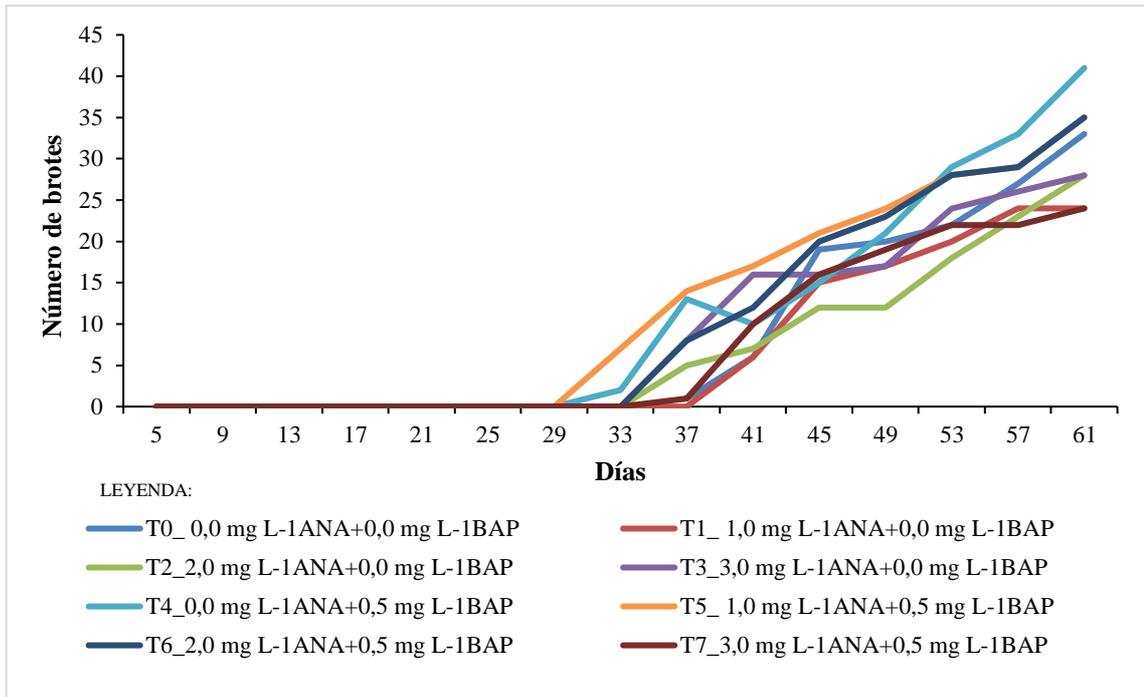


Figura 29. Días de formación de brotes en estructuras calogénicas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo, a los 60 días de evaluación.

6.5 Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales

La difusión de información generada en la presente investigación sobre **“Influencia de la sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas e inducción de estructuras calogénicas, a partir de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl”**, se realizó en la casa abierta de la Carrera de Ingeniería Forestal y al Equipo Técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, en donde se realizaron las siguientes actividades: entrega de un Tríptico al público interesado, un Artículo científico, la socialización de un Poster; y, un documento técnico, el mismo que contiene resultados de la investigación realizada.

7. Discusión

7.1 Efecto de tres concentraciones de sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl, en el medio de cultivo Knudson C (KC-1922).

7.1.2 Porcentaje de contaminación

Según los resultados obtenidos en la presente investigación la contaminación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., registró el menor porcentaje de contaminación de 6 %, en el método de desinfección de inmersión en alcohol al 70 %, hipoclorito de sodio más tres gotas de Tween 80 y agua destilada estéril dieron con resultado bajos porcentajes de contaminación, resultados que fueron inferiores a los presentados por Rahmawati y Dewi (2020), que registraron bajos porcentajes de contaminación en *C. skinneri* y *C. maxima* de 16,66 %, esto debido a que las semillas fueron expuestas a métodos de desinfección, como inmersión en alcohol al 95 % fuera de cámara, hipoclorito de sodio y la aplicación de enjuagues de agua destilada, lo que evidenció una disminución en los porcentajes de contaminación. Por lo tanto, la contaminación registrada en los dos casos fue causada por hongos y bacterias, lo que de alguna manera se corrobora con lo mencionado por Ansori (2015), quien afirma que el cultivo *in vitro* puede presentar contaminación de tejidos y ser originados de dos fuentes fundamentales: una llevada a cabo por microorganismos en la superficie o en los tejidos de los explantes, o por deficiencias en la manipulación de los operadores en los laboratorios.

7.1.3 Porcentaje de germinación

Se evidenció que la sacarosa, no tuvo influencia estadísticamente significativas en la germinación de la semilla de *C. maxima*; por cuanto, en el T0 que no tuvo ningún nivel de sacarosa se registró un 91 %; sin embargo, el T1 que contenía sacarosa, en una concentración de 20 g L⁻¹, obtuvo 87 %, registrando en los dos casos altos porcentajes de germinación en esta especie; por lo tanto, las concentraciones de sacarosa presentaron una respuesta favorable en las primeras etapas de germinación de las semillas; resultados que son similares a los reportados por Chávez et al. (2014) quienes en su estudio registraron que la viabilidad de las semillas de *Comporetia falcata* en medio de cultivo Knudson C, presentó un porcentaje de germinación de 71,5 % ; además, de asegurar que uno de los mejores métodos

para la germinación asimbiótica de semillas de *C. falcata*, fue el uso del medio de cultivo Knudson C.

En esta investigación la adición de sacarosa en los tratamientos, registró altos porcentajes de germinación, así en el T1 (87 %) con 20 g L⁻¹ y en el T2 (73 %) con 30 g L⁻¹ (75,6 %); por otro lado, en el T0 (testigo) que no contuvo sacarosa, presentó un porcentaje de 91 %, resultados que son diferentes a los reportados por Fernandes et al. (2013), quienes mencionaron que montos menores o mayores que estos, proporcionaron una reducción en la germinación y el crecimiento; Así mismo, el porcentaje de germinación de las semillas obtenidos en la presente investigación son ligeramente similar a los reportados por Rodríguez et al. (2015), quienes en su investigación cultivaron *in vitro* semillas de *C. aurantiaca*, las cuales tuvieron una tasa de germinación similar de 91,3; 93,2; 92,12 y 91,9 % en los medios de cultivo de Hutner y Knudson C modificado, cabe recalcar que en su investigación utilizó 3 % de sacarosa. De esta manera se corrobora con Fernandes et al. (2013), quienes describen que las semillas de *Cattleya violaceae* Kunth. tienen un patrón de germinación y crecimiento inicial diferente al de la mayoría de las angiospermas, al principio el embrión se hincha, lo que hace que la cubierta de la semilla se rompa y luego se libera dando paso al proceso de germinación.

7.2 Fase de inducción de callos de *Cattleya maxima* Lindl., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas.

7.2.1. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en la formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., bajo condiciones de fotoperiodo 16/8 y oscuridad.

7.2.2 Porcentaje de Contaminación

En la fase de inducción de callos de *Cattleya maxima* Lindl., se obtuvo que los tratamientos T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T7 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzaron por igual el porcentaje de contaminación de 20 % y un porcentaje de mortalidad registrada en el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) con un 7 %, bajo condiciones de oscuridad, mientras que bajo condiciones de fotoperiodo el T6 conformado por 2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, obtuvo un bajo porcentaje de 11,11 %, lo que evidencia que el uso de los explantes en total asepsia de un banco de germoplasma de laboratorio, influyó en los bajos porcentajes de contaminación y por ende alto porcentaje de sobrevivencia de los explantes. Estos resultados son ligeramente superiores a los descritos por Rahmawati y Dewi

(2020), quienes registraron un porcentaje de sobrevivencia del 80 % y contaminación del 100 % en explantes de *C. skinneri* y *C. maxima*, causado principalmente por bacterias y hongos. De esta manera se hace referencia a lo descrito por Gutierrez (2019), quien asegura que la contaminación microbiana es uno de los problemas más frecuente en condiciones *in vitro* y estos pueden ser originados por hongos, bacterias y levaduras denominados vitropatógenos; así también (Cuevas y Salaverría, 2004), describen el termino vitropatógeno el cual para ellos son aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro* ..

7.2.3 Porcentaje de oxidación fenólica

En los tratamientos aplicados se evidenció que el porcentaje de oxidación fenólica es alta en los tratamientos, cuya combinación hormonal corresponde a T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP); T5 (1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP); T6 (2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) y T7 (3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) con el 30 % de oxidación fenólica, respectivamente bajo condiciones de oscuridad, resultados que son inferiores a los descritos por Gutierrez (2019) quien registró una oxidación fenólica en *C. skinneri* y *C. maxima* de 73 %, a pesar de haber realizado la inmersión de los explantes en Ácido Cítrico (100 mg L⁻¹) fue insuficiente, para detener y evitar el proceso de liberación de fenoles, tanto en medio de cultivo semisólido como en líquido. Así mismo, en condiciones de fotoperiodo, en la presente investigación los niveles de oxidación fenólica en el T1 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,0 mg L⁻¹ BAP) fue alta con el 72,22 %, resultados son superiores a los reportados por Gow et al (2009) quienes presentaron un 60 % de oxidación fenólica de los explantes en una exposición a la luz durante un tiempo de 45 días. Estos resultados se corroboran con lo mencionado por Pierik (1990) quien comprobó que la oxidación fenólica de los tejidos, es un fenómeno fisiológico fotoactivo, porque se manifiesta en presencia de la luz y el oxígeno, produciendo la fenolización de los explantes.

7.2.4 Porcentaje de formación de estructuras callogénicas

En la presente investigación la formación de callos a partir de explantes de vitroplantas de *Cattleya maxima* Lindl., en total oscuridad, se logró observar que los mayores resultados se presentaron en las combinaciones hormonales 1,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP (T5) y de formado por 2,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP (T6), con 16,67 % y 16,63

%, respectivamente, en comparación con los resultados obtenidos en fotoperiodo el cual presentó en el T4 conformado por 0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP y T7 formado por 3,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP, obtuvo el mayor porcentaje de formación de estructuras callogénicas, con el 14,28 % y 16,36 %, respectivamente, resultados que fueron inferiores a los porcentajes obtenidos por Gutierrez (2019), el cual utilizó la citoquinina en concentración de 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y obtuvo el mayor porcentaje de callos, con un 29,1 %, mostrando diferencias estadísticas con respecto a las demás concentraciones. Por lo tanto, se corrobora con lo manifestado por Gow et al. (2009) quienes investigaron la influencia del régimen de luz utilizando hojas de dos especies de *Phalaenopsis*, *P. amabilis* y *P. nebula*, para la formación de embriogénesis somática directa, por lo que se deduce que, la luz fue un factor negativo retrasando la embriogénesis somática en ambas especies. En comparación con la presente investigación este resultado, aunque corresponde a otra respuesta morfológica distinta, muestra que la influencia de luz afecta la morfogénesis y limita la formación de estructuras callogénicas dependiendo de la especie de orquídea, como se evidencio en condiciones de fotoperiodo; así también, se puede recalcar que las técnicas de cultivo *in vitro* están siendo utilizados con éxito para la conservación y la propagación de especies de orquídeas en peligro de extinción y de importancia medicinal como lo reporta Gutierrez (2019), quien menciona que el uso de la citoquinina 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en el cultivo *in vitro*, promueve la reorganización de callos y desdiferenciación de las células porque interviene principalmente, en la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células, induciendo a la formación de órganos *de novo*.

7.2.5 Porcentaje de protocormos que formaron brotes, a partir de estructuras callogénicas

El porcentaje de protocormos que formaron brotes en los diferentes tratamientos, mostró que los mejores resultados se registraron bajo condiciones de oscuridad durante un tiempo de evaluación de 60 días, en el cual el T4 (0,0 mg L⁻¹ ANA+0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo un mayor porcentaje de brotación con 15 %, en comparación con lo registrado en fotoperiodo, donde el T4 obtuvo un porcentaje similar del 14 %, cabe recalcar que los dos tratamientos estuvieron conformados por 0,5 mg L⁻¹ BAP. Estos resultados son superiores con los registrados por Reuni et al.(2008), quienes en su estudio de investigación relacionado con el rescate y multiplicación de las orquídeas, señalan que el mayor de número de brotes

por explante, se da a partir del incremento de la concentración de citoquinina, hasta alcanzar un óptimo ($9.55\mu\text{m}$ de BAP).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la formación de brotes en los protocormos se dio a los 29 días de instalado el ensayo bajo condiciones de fotoperiodo y en menor tiempo (5 días) en condiciones de total oscuridad, esta diferencia considerable en la formación de brotes, remarca en la presente investigación, la importancia de la oscuridad en la inducción de los mismos; del mismo modo, éstos resultados obtenidos en el número de días que tardan los protocormos para la formación de brotes adventicios son inferiores con los reportados por Cadavid y Salazar (2008), quienes en su estudio manifiestan, que a partir de los 45 días se inició la aparición de los brotes foliares, sin observarse la formación de callo.

7.2.6 Porcentaje de color de los callos

El color de los callos en los tratamientos del ensayo de oscuridad, se visualizó que en los 60 días de evaluación, el color predominante fue el verde (86,67 %) en el T7 ($3,0\text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5\text{ mg L}^{-1}$ BAP), en comparación con lo obtenido bajo condiciones de fotoperiodo, en donde el T4 ($0,0\text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5\text{ mg L}^{-1}$ BAP) mostró así mismo una coloración verde, con 88,89 %; resultados que fueron superiores a los obtenidos por Espinosa et al (2010) quienes obtuvieron un 80 %, con una tonalidad verde tenue en el callo, con puntos verde intenso dispersos en toda la masa morfogénica; así también, observaron que este color se presentó en el medio de cultivo MS, que contenía 2 mg L^{-1} de ANA+BAP+AIA. Según Rodríguez et al. (2014) investigadores han relacionado el tipo de callo con la respuesta organogénica y embriogénica que se pueda presentar. Por lo tanto, el color del callo puede ser un indicador importante de la ruta morfogénica a seguir; no obstante, el color del callo sea este verde o de apariencia oxidada como los fenólicos, dan un aspecto de vitalidad, siendo altamente dependiente de la especie.

7.2.7 Porcentaje de friabilidad del callo

En la variable friabilidad del callo, el tratamiento T1 ($1,0\text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,0\text{ mg L}^{-1}$ BAP) y T3 ($3,0\text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,0\text{ mg L}^{-1}$ BAP) alcanzaron un 46,67 % y 36,67 % respectivamente, mientras que el T7 que estuvo constituido por $3,0\text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5\text{ mg L}^{-1}$ BAP presentó un 86,67 %; en tanto que, bajo condiciones de fotoperiodo en el T7 formado por $3,0\text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5\text{ mg L}^{-1}$ BAP, registró un 44,44 % de callos friables, valores que fueron superiores a los obtenidos por Espinosa et al (2010), quienes obtuvieron un porcentaje del 20 % de

callos friables, durante la inducción de callo; también observaron que en el medio MS que contenía 2,0 mg L⁻¹ de ANA+BAP+AIA, el callo formado fue más friable. Estos resultados se corroboran con lo manifestado por Ruscitti et al. (2011) quienes mencionan que el callo está compuesto por células similares a las del parénquima y una de las propiedades más importantes del tejido calloso es la friabilidad, que puede definirse como la tendencia de las células para separarse una de otras, por lo tanto, mientras un callo muestre mayor friabilidad su capacidad será mejor para obtener la división celular.

7.3 Difusión de información generada

La difusión de los resultados de la presente investigación, se realizó en base a actividades como: socialización ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación *Cinchona* que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja. Además, se elaboró un tríptico informativo y un manual técnico para la publicación de los resultados obtenidos en la presente investigación a los actores sociales interesados; así como también un poster informativo y un artículo científico del trabajo de integración curricular, con el propósito de difundir la información obtenida.

8. Conclusiones

Las diferentes concentraciones de sacarosa adicionadas al medio de cultivo Knudson-C (KC-1922) no influyeron significativamente en el porcentaje de germinación de *Cattleya maxima* Lindl., ya que lograron en todos los tratamientos los mejores porcentajes de germinación; sin embargo, el mayor porcentaje de germinación de las semillas se presentó en el tratamiento testigo, que no contenía sacarosa en la composición química del medio de cultivo.

En la fase de inducción de callos, los porcentajes de contaminación de los explantes fueron bajos, por cuanto se utilizaron protocormos provenientes de vitroplantas que se conservan en condiciones de asepsia, en donde se obtuvo que el T6 cuya combinación Hormonal fue $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP y el T7 ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), alcanzaron un porcentaje de contaminación de 20 %, principalmente por causa de hongos y bacterias.

En la fase de inducción de estructuras callogénicas, bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad, se comprobó que la oxidación fenólica es una variable que influye en la mortalidad de los explantes.

La combinación hormonal auxina-citoquinina reflejo ser más efectiva al combinar que al aplicar por separado, en donde el balance hormonal conformado por $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP, obtuvo los mejores resultados en la variable de formación de estructuras callogénicas en condiciones de oscuridad, con un porcentaje de 16,67 % en el T5 y en fotoperiodo 16,36 % en el T4.

La influencia del fotoperiodo y la oscuridad en la formación de brotes *de novo*, a partir de estructuras callogénicas generó resultados similares, en donde el T4 ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA+ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) obtuvo un porcentaje de brotación de 14 % en fotoperiodo y en condiciones de oscuridad un 15 %, respectivamente; resultando ser ligeramente el más eficiente.

9. Recomendaciones

Para la fase de germinación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., es necesario utilizar cápsulas fisiológicamente maduras y completamente cerradas, de tal manera que las semillas estén asépticas, para ser extraídas en la cámara de flujo laminar.

Para la desinfección de las semillas se recomienda utilizar un protocolo con hipoclorito de sodio a concentraciones más altas del 20 % y menor tiempo de inmersión, por cuanto en la presente investigación, el método utilizado no fue el más adecuado.

Para la fase de inducción de callos de *Cattleya maxima* Lindl., se recomienda utilizar diferentes tipos de material vegetal, es decir, explantes de: hojas, bulbos y contar con suficiente material vegetal *in vitro* ; así como también, realizar el monitoreo durante un periodo de tiempo de 90 días de evaluación.

Para la inducción de estructuras callogénicas se recomienda aplicar una concentración mayor de auxinas y citoquininas a las utilizadas en la presente investigación (3,0 mg L⁻¹ ANA y 0,5 mg L⁻¹ BAP), debido a que las auxinas en altas concentraciones estimulan la formación del callo y las citoquininas en concentraciones medias la multiplicación de tejidos, para lo cual se podría probar la combinación hormonal de 4,0 mg L⁻¹ ANA y 0,5 mg L⁻¹ BAP, en un tiempo de evaluación de 90 días, tanto en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

10. Bibliografía

- Ambrona, C. G. H. D. (2015). Definición y alcance de la reproducción de plantas cultivadas. *Agrónomos Etsiaupm*, 1–42. <http://oa.upm.es/36955/>
- Ansori, A., (2015). Optimización de un medio de cultivo para la vitropropagación de *Vanilla planifolia* G. Jackson. *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*, 3(April), 49–58.
- Antonio Salazar, (2012). *Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de Cattleya mendelii Dombroin (Orchidaceae)*.
- Aquino, J. V. (1998). *Ventajas del cultivo in vitro . Febrero*.
- Balaguera., L., H. E., Salamanca G., F. A., García, J. C., y Herrera-Árevalo, A. (2015). Etileno y retardantes de la maduración en la poscosecha de productos agrícolas. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(2), 302. <https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i2.3222>
- Baquero, F., Sierra, R., Ordóñez, L., Tipán, M., Espinoza, L., Rivera, M. B., y Soria, P. (2004). La vegetación de Los Andes del Ecuador. Memoria explicativa de los mapas de vegetación: potencial y remanente a escala 1:250.000 y del modelamiento predictivo con especies indicadoras. *EcoCiencia/CESLA/EcoPar/MAG SIGAGRO/CDC-JATUN SACHA/División Geográfica-IGM*, 1–28.
- Bohorquez-Sandoval, C., Alvarez Herrera, J., y Niño Medina, R. (2011). Giberelinas y 6-Bencilaminopurina en la plantulación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) híbrido Adrale RZ F1. *Temas Agrarios*, 16(2), 42–53. <https://doi.org/10.21897/rta.v16i2.690>
- Cadavid, I. C., y Salazar, S. (2008). Micropropagación De *Cattleya Quadricolor*. *Proyectos de Grado*, 79. <https://core.ac.uk/download/pdf/47237276.pdf>
- Castillo, A. (2014). *Propagación de plantas por cultivo in vitro : una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*.
- Chamorro, A. H., Martínez, S., Fernández, J. C., y Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. Misty blue Evaluation of different concentrations of some plant growth regulators on *in vitro* multiplication and. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 47–53. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n1/v25n1a06.pdf>

- Chávez, H. K., Mosquera-Espinosa, A. T., y Otero Ospina, J. T. (2014). Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. y Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronomica*, 64(2), 125–133. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>
- Chavez, H. K., Mosquera, A. T., y Otero Ospina, J. T. (2014). Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. y Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica*, 64(2), 125–133. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>
- Costa, G. D. E., Escuela, R., Ingenier, C. D. E., y Biotecnolog, E. N. (2000). *Jardín Botánico Lankester (Universidad de Costa Rica) "Micropropagación de.*
- Cuevas y Salaverría, J. L. (2004). Duch .) Maria Claudia Sánchez-Cuevas y José Luis Salaverría. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 21–26.
- Cumbe, (2018). *Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas Carrera de Bioquímica y Farmacia “ Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género Epidendrum .”*
- Escobar, C. J., Osorio, V. E., Colorado, G., y Rivera, E. (2004). Experiencias de Injerto en camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) bajo condiciones del piedemonte de Caquetá. *Propagación Asexual de Plantas: Conceptos Básicos y Experiencias Con Especies Amazónicas*, 38–39.
- Espinosa, H. E. L., Cerda, A. L., González, J. M., Iglesias-andreu, L., Rosas, B. G., López, D. E., Ocampo, Y. M. M., Pool, F. A. B., y Buzzy, S. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp . *dawsonii* A PROTOCOL OF SOMATIC EMBRYOGENESIS FOR THE *IN VITRO* REGENERATION AND CHARACTERIZATION OF *Laelia anceps* ssp . *dawsonii*. *Rev. Fitotec. Mex.*, 33(4), 323–332.
- Espinoza. (2020). *Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis en explantes de Krameria erecta Willd In vitro induction of callogenesis and organogenesis in explants of Krameria erecta Willd introduccion La familia de las Krameriaceae comprende 17 especies en un solo.* 1–13.
- Fernandes, R., Junior, G., Mantovani, C., Cassano, A. O., De, E. G., y Lemos, M. (2013). *Desarrollo inicial y crecimiento in vitro en Cattleya violacea (Kunth) Rolfe a diferentes concentraciones de sacarosa.* 43(2), 127–133.
- Fernandez, D., Garzon, C., Yáñez, M., González, D., Mena, J., Tobar, F., y Freire, E. (2018).

- Orquídeas Y Bromelias De La Provincia De El Oro. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- García, E. M. (2017). Orquídeas. *Orquídeas*. <https://doi.org/10.11606/9788598316161>
- González. (1999). *Hormonas de las plantas*. 2–5.
- Gow, W. P., Chen, J. T., y Chang, W. C. (2009). Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(2), 363–369. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0243-6>
- Gutiérrez. (2019). *Inducción a callogénesis para la micropropagación de phalaenopsis (orchidaceae)*.
- Health, N. I. of. (2016). *Datos sobre la tiamina*. 1–3.
- Hylary, Q. G. (2014). *microbiología Condiciones generales para el cultivo de microorganismos*. 1–5.
- Jim, M. (2010). Establecimiento de bancos de germoplasma. *In vitro*, 21(1), 193–205.
- Jiménez León, M. (2014). Orquídeas del Ecuador-Número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado. *Actualidad*, August, 3.
- Jiménez, M. P., Piñero, M. C., Marín, M., Alcón, G. O., y Pérez, A. J. L. (2014). *Mejora de la aclimatación de plantas in vitro con altas concentraciones de CO₂*.
- Julio, V., y Aleixo, M. D. F. D. (2008). *Las citoquininas están asociadas al desarrollo floral de plantas de Solidago x luteus en días cortos Cytokinins are associated with flower development of Solidago × luteus plants under short days*.
- Lee Espinosa, H. E., Laguna Cerda, A., Murguía González, J., Iglesias-Andreu, L., Rosas, B. G., Escobedo López, D., Martínez Ocampo, Y. M., Pool, F. A. B., y Buzzy, N. S. (2010). Tel-Fax: (271)71-66410 y 66129. 3 Lab. Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana. *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex*, 33(4), 323–332.
- Marcela Ruscitti, Jose Beltano, D. G. (2011). *friabilidad-documento importante.pdf*.
- Mejía. (2021). *Revista fitotecnia mexicana Artículos Científicos Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de Agave angustifolia*. 1–7.
- MINAM. (2017). Orquídeas Del Perú Y Herramientas Para Su Identificación. *Ministerio Del Ambiente*, 118.
- Naranjo, V. (2019). *Reproducción sexual Selección sexual*.
- National, G., y Pillars, H. (1993). *Cultivos de tejidos en la agricultura*.

- Ninla Elmawati. (2014). *La homeostasis de las auxinas y su importancia*. 33(1), 13–22.
- Ospina, J. T. O., y Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270–276.
- Paniego, N., Heinz, R., Fernández, P., Lia, V., y Fusari, C. M. (2010). Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, 170–181.
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*. In *Universidad Nacional de Colombia* (Vol. 9, Issue 19). http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf
- Pérez, C. (2016). *Nativas Como Una Contribución Para La Conservación Ex Situ Contribution To Ex Situ Conservation*. 16(3), 1–14.
- Pérez, M. (2007). Revista de la Facultad de Agronomía. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 24(1), 113–132. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0378-78182005000400004lng=esnrm=isotlng=es%0Ahttp://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0378-78182007000100008
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores, Madrid, Espanha: Ed.*
- Rahmawati, A. S., y Dewi, R. P. (2020). View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk. *PENGARUH PENGGUNAAN PASTA LABU KUNING (Cucurbita Moschata) UNTUK SUBSTITUSI TEPUNG TERIGU DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG ANGKAK DALAM PEMBUATAN MIE KERING*, 274–282.
- Reuni, X. X. I., Veracruz, A., y Doctoral, P. (2008). *Rescate y multiplicación de las orquídeas*. 524–535.
- Rivero. (2012). *Ingeniero en biotecnología*.
- Roca, W. (2000). *Principios Básicos, Metodologías y Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales* (Roca y Mroginski y L. A. (eds.); p. xii, 97). Cali, Colombia.
- Rodríguez Beraud, M. M., Iatsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., y Astorga Brevis, P. K. (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>
- Rodríguez, M., Vargas-Araujo, J., Villegas-Torres, Ó. G., López-Martínez, V., Guillen-Sánchez, D., y Alia-Tejacal, I. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *cattleya* (*brassolaeliocattleya*) *in vitro*. *Interciencia*, 40(8), 549–553.
- Ruíz, B. C., Laguna, C. a., Iglesias, a. L. G., Damon, a., Marín, H. T. N. J., Azpíroz, R. H. S., y Moreno, M. J. L. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula*

- (La Llave y Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton*, 77(964), 203–215.
- Sánchez Macías, A. E. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí. *Revista Iberoamericana Ambiente y Sustentabilidad*, 1(1), 54–64. <https://doi.org/10.46380/riar.v1i1.20>
- Saravia, et al. (2008). *Cultivo de los microorganismos. Medios de cultivos. Métodos básicos de cultivo de las bacterias, mohos, levaduras, rickettsias, clamidias y virus.*
- Selecció, T. Y., Compuestos, T. D. E., y El, E. N. (2006). *5.1 tipos y selecció.* 1–9.
- Shim, H., Shin, N., Stern, A., Aharon, S., Binyamin, T., Karmi, A., Rotem, D., Etgar, L., Porath, D., Pradhan, B., Kumar, G. S., Sain, S., Dalui, A., Ghorai, U. K., Pradhan, S. K., Acharya, S., Quan, L. N., Rand, B. P., Friend, R. H., Gmbh, Z. (2018). Desarrollo investigativo de caracter organico de Cattleya. *Advanced Optical Materials*, 10(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.101.089902>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.009>
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05514-9>
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13856-1>
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-14365-2>
- Suárez Padrón, I. E. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. In *Fondo editorial, Universidad de Cordoba.*
- Universidad Nacional de La Plata. (2019). Tp N° 1 : Medios De Cultivo. *Universidad Nacional de La Plata.*
- Universitat de Lleida. (1946). *Knudson (1946) El primer medio conocido es el adecuado para de orquídeas . Bastante pobre en sales.* 76304.
- Vico Montañez. (2017). *Factores abióticos que afectan la biosíntesis de ácido indolacético en bacterias endófitas de maíz.*

11. Anexos

Anexo 1. Recolección de cápsulas de *Cattleya maxima* Lindl., en una colección de germoplasma en el orquideario de propiedad del Ing. Marco Vallejo, en la parroquia Malacatos.



A) Orquideario del Ing. Vallejo, **B)** Colecta de cápsulas bajo supervisión del Ing. Vallejo, **C)** Etiquetado de cápsulas para ingreso a laboratorio, **D)** Cápsulas dentro del desecador para control de secado después de desinfección.

Anexo 2. Datos recolectados de porcentajes de contaminación del ensayo en el primer objetivo implementado.

Porcentaje de contaminación				
Tratamientos				
Días de evaluación	T0 0 g L⁻¹	T1 20 g L⁻¹	T 2 30 g L⁻¹	T3 40 g L⁻¹
1	0	0	0	0
5	3,33	7,78	3,33	3,33
9	5,56	7,78	5,56	3,33
13	5,56	8,89	5,56	10,00
17	6,67	8,89	6,67	10,00
21	6,67	8,89	8,89	10,00
25	5,56	8,89	11,11	11,11
29	5,56	8,89	11,11	10,00
33	5,56	8,89	11,11	10,00
37	5,56	8,89	11,11	10,00
41	5,56	8,89	11,11	10,00
45	5,56	11,11	11,11	10,00
49	5,56	11,11	11,11	10,00
53	5,56	11,11	11,11	10,00
57	5,56	11,11	11,11	11,11
61	5,56	11,11	11,11	11,11
65	5,56	11,11	11,11	11,11
69	5,56	11,11	11,11	11,11
73	5,56	11,11	11,11	11,11
77	5,56	12,22	11,11	11,11
81	5,56	12,22	11,11	11,11
85	6,00	12,00	11,00	11,00
90	6,00	12,00	11,00	11,00

Anexo 3. Datos recolectados en la variable de germinación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl del ensayo en el primer objetivo implementado.

Porcentaje de contaminación				
Tratamientos				
Días de evaluación	T0 0 g L⁻¹	T1 20 g L⁻¹	T 2 30 g L⁻¹	T3 40 g L⁻¹
5	0,0	0,0	0,0	0,0
9	0,0	0,0	0,0	0,0
13	0,0	0,0	0,0	0,0
17	0,0	0,0	0,0	0,0

21	0,0	13,3	17,8	16,7
25	36,7	22,2	20,0	22,2
29	38,9	22,2	24,4	23,3
33	50,0	47,8	47,8	41,1
37	55,6	55,6	50,0	48,9
41	57,8	56,7	51,1	48,9
45	57,8	56,7	51,1	48,9
49	61,1	62,2	56,7	48,9
53	61,1	63,3	57,8	48,9
57	68,9	67,8	58,9	60,0
61	70,0	73,3	61,1	65,6
65	74,4	73,3	62,2	65,6
69	74,4	73,3	63,3	65,6
73	83,3	74,4	65,6	66,7
77	87,8	77,8	70,0	67,8
81	87,8	80,0	70,0	72,2
85	90,0	86,7	73,3	72,2
90	91,1	86,7	75,6	74,4

Anexo 4. Prueba de Kruskal Wallis (alfa=0.05), entre fotoperiodo y oscuridad bajo distintas combinaciones hormonales de auxina-citoquinina.

Luminosidad	Variable	n	Medias	D.E.	H	p
Fotoperiodo	Mortalidad	24	0,13	0,45	0,86	0,151
Oscuridad		24	0,25	0,44		
Fotoperiodo	Fenolización	24	2,46	1,64	0,18	0,666
Oscuridad		24	2,67	1,43		
Fotoperiodo	Contaminación	24	0,08	0,41	6,17	0,001
Oscuridad		24	1,04	1,30		
Fotoperiodo	Callos	24	74,13	23,0	0,51	0,477
Oscuridad		24	68,46	23,6		
Fotoperiodo	Brotos	24	9,92	4,48	34,05	0,000
Oscuridad		24	31,54	6,67		

n= Número de muestra; D.E= Desviación estándar; H= Valor de aplicación de prueba de Kruskal Wallis ; p= Valor de probabilidad; Alfa= 0,05

Anexo 5. Certificado de traducción



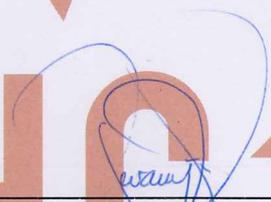
Loja, 01 de diciembre del 2022

CERTIFICADO DE TRADUCCIÓN

A quien corresponda,

Yo, José Geovanny Jiménez Balcázar, traductor oficial del The Canadian House Center, instituto privado especializado en la enseñanza del inglés como lengua extranjera y centro de traducción autorizado y acreditado por el Consejo Nacional de la Judicatura del Ecuador bajo la licencia profesional número 12282677, certifico que el resumen de tesis titulada **"Influencia de la sacarosa en la germinación in vitro de semillas e inducción de estructuras callogénicas, a partir de vitroplantas de Cattleya maxima Lindl"**., realizada por *Ana Cristina Robles Lara* portadora de la cédula de identidad ecuatoriana 1106081118, ha sido traducido de buena fe del español al inglés en la institución antes mencionada, y es una traducción fiel y exacta del documento original según mi leal saber y entender.

La portadora puede hacer uso de este certificado y del documento traducido para cualquier fin legal que consideren oportuno.


Lic. José Geovanny Jiménez Balcázar
TRADUCTOR OFICIAL
THE CANADIAN HOUSE CENTER
Email: chcloja@gmail.com
Tel: +593 (0)7 258 4334

