



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**TEMA: Inducción hormonal (BAP-ANA) de brotes en
plantines *in vitro* de Phalaenopsis bajo dos espectros
de luz y dos concentraciones de Murashige Skoog**

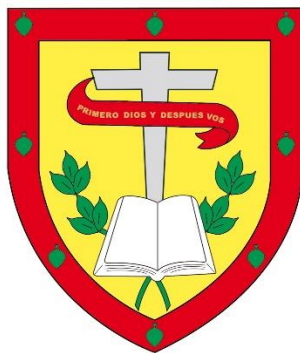
**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

AUTOR: CINTYA KARINA ENCALADA RHEA

DIRECTOR: JUAN CARLOS GONZALEZ ROJAS

CUENCA - ECUADOR

2022



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA: Inducción hormonal (BAP-ANA) de brotes en plantines *in vitro* de *Phalaenopsis* bajo dos espectros de luz y dos concentraciones de Murashige Skoog

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

AUTOR: CINTYA KARINA ENCALADA RHEA

DIRECTOR: JUAN CARLOS GONZALEZ ROJAS

CUENCA - ECUADOR

2022

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Cintya Karina Encalada Rhea portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105127484**. Declaro ser el autor de la obra: “**Inducción hormonal (BAP-ANA) de brotes en plantines in vitro de Phalaenopsis bajo dos espectros de luz y dos concentraciones de Murashige Skoog**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **20 de abril de 2022**

F: 

Cintya Karina Encalada Rhea

C.I. 0105127484

CERTIFICACIÓN

www.ucacue.edu.ec

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por **Cintya Karina Encalada Rhea**, bajo mi supervisión.



Juan Carlos González Rojas

DIRECTOR

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado primeramente a Dios y a la Virgen que han guiado mi camino y me han permitido salir adelante.

A mis padres Orlando Encalada y Rosario Rhea, que me enseñaron valores, principios y determinación, quienes han velado por mi preparación académica y son mi soporte a lo largo de la vida.

A mi madre Rosa Encalada y su esposo Luis Corrales porque gracias a su apoyo incondicional, palabras de aliento y consejos, me supieron motivar para cumplir cada una de mis metas.

A mi querido hermano Orlando que desde el cielo me acompaña y cuida, quien está presente en cada momento de mi vida y a mi sobrina Daniela por su cariño.

A mis hermanos Saúl, David y Adrián, que, con su cariño, amor y comprensión, me han acompañado y motivado para ser una mujer de bien.

A mi esposo Luis Guamán gracias a su amor, cariño y comprensión, me apoya en cada una de mis metas y ayuda día a día a ser mejor persona.

A mi hermano Diego su esposa Mónica y mis sobrinos Anahí, Matías y Dieguito por su apoyo y cariño.

A mis maestros, compañeros y amigos que con sus palabras de aliento me motivaron a lo largo de este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más sincero a mi director de tesis y maestro Juan Carlos González por su asesoramiento, por sus valiosas aportaciones, por su perseverancia, motivación, responsabilidad, por ser una persona exigente que ha sido de fundamental importancia para el desarrollo de esta investigación y en mi formación como investigadora.

También quiero agradecer de manera especial a Lourdes Reinoso por sus enseñanzas y paciencia que han permitido el desarrollo de esta investigación.

Al director de Carrera ingeniero Jacinto Vázquez por su apoyo y consejos

Un agradecimiento especial a la Universidad Católica de Cuenca, mi alma mater, especialmente a la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, ya que me han formado para ser una buena profesional.

Al Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología de la Universidad Católica de Cuenca por permitirme realizar esta investigación en el laboratorio de Principios Activos y Seguridad Alimentaria.

Y a todas las personas que de una u otra manera ayudaron al desarrollo de mi trabajo de titulación, les doy mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	II
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDO	V
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE CUADROS.....	IX
LISTA DE ANEXOS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	2
1.2. PROBLEMA.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN	3
1.4. OBJETIVOS	4
1.4.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.5. HIPÓTESIS	4
CAPITULO II MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. FAMILIA ORCHIDACEAE	5
2.2. GÉNERO PHALAENOPSIS	6
2.3. GENERALIDADES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	6

2.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ORQUIDEAS	8
2.5. PROBLEMAS EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	9
2.5.1. CONTAMINACIÓN.....	9
2.5.2. FENOLIZACIÓN (OXIDACIÓN).....	9
2.5.3. VITRIFICACIÓN	10
2.6. MEDIOS DE CULTIVO	10
2.7. REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	12
2.7.1. AUXINAS.....	12
2.7.2. CITOQUININAS.....	13
2.8. ORGANOGÉNESIS DIRECTA.....	13
2.9. ESPECTROS DE LUZ.....	14
CAPÍTULO III METODOLOGÍA.....	15
3.1. UBICACIÓN Y ÁREA DE ESTUDIO.....	15
3.2. ESQUEMA DEL ESTUDIO.....	15
3.3. MATERIAL.....	16
3.3.1. MATERIALES Y EQUIPOS	16
3.3.2. MATERIAL VEGETAL	17
3.4. METODOLOGIA	17
3.4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
3.4.1. PREPARACIÓN DE HORMONAS.....	18
3.4.2. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO.....	18

3.4.4. ESPECTROS DE LUZ.....	19
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	20
4.2. INDUCCIÓN DE BROTES.....	22
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
5.1. CONCLUSIONES.....	33
5.2. RECOMENDACIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de los pasos del cultivo in vitro. Fuente: Sharry, Adema, & Abedin (2015).	7
Figura 2: Ubicación del CIITT de la Universidad Católica de Cuenca.	15
Figura 3: Esquema del estudio realizado.	15
Figura 4: Cámaras de incubación, (a) cámara con espectro de luz blanca y (b) cámara con espectro de luz roja-azul.	19
Figura 5: Frascos Contaminados.	20
Figura 6: Contaminación en el cultivo por patógenos (a) <i>Penicillium</i> y (b) <i>Fusarium</i>	21
Figura 7: Tratamientos con presencia de fenolización u oxidación.	21
Figura 8: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b) Dosis de hormonas BAP + ANA, (c) concentración de MS y (d) Espectro de luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.	23
Figura 9: Interacciones entre(a) hormonas BAP+ANA y MS), (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.	24
Figura 10: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b), Dosis de hormonas aplicadas BAP+ANA, (c) Concentración de MS y (d) efecto de la luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.	25
Figura 11: Interacciones entre(a) hormonas BAP+ANA y MS), (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.	26
Figura 12: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b) Dosis de hormonas BAP+ANA (c), Concentración de MS y (d) Espectros de luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.....	27
Figura 13: Interacciones entre(a) hormonas BAP+ANA y MS), (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.	28
Figura 14: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b) Dosis de hormonas BAP+ANA, (c) Concentración de MS y (d) Espectro de luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.	29
Figura 15: Interacciones entre(a) hormonas BAP+ANA y MS), (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.	30
Figura 16: Evolución del número de brotes de plantines de <i>Phalaenopsis</i> de 0 a 9 semanas de proceso.....	31
Figura 17: Tratamientos T1 y T2 que presentaron formación de raíces.	32

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación Taxonómica Fuente: Tirado, Naranjo, & Atehortúa (2005).	6
Cuadro 2: Componentes Minerales del Murashige y Skoog (1962) Fuente: Cseke al et., 2003; Pedroza & Caballero, 2009.	12
Cuadro 3: Materiales, equipos, insumos y reactivos usados en la investigación. Fuente: Propia.	16
Cuadro 4: Factores en estudio para la inducción de brotes. Fuente: Propia.	17
Cuadro 5: Descripción de tratamientos. Fuente: Propia.	18
Cuadro 8: Análisis de varianza para número de brotes a los 21 días de iniciado el proceso (10 de enero de 2022) Fuente: Propia.	22
Cuadro 9: Análisis de varianza para número de brotes a los 35 días (24 de enero de 2022). Fuente: Propia.	24
Cuadro 10: Análisis de varianza para número de brotes a los 49 días 7 de febrero	26
Cuadro 11: Análisis de varianza para número de brotes a los 63 días 21 de febrero. Fuente: Propia.	28

LISTA DE ANEXOS

Figura A 1: Agar-Agar utilizado para la preparación del medio de cultivo.....	40
Figura A 2: Marca comercial de sacarosa para preparación del medio de cultivo.....	40
Figura A 3: Murashige y Skoog sales minerales para preparación del medio de cultivo.	41
Figura A 4: Pesaje de los elementos utilizados para la preparación del medio,	41
Figura A 5: Ácido Clorhídrico.....	42
Figura A 6: Hormonas BAP y ANA.....	42
Figura A 7: Disolución de las hormonas con ácido clorhídrico al 0,5 N.	43
Figura A 8: Hidróxido de sodio 0.5 N.	43
Figura A 9: Frasco que se utilizarón para la colocación del medio de cultivo.	44
Figura A 10: Frascos esterilizados y etiquetados.	44
Figura A 11: Enfriamiento de frascos previos a la etiquetación.	45
Figura A 12: Siembra de plantines in vitro de Phalaenopsis.....	45
Figura A 13: Preparación de materiales para su esterilización.	46
Figura A 14: Plantín con brotes laterales.....	46
Figura A 15: Plantín grueso con brotes entre hojas.....	47
Figura A 16: Plantín con brotes.	47
Figura A 17: Plantín con formación de raíces.....	48
Figura A 18: Plantín con oxidación fenólica.....	48
Figura A 19: Plantín con formación de brotes.....	49
Figura A 20:Matriz usada en la toma de datos de inducción de brotes	50

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar las concentraciones de las hormonas BAP (6-Bencilaminopurina) y ANA (Ácido 1-naftalenacético), espectros de luz y las dosis de Murashige y Skoog (1962), que favorecen el desarrollo de brotes en plantines *in vitro* de Phalaenopsis. Se usaron tres concentraciones de hormonas H1 (BAP 0 mg/l + ANA 0 mg/l), H2 (BAP 3 mg/l + ANA 0,5 mg/l) y H3 (BAP 6 mg/l + ANA 0,5 mg/l); se probaron dos tipos de espectro de luz LB (luz blanca) y LAR (luz azul-roja); acompañadas de dos dosis Murashige y Skoog (MS al 100% y MS al 50%). Se obtuvieron 12 tratamientos los cuales fueron evaluados a partir de los 15 días de su siembra y monitoreados cada 8 días en un período de 2 meses. Los resultados obtenidos en la investigación muestran que los tratamientos (T3, T4, T5, T6, T9, T10, T11 y T12) con reguladores de crecimiento presentaron inducción de brotes en plantines de Phalaenopsis comparados con los tratamientos que no tuvieron reguladores de crecimiento que no presentaron inducción de brotes (T1, T2, T7 y T8). La combinación de reguladores de crecimiento BAP 6mg/l + ANA 0,5 mg/l presentaron mayor número de brotes. En cuanto al medio de cultivo Murashige y Skoog no presentaron diferencia significativa en la inducción de plantines. El espectro de luz blanca tuvo una diferencia significativa en la inducción de brotes comparada con el espectro de luz roja-azul.

Palabras clave: Ácido naftalénacético (ANA); bencil aminopurina (BAP); inducción de brotes *in vitro*; Phalaenopsis.

Abstract

The objective of the study was to evaluate the concentrations of the hormones BAP (6-Benzylaminopurine) and NAA (1-naphthaleneacetic acid), light spectra and the doses of Murashige and Skoog (1962), which favor shoot development in *Phalaenopsis* seedlings in vitro. Three concentrations of hormones H1 (BAP 0 mg/l + NAA 0 mg/l), H2 (BAP 3 mg/l + NAA 0.5 mg/l) and H3 (BAP 6 mg/l + NAA 0.5 mg/l) were used; two types of light spectra WL (white light) and BRL (blue-red light) were tested; accompanied by two Murashige and Skoog doses (100% MS and 50% MS). Twelve treatments were obtained, evaluated 15 days after planting, and monitored every eight days for two months. The results obtained in the research show that the treatments (T3, T4, T5, T6, T9, T10, T11, and T12) with growth regulators presented shoot induction in *Phalaenopsis* seedlings compared to the treatments that did not have growth regulators and that did not present shoot induction (T1, T2, T7 and T8). The combination of growth regulators BAP 6mg/l + NAA 0.5 mg/l showed more sprouts. As for the culture media, Murashige and Skoog showed no significant difference in seedling induction. The white light spectrum significantly differed in shoot induction compared to the red-blue light spectrum.

Keywords: Naphthaleneacetic acid (NAA); benzyl aminopurine (BAP); in vitro bud induction; *Phalaenopsis*.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae que fue descubierta hace miles de años, tiene un gran valor para el ser humano, por sus diversas utilidades; mayoritariamente como ornamental por el aroma, duración, forma y colorido de sus flores, además de sus propiedades medicinales y culinarias (Emeterio et al, 2016; Frausto et al, 2019).

Las orquídeas representan la familia con mayor número de especies vegetales en el mundo con alrededor de 27.000 especies. Ecuador se encuentra como uno de los hábitats con mayor número de especies de orquídeas en América Latina (Gil et al, 2019); estas han desarrollado nuevos patrones de crecimiento para adaptarse a diversos medios, encontrándose en mayor número en los trópicos (Ordóñez, 2016).

Dentro de las orquídeas el género *Phalaenopsis* tiene gran demanda comercial alrededor del mundo por su vistosidad y duración de las flores, sin embargo, este género es de difícil reproducción natural, puesto que no se pueden obtener individuos uniformes, razón por la cual se realiza investigación de nuevas técnicas mediante propagación *in vitro* para reproducirla masivamente y obtener individuos con cierto nivel de uniformidad (Zahara, Datta, Boonkorkeaw, & Mishra, 2017).

El cultivo *in vitro* se basa en la capacidad de las células para regenerar una planta idéntica a la planta madre, en esta técnica se parte de pequeñas porciones u órganos denominados explantes, los cuales deben pasar por un proceso de desinfección para prevenir contaminación, en este tipo de cultivo se trabaja en condiciones asépticas, en frascos con medio de cultivo, suplementado con reguladores de crecimiento, bajo condiciones adecuadas y controladas (Perea, 2009).

Los reguladores de crecimiento hormonales como las auxinas y citoquininas tienen gran importancia en el cultivo *in vitro*, la concentración de hormonas dependerá siempre de la especie o el tejido que se va a trabajar, generalmente las auxinas promueven la formación de raíces y las citoquinas la inducción de brotes (Cob et al, 2016). Además la combinación de estas interviene en el desarrollo de callos y regeneración de órganos (Martín, Chong, & Pérez, 2015).

El medio de cultivo es uno de los factores que intervienen en la morfogénesis de los tejidos y el crecimiento, básicamente el medio de cultivo tiene un conjunto de componentes como macronutrientes, micronutrientes, aminoácidos, azúcares y vitaminas, además de agentes gelificantes; el tipo de medio de cultivo varía dependiendo del tipo de especie a trabajar (Sharry, Adema & Abedini, 2015). Murashige y Skoog es uno de los medios de cultivo, más usados para la propagación de tejidos *in vitro*, debido a que se trabaja con múltiples concentraciones, dependiendo de los requerimientos de la especie a propagar (Abdelnour & Esacalant, 1994; Allende et al. 2013; Araya, Gómez, Hidalgo, & Valverde, 2000; Chen et al. 2020).

La luz es un factor que afecta al desarrollo vegetal, los factores como la calidad e intensidad promueven respuestas fisiológicas del cultivo, los distintos espectros de luz tienen diversos efectos sobre los cultivos *in vitro*, así la luz blanca interviene en el vigor de las plantas e intensidad del color verde, mientras que la luz roja y azul intervienen en la formación de raíces (Murillo et al, 2016).

Este trabajo se plantea como objetivo principal la inducción hormonal (BAP-ANA) de brotes en plantines *in vitro* de *Phalaenopsis* bajo dos espectros de luz y dos concentraciones de Murashige Skoog.

1.1. ANTECEDENTES

Las orquídeas se cultivan en China y Japón por más de 25 siglos y desde entonces diferentes culturas han adquirido gusto y apreciación por esta especie, estas se encuentran distribuidas por todos los continentes en su mayoría en regiones tropicales (Sedano, Manzo, Roldán, & Castellanos, 2015). En Ecuador se encuentran cerca de 4000 especies de la familia Orchidaceae y el 40% son endémicas (González & Cueva, 2014).

El género *Phalaenopsis* se encuentra entre las orquídeas más comercializadas del mundo, por longevidad y belleza de sus flores (Colombo, Favetta, & Tadeu, 2012; Salazar Mercado, Amaya Nieto, & Barrientos Rey, 2013). Ecuador en el año 2019 ingresó 1'939.403,57 dólares por concepto de exportación de orquídeas (OTCA, 2021).

Según Griesbach (2002) en su estudio "Desarrollo de orquídeas *Phalaenopsis* para el mercado masivo" estableció que, originariamente los clones de *Phalaenopsis* eran enviados desde Japón a Estados Unidos y de ahí se enviaban a China para su reproducción masiva *in vitro*, después se enviaban las plántulas *in vitro* a los países bajos para su producción y las plantas con flores se las enviaba nuevamente a Estados Unidos para la venta, actualmente la tendencia de producción sigue un patrón de triangulación similar.

El cultivo *in vitro* es una técnica de propagación donde se toman pequeñas partes de una planta y se les da las condiciones necesarias para la regeneración y formación de un nuevo individuo idéntico a la planta madre. La técnica tiene gran importancia gracias a su utilidad para propagar y conservar especies que presentan problemas de reproducción; en este sentido algunos factores que debemos considerar son las fuentes de posibles puntos de crecimiento, los constituyentes nutricionales orgánicos e inorgánicos, además de la temperatura, luz y pH (Abdelnour & Esacalant, 1994; Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

Las orquídeas *Phalaenopsis* son monopodiales, esto hace que la reproducción masiva sea limitada, esto ha generado que se investiguen nuevas técnicas de reproducción, sin embargo, varían de acuerdo con la variedad de *Phalaenopsis* (Zahara, Datta, Boonkorkaew, & Mishra, 2017).

Salazar, Amaya & Barrietos (2013) establecen en su estudio "Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae)" que el medio de cultivo más eficiente en el desarrollo de esta orquídea es Murashige y Skoog.

Otro factor de gran importancia en el cultivo *in vitro* es la luz, ya que interviene en el desarrollo vegetal y promueve diferentes respuestas fisiológicas. La calidad, intensidad y duración de la luz son factores que se deben tomar en cuenta dentro del cultivo *in vitro* (Murillo et al, 2016).

1.2. PROBLEMA

Las orquídeas son consideradas una de las familias más grandes del reino vegetal y calificadas como raras y de difícil reproducción (Díaz, 2013). Debido a que las orquídeas son exógamas y su propagación da como resultado plantas heterocigotas, se buscan emplear técnicas de reproducción de partes vegetativas para producir plantas uniformes (Chugh, Guha & Rao, 2009).

Según Salgado & Peñaranda (2019) muchas variedades de orquídeas se encuentran en peligro de extinción por la extracción masiva debida a su interés ornamental y además por la destrucción de su hábitat.

Las orquídeas del género *Phalaenopsis* tienen resultados negativos con la reproducción sexual, ya que de esta manera no se obtienen plántulas uniformes y tardan muchos años en florecer, motivo por el cual se buscan alternativas a través de la propagación de tejidos *in vitro* (Salazar, Amaya, & Barrientos, 2013; Zahara et al, 2017).

1.3. JUSTIFICACIÓN

Las orquídeas del género *Phalaenopsis* tienen flores atractivas y una gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, esto hace que tengan una gran importancia a nivel mundial como flor de corte (Salazar, Amaya & Barrientos, 2013).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han permitido conservar varias especies a partir de un ejemplar, en el caso de la *Phalaenopsis* se buscan nuevas técnicas para conservar las características morfológicas deseadas y evitar la alta variabilidad genética por esta razón se prueban nuevas técnicas como la inducción de brotes en plantines (Tirado, Naranjo, & Atehortúa, 2005).

La obtención de plántulas de calidad en condiciones *in vitro* asegura la supervivencia ex vitro bajo ciertas condiciones como el estado de crecimiento y número de brotes, además del área foliar y sistema radicular (Lucía, Namur, Bollati, & Arce, 2010).

Diferentes estudios se han realizado en ramilletes florales, hojas, tallos y raíces, teniendo resultados positivos en la propagación de *Phalaenopsis*, además las citoquinas y auxinas han demostrado potenciar el desarrollo de brotes (Lucía, Namur, Bollati & Arce, 2010; Colombo, Favetta & Tadeu, 2012; Frausto Jaime et al, 2019; Gil et al, 2019).

Fundamentado en lo anteriormente indicado se plantea la técnica de inducción de brotes en plantines *in vitro* de *Phalaenopsis* interviniendo diferentes dosis de hormona, concentraciones de Murashige y Skoog y espectros de luz.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los factores que inducen la brotación en plantines *in vitro* de Phalaenopsis.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Explorar las concentraciones de BAP y ANA que favorecen la inducción de brotes.
- ❖ Establecer el espectro de luz que genera un mayor desarrollo.
- ❖ Evaluar soluciones de Murashige-Skoog (MS) en el crecimiento de plantines.

1.5. HIPÓTESIS

Al menos una dosis de hormona, un espectro de luz y una concentración de Murashige Skoog fomentan el desarrollo de brotes en cultivo *in vitro* de Phalaenopsis.

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1. FAMILIA ORCHIDACEAE

La familia Orchidaceae es un grupo morfológico muy diverso y que debido a la extensa gama de formas y colores de sus flores adquirió un gran valor comercial (Frausto et al, 2019). Comprende entre 25,000 a 30,000 especies repartidas en el planeta, el cultivo de estas depende de factores cómo temperatura, sustrato, riego y fertilización (Díaz, 2013). El interés por las orquídeas también recae en un contexto medicinal, alimenticio, cosmético, además socio cultural y religioso (Ávila & Salgado, 2006).

La alta demanda comercial ha provocado el tráfico ilegal de estas plantas, es decir son extraídas de su hábitat natural de manera no sustentable, llevando a algunas especies al borde de la extinción (Ávila & Salgado, 2006; Tejeda, Téllez, & Trejo, 2017); otro factor que amenaza a las orquídeas es la deforestación a gran escala (Nauray, 2013).

Las orquídeas botánicamente son angiospermas monocotiledóneas que se han especializado para desarrollarse sobre diversos sustratos así pueden ser epífitas, litófilas y terrestres (Duarte, Gómez, & Monsalve, 2015). Presentan dos hábitos de crecimiento de sus tallos, sympodiales (formas de crecimiento laterales) o monopoidales (a partir de un solo punto), y cuando estos exhiben engrosamiento se los conoce como pseudobulbos, almacenando agua y nutrientes (Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2021)

Las semillas de orquídeas son de tamaño muy reducido, estas son reconocidas como semillas de polvo ya que un fruto puede contener hasta 2 millones, básicamente contienen el embrión sin sustancias de reserva, siendo su germinación exitosa en la naturaleza gracias a una relación simbiótica con hongos micorrízicos, en todo caso este proceso puede llegar a ser muy demorado hasta conseguir individuos adultos y en bajo número; siendo una alternativa para mejorar la eficiencia de este proceso la técnica de cultivo *in vitro* (McKendrick, 2000; Nauray, 2013; Sedano, Manzo, Roldán, & Castellanos, 2015).

Están distribuidas en distintas regiones del planeta en diversos hábitats con mayor representación en los trópicos. Son plantas que han evolucionado en el contexto de sus flores hasta incluso adquirir formas y aromas especiales para atraer a un polinizador específico. (Arditti, 1980; Díaz, 2013; Muñoz, 2014).

Alrededor del 70% de las especies de la familia Orchidaceae son epífitas, es decir cuentan con raíces carnosas y largas capaces de absorber agua y nutrientes del aire y troncos de árboles sin ser plantas parásitas (Costa et al, 2017).

En el caso de América del Sur, Colombia y Ecuador comparten alrededor de 9000 especies de orquídeas, es decir tienen la riqueza más grande del mundo referente a esta familia, pero alrededor de 3000 se encuentran en peligro de extinción debido a la deforestación de los bosques andinos (Téllez, Escobar, & Tejeda, 2017).

Ecuador es uno de los 17 países con mayor diversidad en el mundo, debido a sus características climáticas y topográficas (Corral et al. 2017); de las 4032 especies de orquídeas descritas en territorio ecuatoriano la distribución de especies endémicas es de 295 en la Costa, 1207 en la Sierra y 315 en la Amazonia (Endara, Williams, & León, 2009; Jiménez, 2014).

2.2. GÉNERO PHALAEENOPSIS

El género *Phalaenopsis* conocido como orquídea Mariposa, es considerada importante para los floricultores del mundo, por la forma de sus flores y fascinantes colores, además de su tolerancia al estrés biótico y abiótico (Hong & Wen, 2007).

La *Phalaenopsis* es una orquídea epífita (Freuler, 2006), que tiene su origen en el sudeste asiático y tiene la particularidad de desarrollarse tanto en ambientes templados a grandes altitudes como en climas cálidos a nivel del mar (Frausto et al, 2019); esto permite su amplia distribución geográfica (Díaz, 2013).

Además, este género es reconocido por tener una gran demanda comercial, siendo muy pocos los países que en conjunto cubren la demanda global de este género de orquídea. Pues deben contar con las condiciones de clima y recursos tecnológicos para un cultivo *in vitro*, ya que la propagación natural de *Phalaenopsis* requiere mucho tiempo y no asegura las características de la especie (Frausto et al, 2019).

Este género de orquídeas no tiene pseudobulbos, si raíces carnosas y largas que surgen sobre el tallo y bajo las hojas que se forman bajo el extremo apical, las cuales son gruesas y cumplen con la función de realizar fotosíntesis y de reserva, los tallos florales nacen de las axilas de las hojas, en forma de racimos (Freuler, 2006; Colombo, Favetta, & Tadeu, 2012). Díaz (2013) establece que las orquídeas epífitas como *Phalaenopsis* no deben recibir luz solar directamente en sus hojas, sin embargo, es un factor que influye en la producción de nutrientes y azúcares necesarios para la floración.

La clasificación taxonómica de *Phalaenopsis* se presenta en el cuadro 1:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Liliidae
Orden:	Asparagales
Familia:	Orchidaceae
Subfamilia:	Epidendroideae
Tribu:	Vandeae
Subtribu:	Sarcanthinae
Alianza:	<i>Phalaenopsis</i>
Género:	<i>Phalaenopsis</i>

Cuadro 1: Clasificación Taxonómica Fuente: Tirado, Naranjo, & Atehortúa (2005).

2.3. GENERALIDADES DEL CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* es un método usado en biotecnología vegetal que permite la propagación de plantas, esta técnica se está usando ampliamente en plantas ornamentales con gran interés comercial, sobre todo las de difícil propagación natural (Rojas, Garcia, & Alarcón, 2004). Una de sus ramas se fundamenta en la clonación con el fin de conseguir individuos idénticos a la planta madre y obtener mayor número de plantas en espacios reducidos (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

Se describe el cultivo *in vitro* como una técnica donde se reproducen plantas dentro de frascos de vidrio o contenedores especiales, proporcionándoles un ambiente artificial adecuado que influirá en el desarrollo de los explantes. El cultivo *in vitro* comprende los pasos detallados en la figura 1 (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

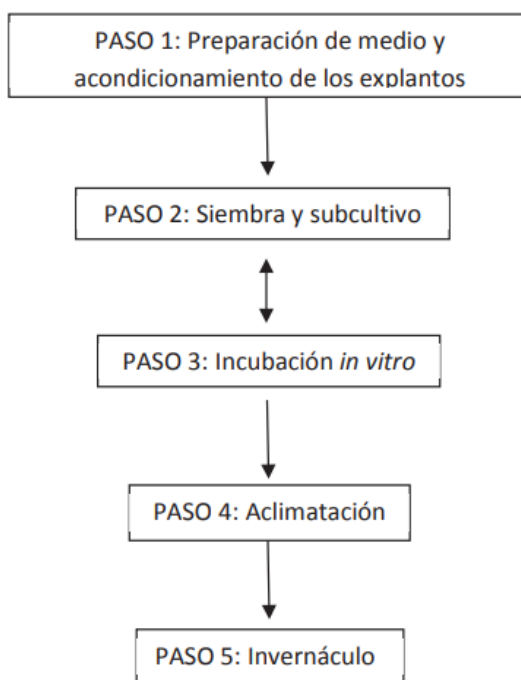


Figura 1: Esquema de los pasos del cultivo *in vitro*. Fuente: Sharry, Adema, & Abedin (2015).

El cultivo de tejidos permite altas tasas de multiplicación en ambientes asépticos y obtención de plantas libres de patógenos, este tipo de cultivo permite trabajar en espacios reducidos con disminución en costos de la mano de obra (González, 2013), y es una herramienta usada para recuperar especies o genotipos en peligro de extinción y que tengan alta demanda comercial (Tirado, Naranjo, & Atehortúa, 2005).

Los explantes son pequeñas porciones de la planta sean hojas, tallos, varas florales o raíces, los cuales pueden originar una planta genéticamente igual a la madre, estas pueden ser cultivadas en medios sólidos o líquidos bajo ciertos requerimientos nutricionales y hormonales (Perea, 2009). Estos pueden tener organismos contaminadores en su superficie e interior, en la superficie se puede eliminar por desinfección, sin embargo los agentes contaminadores interiores son difíciles de eliminar, en este caso se pueden utilizar fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo para obtener tejidos libres de contaminación (Roca & Mroginski, 1991; Azofeifa, 2009).

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos están conformados por macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, reguladores de crecimiento y gelificantes, estos contribuyen de manera fundamental al desarrollo de los explantes (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

2.4. CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUIDEAS

Se han reproducido distintos tipos de orquídeas a través de la técnica de cultivo *in vitro* (Flores, Robledo, & Jimarez, 2017). La calidad de los explantes dependerán de las plantas donadoras, y que redundará en el desarrollo del cultivo *in vitro* (Frausto et al, 2019).

La reproducción natural del género *Phalaenopsis* es complicada y se necesita mucho tiempo, por esta razón la reproducción *in vitro* es una de las mejores alternativas para obtener un mayor número de ejemplares (Salazar, Amaya, & Barrientos, 2013).

La aplicación de cultivo *in vitro* permite la propagación masiva de orquídeas en un ambiente aséptico, libre de bacterias y hongos, también la obtención de plantas libres de virus (Pedraza, 2017).

En el cultivo *in vitro* se trata de reproducir o controlar las condiciones del ambiente como la temperatura, luz y pH, es decir se trata de controlar el ambiente físico y químico en el que se situará el explante (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

Una de las principales razones para la reproducción *in vitro* de orquídeas es la obtención de clones somáticos con características uniformes, esta técnica permite disminuir el tiempo de regeneración e incrementar poblaciones para el comercio o restauración ambiental (Frausto Jaime et al, 2019)

Zahara et al., (2017) en el estudio “Los efectos de diferentes medios, concentraciones de sacarosa y aditivos naturales en el crecimiento de plántulas de *Phalaenopsis Hybrid 'Pink'* “ en el cual utilizaron dos medios (Murashige y Skoog [MS] y Vacin y Went [VW]) suplementados con 0, 10, 20, 30 y 40 g L⁻¹ de sacarosa al 0, 10 y 20 % (v/v) agua de coco (CW) o jugo de zanahoria (CJ) como aditivos naturales, obtuvieron como resultado que la combinación de sacarosa (20 g L⁻¹) y CJ (10 %) suplementando a medios MS o VW puede usarse para el crecimiento de plántulas de esta especie.

Salgado & Peñaranda (2019) en su trabajo de “Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción *in vitro* de orquídeas” que se enfocó en el desarrollo de un medio versátil con Murashige y Skoog, vitaminas Morel, agua de coco y carbón, con el fin de inducir callo, proliferación de estructuras tipo protocormos, desarrollo y mantenimiento de plántulas; los resultados muestran que las modificaciones realizadas de Murashige y Skoog (MS), permiten disminuir en 10% los costos.

Frausto et al. (2019) en su publicación “Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis spp. (Blume) in vitro*” evaluó concentraciones de sales minerales entre ellas MS al 100% y al 50%, también utilizaron reguladores de crecimiento como BAP 20.2 µM y ANA 5.37 µM, donde el mejor resultado fue la combinación de BAP y ANA para la inducción de brotes, y MS al 50% se presenta como una opción viable para las yemas florales.

Mohammadi et al. (2021) declara en “Inducción de poliploidía in vivo de *Phalaenopsis amabilis* en un sistema de biorreactor de burbujas usando colchicina” que al reproducir *in vitro* ejemplares de *Phalaenopsis* utilizando como medio Murashige y Skoog con 0,20 mg L⁻¹ de IBA, acompañado de 2,00 mg L⁻¹ de kinetina y 1,00 g L⁻¹ de carbón activado, durante un período de cinco meses y posterior su adaptación al medio, con resultados alentadores.

Las técnicas de cultivo *in vitro* contribuyen a la conservación de recursos genéticos en orquídeas, el desarrollo de protocolos de propagación vegetativa es valioso para programas de mejoramiento genético, estas técnicas facilitan ejecución de estudios moleculares y genéticos con el fin de conocer factores que afectan al desarrollo de esas especies en su hábitat natural (Pedraza, 2017).

Son ventajas del cultivo *in vitro* la obtención masiva de plantas a bajos costos y tiempos reducidos, ahorro de espacio, mayor manejo de sanidad del cultivo, facilidad de transportar, obtener varios clones a partir de un solo individuo y la conservación de germoplasma (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016). Diversos estudios determinan la viabilidad del método de inducción de

brotes en *Phalaenopsis*, lo que se ha practicado en diversas especies de orquídeas (Abdelnour & Escalant, 1994; Frausto et al, 2019; Chen et al, 2020)

2.5. PROBLEMAS EN EL CULTIVO *IN VITRO*

2.5.1. CONTAMINACIÓN

Diferentes microorganismos son responsables de la contaminación, cualquier organismo introducido en el medio de cultivo es un contaminante, la principal fuente de contaminación son los microorganismos presentes en el interior o exterior de los explantes, además de las malas prácticas en el laboratorio (Sharry, Adema, & Abedini, 2015). Un factor adicional que tomar en cuenta dentro del cultivo *in vitro* es la edad fisiológica del ejemplar a reproducir, esto nos ayudará a tener menos índice de contaminación y mayor control del cultivo (INIVIT, 2018).

Este problema limita el cultivo *in vitro*, pues los agentes patógenos aprovechan las oportunidades para invadir y competir, la contaminación se debe a la inadecuada desinfección de explantes, precaria manipulación del material vegetal, fallo en la esterilización de los medios de cultivo, deficiente asepsia de los instrumentos, avería o fallo de la cámara de flujo laminar y escasa esterilización de los ambientes en los que se va a trabajar (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

Es importante evitar la contaminación por microorganismos debido a que destruyen el explante, compitiendo con él, afectando su desarrollo y supervivencia (Sanchez & Salaverría, 2004). Se denomina vitro-patógenos a los contaminantes que aparecen en condiciones de *in vitro*, estos causan muerte del tejido y alteran el pH y compiten por los nutrientes, estos modifican al medio de cultivo (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

Los géneros de hongos como *Fusarium spp* y *Penicillium spp* están dentro del grupo de patógenos que ocasionan problemas en el cultivo *in vitro*, ya que se hospedan en semillas y partes vegetativas de las plantas (Alburquerque & Gusqui, 2018). Así, *Fusarium* con cerca de 50 especies identificadas (Duarte et al, 2014), se encuentra infectando el interior de raíz, tallo y hojas (Reyes, Alejo, Ruiz, & Tun, 2012), en tanto que *Penicillium* es un hongo filamentoso oportunista que ingresa por las heridas de la planta, causando pudriciones (Allende et al, 2013).

2.5.2. FENOLIZACIÓN (OXIDACIÓN)

La oxidación se identifica por un oscurecimiento del tejido vegetal que avanza al medio de cultivo, genera daño e inhibición del crecimiento, en situaciones graves necrosis y muerte del tejido (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

Diversos factores pueden desencadenar la fenolización u oxidación como la intensidad de luz, patógenos, lesiones causadas en la desinfección, el volumen y calidad del contenedor, los componentes del medio de cultivo, metales pesados, entre otros (Azofeifa, 2009).

Tirado, Naranjo, & Atehortúa (2005) establecen que la fenolización en el cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis* es un problema común, debido a la liberación de compuestos fenólicos por los tejidos y la consecuente oxidación del medio de cultivo, como recomendación se deben cambiar los medios después de un tiempo.

Se pueden utilizar diferentes métodos para evitar la oxidación entre ellos usar explantes juveniles o con crecimiento activo, disminuir la intensidad de luz, disminuir la temperatura del cultivo, utilizar medio líquido, agregar antioxidantes, disminuir el pH, agregar carbón activo, disminuir el tiempo de esterilización del explante o también utilizar otro agente desinfectante, incrementar sales de calcio y reducir niveles de nitratos (Sanchez & Salaverría, 2004; Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

El uso del carbón activado en el medio de cultivo es una de las alternativas comunes para contrarrestar la oxidación o fenolización, este es un compuesto absorbente que remueve compuestos fenólicos, sustancias tóxicas del medio de cultivo que se liberan en la

esterilización, las cuales causan daño al explante, además remueve sustancias liberadas por el mismo explante (Azofeifa, 2009).

Otras sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína) son utilizadas en cultivos con alto contenido de polifenoles, ya que estos producen oscurecimiento y eventualmente la muerte de los explantes, también se pueden utilizar antioxidantes durante la preparación del explante, otra alternativa sería incubar los cultivos en oscuridad o con bajas intensidades de luz (Roca & Mroginski, 1991; Hernández & Gonzáles, 2010).

2.5.3. VITRIFICACIÓN

Es una reacción en la cual la planta adquiere una apariencia de vidrio, es decir los brotes toman aspecto vítreo y transparente, además presentan desórdenes fisiológicos, anatómicos y morfológicos, este fenómeno se produce por la humedad relativa, potencial del agua que afecta la fotosíntesis y la transpiración, una solución para combatirla es realizar un subcultivo de material sano (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

En si la vitrificación es un conjunto de características físicas que presentan las hojas, tallos y raíces, órganos que se pueden mostrar cristalinos, acuosos, húmedos y traslúcidos. En las hojas alteran la realización de la fotosíntesis e intercambio gaseoso. Estos problemas están directamente ligados a factores nutricionales y dosis elevadas de reguladores de crecimiento (Allende et al, 2013).

Los tejidos vegetales tiernos tienden a ser más susceptibles a la vitrificación, siendo los factores asociados más probables, niveles elevados de citoquininas, deficiente intercambio gaseoso, baja irradiancia lumínica, temperaturas altas, baja concentración de agar y sacarosa (Tirado, Naranjo, & Atehortúa, 2005).

2.6. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son parte fundamental en investigaciones en campos como la microbiología, medicina, agricultura, alimentación e industrias farmacéuticas (Burguet & Castillo, 2013). En el contexto del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales están diseñados con el fin de replicar el sustrato adecuado para el desarrollo de distintas especies, las concentraciones de nutrientes y requerimientos dependerán de la variedad u organismo que se estudie (Gómez & Batista, 2006). Una conveniente composición del medio de cultivo garantizará nutrientes al tejido vegetal (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

El medio de cultivo está integrado por un conjunto de nutrientes y otros compuestos para el desarrollo de diferentes organismos, este rige el crecimiento y morfogénesis de tejidos, además, debe aportar a las células vegetales nutrientes similares a los del suelo, y debe estar compuesto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares y gelificantes (Perea, 2009).

Los macronutrientes son elementos que intervienen en el crecimiento de tejidos vegetales y contribuyen al equilibrio iónico de las plantas estos elementos son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), la concentración óptima de estos nutrientes se rige a la especie en la que se va a trabajar (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

La incorporación de micronutrientes en bajas concentraciones como hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B) y molibdeno (Mo), son importantes para el desarrollo del cultivo vegetal (Perea, 2009).

Carbohidratos, son azúcares usados como fuente de carbono y energía (Sharry, Adema, & Abedini, 2015). Estos son productos de la fotosíntesis y como las plantas que están en cultivo *in vitro* debido a la baja intensidad de luz no pueden fabricar el azúcar que necesitan, se adiciona al medio cultivo (Abdelnour & Esacalant, 1994; Alvarado, Cruz, Portal, Acosta, & Leiva,

2004). La sacarosa actúa como acelerador del crecimiento heterotrófico, puede ser utilizada en un rango de concentraciones (2 % al 12%) dependiendo de la especie (Alvarado et al. 2004)

Las vitaminas estimulan el crecimiento de los tejidos específicos, son utilizadas como catalizadoras en procesos metabólicos, por esta razón se añaden a los medios de cultivo, además la ausencia de estas puede inhibir la organogénesis (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

Las plantas son autótrofas, es decir elaboran su propio alimento y vitaminas, sin embargo, es necesario añadir vitaminas al medio de cultivo hasta que los explantes crezcan y se vuelvan verdes, el ácido ascórbico entre 10 a 100 miligramos por litro, es considerado beneficioso debido a su capacidad como agente reductor y para retrasar la formación de sustancias similares de la melanina (Roca & Mroginski, 1991; Perea, 2009).

El uso de agentes gelificantes en los medios de cultivo dependerá de los requerimientos de la planta, la principal función de estos agentes es agregar un soporte a la plántula. Entre los más reconocidos se encuentran agar agar, phytagel y gelrite (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

Las concentraciones de agentes gelificantes pueden afectar la efectividad de varios cultivos de tejidos y sistemas de cultivos como la micropropagación, la inducción de raíces y el cultivo de protoplastos, por el nivel de dureza del soporte (Roca & Mroginski, 1991; Flores, Robledo, & Jimarez, 2017).

Entre los medios más reconocidos y usados se encuentra Murashige y Skoog (MS), este medio es utilizado ampliamente para los tejidos vegetales, por tener una mayor adaptabilidad a gran número de especies (Ávila & Salgado, 2006; Kumar, y otros, 2015). Es un medio con alta concentración de sales minerales, que es posible utilizarlo es distintas concentraciones con el fin de determinar, la concentración óptima de acuerdo con la variedad de planta y tipo de explante (Alvarado et al, 2004; Burguet & Castillo, 2013; Chugh, Guha, & Rao, 2009; Gutierrez & Gonzales, 2019; Pedroza & Caballero, 2009).

Frausto et al. (2019) establece que el medio MS al 100% es un medio completo y de alta calidad de sales y es sustentable en el crecimiento de ciertos cultivos que requieran altas concentraciones de iones, sin embargo, las orquídeas tienen un requerimiento mineral bajo, por lo que una concentración de MS al 50% muestra mejores resultados y mantiene la viabilidad de los explantes en el caso de Phalaenopsis.

Flores, Robledo, & Jimarez (2017) establecen que la utilización de sales minerales de Murashige y Skoog en concentraciones del 50% y 100% contribuyen a la formación de brotes, hojas y número de raíces.

La composición del medio Murashige y Skoog (1962) se detalla en el cuadro 2.

Formulación de sales de Murashige y Skoog	
Macroelementos	
Compuestos	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	
H ₃ BO ₃	6.2

MnSO ₄ .H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025

Cuadro 2: Componentes Minerales del Murashige y Skoog (1962) Fuente: Cseke et al., 2003; Pedroza & Caballero, 2009.

2.7. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores de crecimiento desempeñan un papel esencial en el desarrollo de las células vegetales durante el cultivo *in vitro*, la concentración y el tipo de reguladores siempre dependerá de la especie en la que se va a investigar su acción (Rivas, Oranday, & Verde, 2016). Podemos definir a los reguladores del crecimiento como sustancias de origen natural y sintético que estimulan el crecimiento, desarrollo y metabolismo de la planta (Perea, 2009).

Si bien el uso de estas fitohormonas puede estimular el crecimiento de órganos, también podrían inhibir el desarrollo de estos, por esta razón es importante estudiar la combinación de estos en distintas concentraciones (Rojas, Garcia, & Alarcón, 2004). Aguirre, Pierre, & Leigue, (2016) consideran que los reguladores de crecimiento deben ser usados en bajas concentraciones, ya que así intervienen positivamente en el desarrollo y metabolismo del vegetal, y en su desarrollo celular.

Los reguladores como las auxinas y citoquininas son importantes para el crecimiento y morfogénesis en el cultivo de órganos y tejidos de las plantas, gracias a estos es posible inducir respuestas morfo-fisiológicas de interés durante un cultivo *in vitro*, la combinación de estos reguladores de crecimiento permite el desarrollo de callos, suspensiones celulares y órganos (Martín, Chong, & Pérez, 2015). Además, la combinación de auxinas y citoquininas estimula la proliferación de células meristemáticas (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

2.7.1. AUXINAS

Las auxinas son ácidos que pueden ser naturales o sintéticos, su estructura deriva del fenol o el indol, las auxinas naturales son el ácido indolacético (AIA) y las sintéticas son el ácido indol butírico (IBA), ácido naftalenacético (ANA) y los derivados del fenoxiacético; estas hormonas activan la elongación de tallos, incrementan la pared celular y estimulan el flujo direccional del floema y xilema (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

Estas tienen la capacidad de producir agrandamiento, alargamiento celular y promueven la división de estas, las más utilizadas son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), ácido α -naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol butírico (AIB) (Roca & Mroginski, 1991; Ávila & Salgado, 2006; Menezes, et al. 2016).

Rivas, Oraday, & Verde (2016) exponen que altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces; sin embargo, otros autores difieren con esta teoría pues especifican que altas concentraciones de auxinas pueden llegar a inhibir el desarrollo del cultivo, ya que estimula la formación de etileno (Uribe et al, 2012; Menezes et al, 2016)

Según Roca & Mroginski (1991) el ácido naftalacético (ANA) es usado en un rango de concentraciones de 1 a 10 mg/l. Sin embargo, en zarzamora *Rubus sp.* se demuestra que la utilización de ANA entre 0,5 a 1 g por litro en combinación con otra auxina o citoquinina es favorable para obtener raíces (Millones & Vásquez, 2020).

Uribe et al. (2012) en su estudio sobre enraizamiento *in vitro* de micro tallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser establece que las auxinas son indispensables para la formación de raíces *in vitro*, en el que se obtuvo 87,5% de enraizamiento con la utilización de 1mg/l IBA y un 75% con 3 mg/l de ANA, pero establecen que la combinación de ANA en concentraciones mayores o iguales que IBA puede ocasionar inhibición del crecimiento de raíces.

2.7.2. CITOQUININAS

Las citoquininas son sustancias que estimulan la división celular, y formación de órganos, desarrollo de yemas laterales, las más utilizadas son: kinetina (KIN) y bencilaminopurina (BAP) (Roca & Mroginski, 1991; Perea, 2009) Altas concentraciones de citocininas promueven la generación de brotes (Rivas, Oranday, & Verde, 2016).

Este grupo reducido de hormonas se divide en naturales y sintéticas, dentro de las naturales encontramos la zeatina N6, el Thidiazuron (TDZ) y el CPPU N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil urea, las citoquininas sintéticas comprenden la quinetina (KIN), N6 Benzylaminopurina (BAP), N6benciladenina (BA), N6 dimetil alil aminopurina (2ip) (Aguirre, Pierre, & Leigue, 2016).

Bencilaminopurina (BAP) es un compuesto muy activo, el cual, acelera el crecimiento, estimula la formación de múltiples brotes a partir de una yema axilar o apical, promueve la absorción de nutrientes como aminoácidos (Roca & Mroginski, 1991; Perea, 2009). En tanto Gutierrez & Gonzales (2019) determinan que el uso de concentraciones elevadas de BAP producen brotes deformes y pequeños e hiperhidratados *Vitis vinífera* L. recomendando bajas concentraciones.

García et al. (2009) exponen que las concentraciones de 3 y 6 miligramos por litro de BAP muestran mayor número de brotes en la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris var. vulgaris* Schrad. ex Wendl, además, destaca que el BAP juega un papel fundamental en la proliferación de plantas en la multiplicación *in vitro*.

Cob et al. (2016) establecen que las concentraciones altas de citoquininas inducen la formación de órganos y orientan puntos de crecimiento, sin embargo, podría causar alteraciones en la longitud de brotes, recomienda el uso de BAP entre los 0,5 mg/l a 3mg/l en producción de *Quillaja saponaria*.

El uso de bajas concentraciones de citoquininas generalmente estimula la producción de tejidos, mientras que concentraciones elevadas la neoformación de yemas sobre callos, además las citoquininas pueden estimular la simplificación del ARN y proteínas, incrementando la producción de enzimas estructurales necesarias para la mitosis (Chamorro et al., 2007).

2.8. ORGANOGÉNESIS DIRECTA

La organogénesis está relacionada a la ruta de la morfogénesis que el explante sigue para convertirse en plántula y una de esas rutas es la organogénesis directa la cual consiste en la regeneración de órganos en un explante de manera directa, donde se pueden obtener brotes, raíces o flores (Rojas, Garcia, & Alarcón, 2004).

Es un método de regeneración que se da a través de un explante en cultivo *in vitro*, esta regeneración de órganos no se realiza a partir del callo, sino se forman directamente desde el explante, con la utilización de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas, además del medio de cultivo adecuado, bajo condiciones apropiadas (Martín, Chong, & Pérez, 2015).

Se pueden tomar distintas partes de las plantas para obtener explantes como ápices, hojas o segmentos de estas, porciones de tallo y meristemas (Perea, 2009). En el caso del género *Phalaenopsis* se han probado explantes de hojas, yemas y flores para regeneración por organogénesis directa en las cuales han estimulado la inducción y formación de brotes (Frausto et al, 2019).

Gil et al, (2019) establecen que la mejor forma de multiplicación de orquídeas es la organogénesis directa, bajo condiciones adecuadas de medio de cultivo y reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas.

2.9. ESPECTROS DE LUZ

Las plantas dependen de diversos factores uno de los más importantes es la luz, ya que es una fuente de energía para la fotosíntesis, además la luz controla el sistema de regulación endógena (genética, enzimática, trófica, hormonal, etc.) (Golovatskaya & Karnachunk, 2015). Parámetros de la luz, como intensidad, calidad y duración intervienen directamente en el desarrollo vegetal (Murillo et al, 2016).

La utilización de cámaras lumínicas proporciona mayor eficiencia en el proceso fotosintético, ya que la luz activa genes que inducen la acetilación, también la luz actúa sobre los explantes favoreciendo un color verde intenso e interviene en su crecimiento, cumple un proceso en el cual la luz a través de fitocromos activa zonas infrarrojas que actúan con mecanismos endógenos, provocando en el explante cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (García et al, 2007).

La luz es captada por las células y tejidos vegetales de esta manera aumenta la capacidad de absorción en las plantas (Golovatskaya & Karnachunk, 2015); también hay que considerar que la luz artificial y natural cuentan con distintas características respecto a la calidad del espectro luminoso (Pérez et al, 2012).

La intervención de distintos tipos de espectros de luz determinará el desarrollo del cultivo *in vitro* (García et al, 2007); el uso de estos influye favorablemente en los cultivos, pero también dependerá del color del espectro que se utilice pues de acuerdo con este causarán distintos efectos en los explantes, por ejemplo, la luz azul estimula un mayor número de brotes, mientras que la luz blanca presenta baja contaminación (Stefanel et al, 2020; Pérez et al, 2012).

Los espectros de luz roja y azul son importantes para el crecimiento de la planta, los fitocromos tienen picos sensibles en la región roja 600 (nm) e infrarroja 730 (nm) esto genera expansión de hojas, elongación del tallo e induce la floración (Paniagua et al, 2015).

Las condiciones de luz son particularmente importantes para el desarrollo del explante (Rodríguez et al, 2011); la reacción a la luz dependerá de la especie y el efecto que se busca, se considera que la luz roja es que puede incrementar el peso fresco y seco de la raíz de las plántulas, y la luz azul aumenta el peso fresco y seco de brotes (Pedraza, 2017).

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. UBICACIÓN Y ÁREA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en el Laboratorio de Principios Activos y Seguridad Alimentaria del Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) de la Universidad Católica de Cuenca, ubicado en la vía a Bibín y calle 25 de marzo, en el cantón Cuenca, provincia del Azuay.

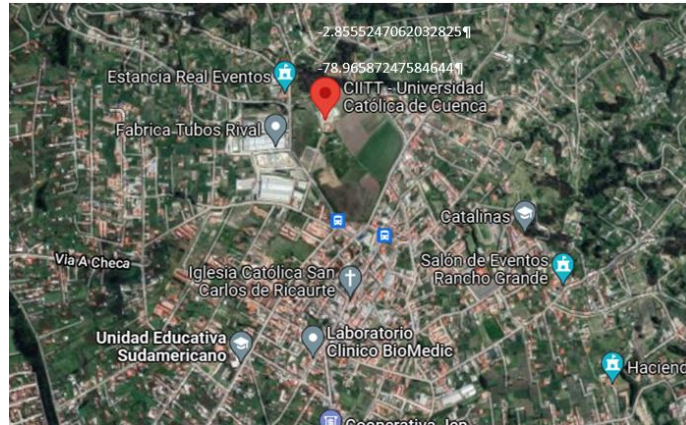


Figura 2: Ubicación del CIITT de la Universidad Católica de Cuenca.

3.2. ESQUEMA DEL ESTUDIO

Un esquema de las actividades realizadas en la investigación se detalla en la figura 3.

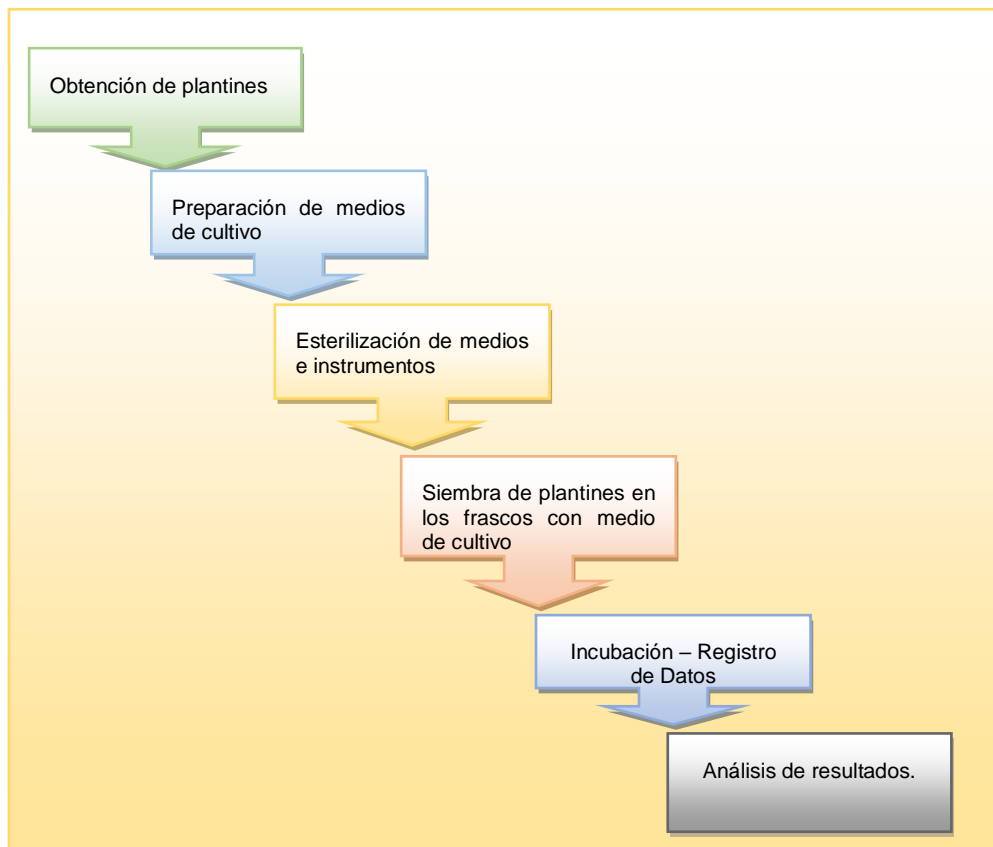


Figura 3: Esquema del estudio realizado.

3.3. MATERIAL

3.3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

Se detallan en el cuadro 3 materiales, equipos, insumos y reactivos utilizados en la investigación.

Actividad	Materiales	Insumos	Reactivos	Equipos
Preparación del medio de cultivo	Papel de etiqueta			
	Marcadores			Cámara de Flujo Laminar
	Vaso precipitación	Agua destilada estéril	Murashige y Skoog (MS)	Balanza de precisión
	Pipetas	Alcohol al 70%	BAP	Microondas
	Agitadores	Ácido Clorhídrico 0,5 N	ANA	Autoclave
	Fascos de vidrio			Estufa
	Papel aluminio			
	Rotuladores			
Siembra de plantines	Cajas petri.			
	Pinzas	Fascos de vidrio con medio esterilizado.		Cámara de Flujo Laminar
	Mechero	Agua estéril tipo II		Estufa
	Fósforos	Alcohol al 70%		
	Hoja de bisturí	Alcohol al 90%		
	Mangos de bisturí			
Desinfección de Plantines		Agua estéril tipo II		
	Fascos estériles	Alcohol al 70%	Tween 20	Cámara de flujo laminar
	Pinzas	Alcohol al 90%		
		Cloro comercial		
Esterilización de materiales	Pinzas			Estufa
	Fascos de Vidrio	Agua tipo II		Autoclave
	Bolsas de esterilización			
Condiciones de luz	Estructura metálica			Cámara de incubación
	Alambre			Lámparas luz blanca.
	Tijeras			Lámparas luz roja-azul

Cuadro 3: Materiales, equipos, insumos y reactivos usados en la investigación. Fuente: Propia.

3.3.2. MATERIAL VEGETAL

Se trabajaron con plantines de Phalaenopsis provenientes de frascos comunitarios de la misma edad y similares características. Estos plantines se obtuvieron de la empresa Orquídeas GENEK.

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental para la evaluación de número de brotes consistió en un esquema factorial de 2 x 2 x 3 (2 concentraciones de medio de cultivo, 2 espectros de luz y 3 concentraciones de hormonas, cuadro 4) completamente al azar.

Se utilizaron 3 plantines en frascos individuales por tratamiento y cuatro repeticiones, dando como resultado 12 tratamientos (cuadro 5) y 144 individuos bajo experimentación.

La variable analizada en el estudio fue el número de brotes por tratamiento, se registraron datos cada 8 días durante un período de 2 meses, los mismos que fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza y establecimiento de rangos de confianza mediante la prueba de Tukey al 0.05%.

	Medios y Soluciones	Concentraciones y medidas
Factor 1	Murashige y Skoog	MS 50%
		MS 100%
Factor 2	Hormonas	H1: BAP 0 + ANA 0
		H2: BAP 3 mg/l + ANA 0,5 mg/l.
		H3: BAP 6 mg/l + ANA 0,5 mg/l
Factor 3	Espectros de luz	Luz blanca
		Luz roja-azul

Cuadro 4: Factores en estudio para la inducción de brotes. Fuente: Propia.

Estos medios fueron dosificados a razón de 10 ml por frasco (dimensión 10x5 cm), dando un total de 144 frascos los cuales fueron estabilizados y posteriormente se procedió a la siembra de un plantin de Phalaenopsis por frasco, siendo incubados bajo 2 espectros de luz: luz blanca y luz roja-azul.

Tratamiento	Descripción
T1	MS 100% + H1 + Luz Roja-Azul
T2	MS 100% + H1 + Luz Blanca

T3	MS 100% + H2 + Luz Roja-Azul
T4	MS 100% + H2 + Luz Blanca
T5	MS 100% + H3 + Luz Roja-Azul
T6	MS 100% + H3 + Luz Blanca
T7	MS 50% + H1 + Luz Roja-Azul
T8	MS 50% + H1+ Luz Blanca
T9	MS 50% + H2 + Luz Roja-Azul
T10	MS 50% + H2 + Luz Blanca
T11	MS 50% + H3 + Luz Roja-Azul
T12	MS 50% + H3 + Luz Blanca

Cuadro 5: Descripción de tratamientos. Fuente: Propia

3.4.1. PREPARACIÓN DE HORMONAS

Determinada la cantidad de hormonas a usarse (cuadro 4), fueron disueltas con la adición de gotas de ácido clorhídrico al 0,5 N ajustando posteriormente el pH a 5,6 con hidróxido de sodio 0.5 N.

3.4.2. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (1962) ya que es altamente compatible con diversas especies (Ávila & Salgado, 2006). Los medios se prepararon con los elementos descritos en el cuadro 6.

Descripción	Concentración	Cantidad
Murashige y Skoog (MS)	50%	2,2 mg/l
Murashige y Skoog (MS)	100%	4,4 mg/l
Agar – Agar		20 g/l
Agua Tipo II		1000ml
Sacarosa		8 g/l

Cuadro 6: Elementos del medio de cultivo. Fuente: Propia

3.4.4. ESPECTROS DE LUZ

Uno de los factores que determina el desarrollo en los organismos autótrofos es la luz, de ahí la importancia de controlar este factor en cultivos *in vitro*, ya que promueve el aumento de sustancias que ayudan al crecimiento (Araya, Gómez, Hidalgo, & Valverde, 2000). La calidad de luz puede cambiar la morfogénesis de las plantas, mediante una serie de procesos guiados por receptores, éstos absorben la luz de la región roja y azul del espectro e incrementan la calidad de las plantas sometidas a cultivo *in vitro* (Tavares, y otros, 2009)

Se trabajó con dos cámaras de incubación, una con luz blanca y otra con luz roja – azul, ver figura 4.

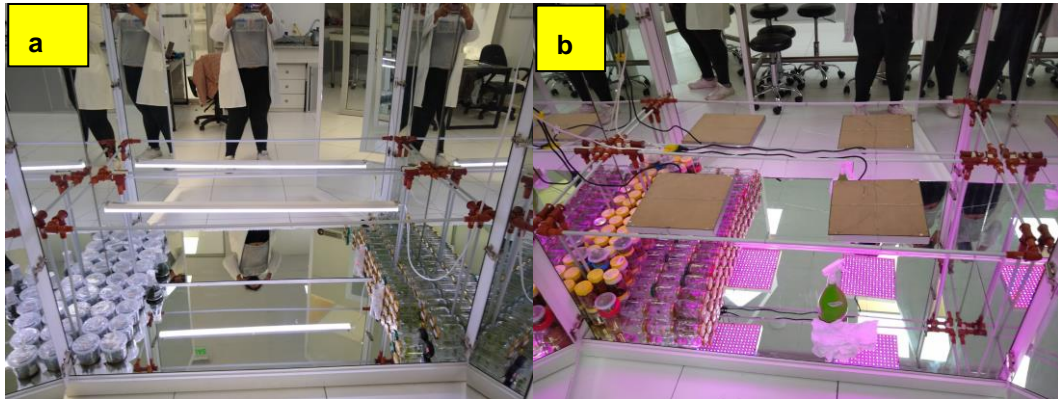


Figura 4: Cámaras de incubación, (a) cámara con espectro de luz blanca y (b) cámara con espectro de luz roja-azul.

La calidad de luz puede cambiar la morfogénesis de las plantas, mediante una serie de procesos guiados por receptores, éstos absorben la luz de la región roja y azul del espectro e incrementan la calidad de las plantas micropropagación (Tavares, y otros, 2009)

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO*

Durante el establecimiento del cultivo se realizó una inspección a los 7 días después de la siembra, los cuales presentaron contaminación (Figura 5).



Figura 5: Frascos Contaminados.

Por lo regular se pretende que, al trabajar con plantines, que ya estaban en un proceso de cultivo *in vitro*, se descartaría un proceso de desinfección, sin embargo, los tratamientos tuvieron alto índice de contaminación por lo que se recurrió a la desinfección del material vegetal.

Aguirre, Pierre, & Leigue (2016) dice que los contaminantes más comunes en cultivo *in vitro* son hongos, bacterias y levaduras, además que los signos de contaminación aparecen después de que las plantas sean sub cultivadas.

García, Mesa, & Ocampo (2015) describe un protocolo de desinfección del material vegetal bajo la utilización de una gota de Tween 80 por cada 100 ml de agua destilada por 10 minutos y luego hacer lavados con agua destilada estéril. En diferentes estudios sobre protocolos de desinfección establecen la importancia del hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes en rangos 1,5 % al 3% (Borges, Estrada, Pérez, & Meneses, 2009; Campos, Arteaga, & Campos, 2020).

Sánchez & Salaverría (2004) probaron tres tipos de concentraciones de cloro comercial (10, 20 y 30%) en desinfección de explantes de fresa cv. Fresno, donde la concentración de 20% de cloro con distintas mediadas de tiempo (10, 20 y 30 minutos) tuvo menor contaminación y sobrevivieron mayor número de explantes.

Por lo tanto, los plantines de *Phalaenopsis* pasaron por un protocolo de desinfección, el cual consistió en lavarlos con agua tipo II retirando las partes afectadas. Luego fueron llevados a la cámara de flujo laminar donde los plantines se colocaron en frascos estériles los cuales se añadieron 100 ml de una mezcla previamente preparada con cloro al 20% + 4 gotas de tween 20 en 1 litro de agua tipo II, los cuales se estuvieron agitando constantemente por 8 minutos, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua tipo II estéril, luego los plantines fueron colocados en etanol al 70% por 30 segundos y nuevamente pasaron por 3 enjuagues con agua tipo II estéril y finalmente fueron colocados en frascos estériles para su siembra en nuevos medios de cultivo.

Luego de la desinfección por contaminación inicial los tratamientos nuevamente presentaron contaminación, se puede establecer que los hongos contaminadores, fueron *Fusarium* y *Penicillium* (figura 6), los cuales se cree que pudieron haberse introducido con el plantín, durante la manipulación en el laboratorio o por bacterias endófitas. Estos patógenos pueden influir en el desarrollo del cultivo y competir por los nutrientes, sin embargo, son contaminantes que afectan frecuentemente al cultivo de tejidos (Pérez et al, 2016).

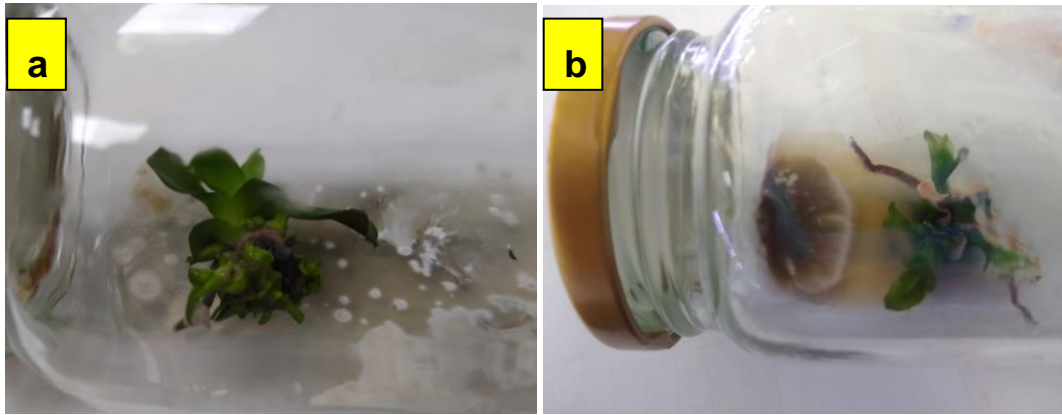


Figura 6: Contaminación en el cultivo por patógenos (a) *Penicillium* y (b) *Fusarium*.

Ávila et al. (2013) establecen que en las orquídeas epífitas se pueden encontrar agentes fúngicos en semillas, en partes externas e internas de la planta, ellos encontraron 18 tipos de hongos entre ellos *Fusarium* y *Penicillium*.

Por lo tanto, se podría establecer un protocolo de desinfección de la parte externa del plantin y ponerlos bajo estado de cuarentena por 15 días con medio cultivo combinado con fungicidas, una vez transcurrido este proceso, se podría cambiar los plantines a medios de cultivo suplementado con hormonas de crecimiento.

Otro factor de preocupación es la oxidación fenólica que presentó el cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*, Hernández & Gonzáles (2010) dice que los tejidos liberan al medio compuestos polifenoles y taninos, esta causa oscurecimiento, necrosis y alteraciones del crecimiento. Sin embargo, Tirado, Naranjo, & Atehortúa (2005) pone en consideración que la fenolización es algo común en el cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*, razón por la cual recomiendan cambiar el medio en un tiempo aproximado de un mes.

Frausto et al. (2019) observaron secreciones de color café en el medio de cultivo de los explantes de varas florales de *Phalaenopsis* característico de la fenolización por lo que realizaron subcultivos a medio nuevo cada 3 semanas y establecen que la oxidación depende mucho del medio de cultivo utilizado.

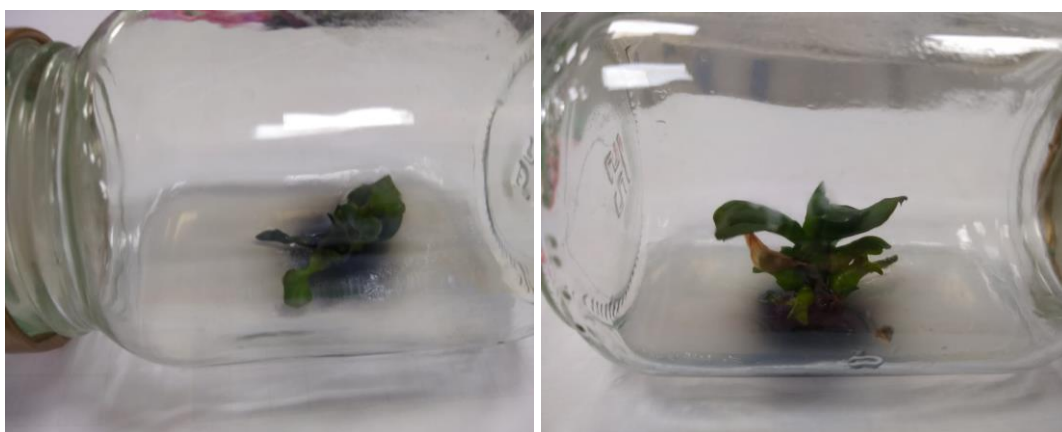


Figura 7: Tratamientos con presencia de fenolización u oxidación.

La fenolización ocurrió en 90% de los tratamientos, por lo que sería recomendable utilizar sustancias catalizadoras con el fin de retardar la fenolización. Perea (2009) recomienda el uso de antioxidantes (catalizadores) los cuales pueden ser naturales o sintéticos, entre ellos el carbón activado, ácido ascórbico, ácido cítrico etc. Frausto et al. (2019) recomiendan bajas concentraciones de Murashige y Skoog debido a que su concentración al 100% tiene alta cantidad de sales, ya que las orquídeas pueden sobrevivir en medios con poca disponibilidad de agua y nutrientes.

Azofeifa (2009) de acuerdo con su revisión bibliográfica determina que la oxidación se presenta en menor grado en medios de sales diluidas de Murashige y Skoog (MS) al 50% o al 25%, sin embargo, en la investigación se trabajó con sales diluidas al 50% y presentaron alto porcentaje de oxidación.

4.2. INDUCCIÓN DE BROTES

Luego de realizados los análisis ($p < 0,05$), se concluye que se acepta la hipótesis alternativa, es decir, que las dosis de hormonas, espectros de luz y concentraciones de Murashige Skoog influyen en el desarrollo brotes en plantines *in vitro* de Phalaenopsis.

Los resultados fueron registrados desde el inicio del ensayo, sin embargo, los mismos se analizan a partir de los 21 días, en vista que se observó que los plantines de Phalaenopsis empezaron a tener reacción a la aplicación de los diferentes tratamientos y luego cada 15 hasta llegar a los 63 días.

Análisis a los 21 días

El número de brotes a los 21 días de iniciado el proceso, se realizó mediante el análisis de varianza (Cuadro 8) para los diferentes tratamientos, donde se indica que se registró diferencias significativas para luz y concentraciones de hormonas (6+0,5 mg) de BAP y ANA frente a los testigos, (Figura 8), lo que influye en la prueba de significancia representado por el tratamiento T12.

De la misma manera al analizar las interacciones entre factores estudiados se observa relaciones entre la concentración de hormonas BAP+ANA (6+0,5 mg), Murashige Skoog al 50% y color de la luz blanca contribuyen a la cantidad de brotes de plantines de Phalaenopsis (Figura 9).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	45,29	14	3,24	5,36	<0,0001
Concentración	18,76	2	9,38	15,53	<0,0001
MS	0,92	1	0,92	1,53	0,2249
Luz	5,77	1	5,77	9,55	0,004
Tratamiento	9,55	7	1,36	2,26	0,054
Réplicas	10,29	3	3,43	5,68	0,003
Error	19,94	33	0,6		
Total	65,23	47			

Cuadro 6: Análisis de varianza para número de brotes a los 21 días de iniciado el proceso (10 de enero de 2022)
Fuente: Propia.

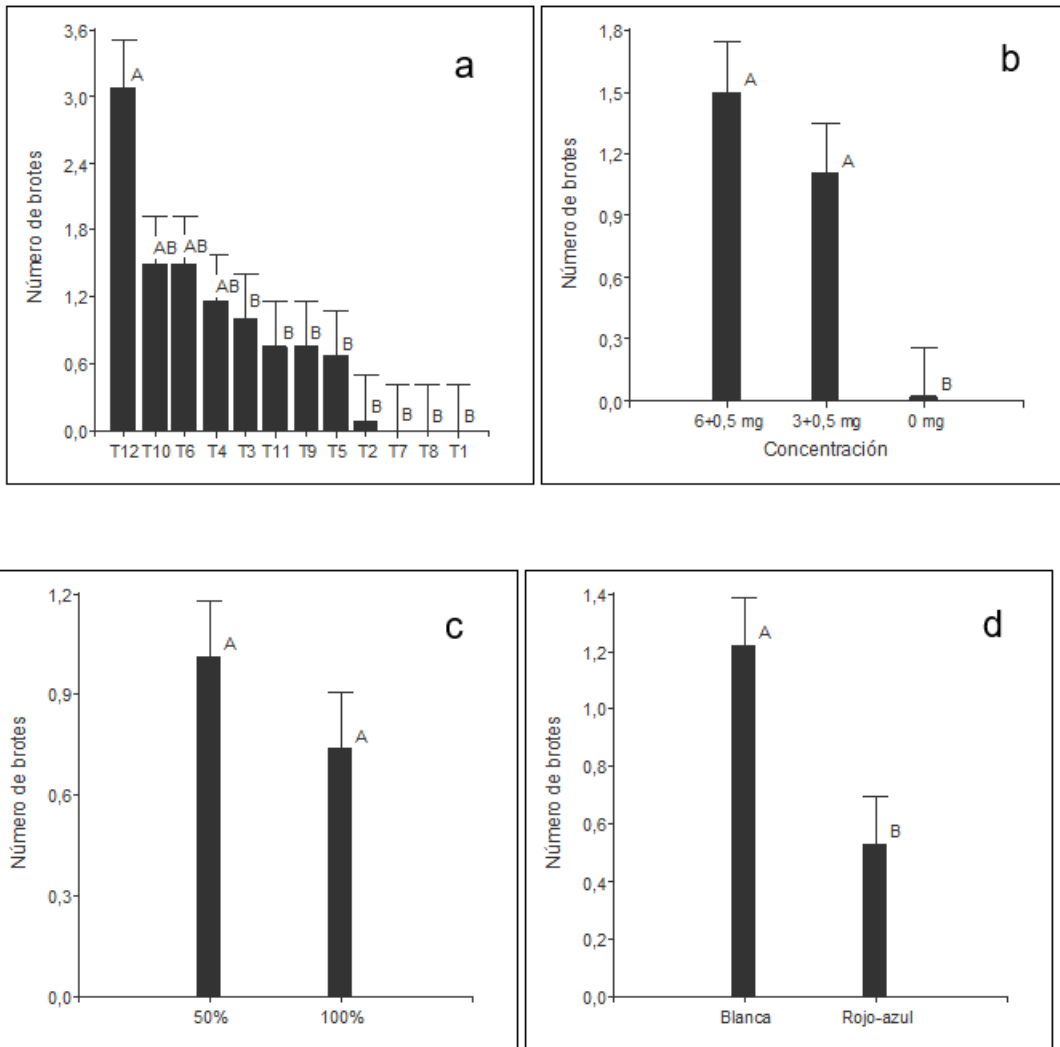
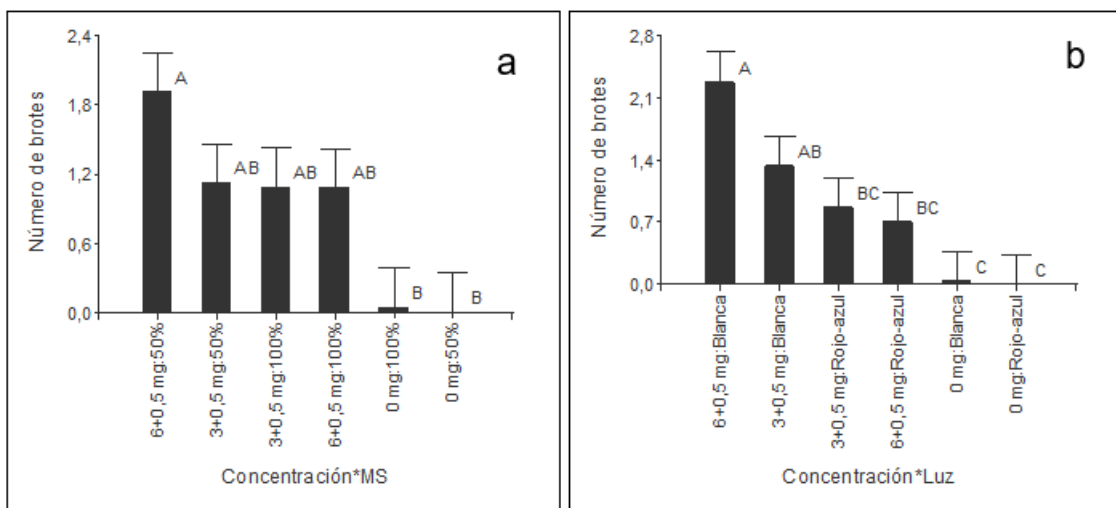


Figura 8: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b) Dosis de hormonas BAP + ANA, (c) concentración de MS y (d) Espectro de luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.



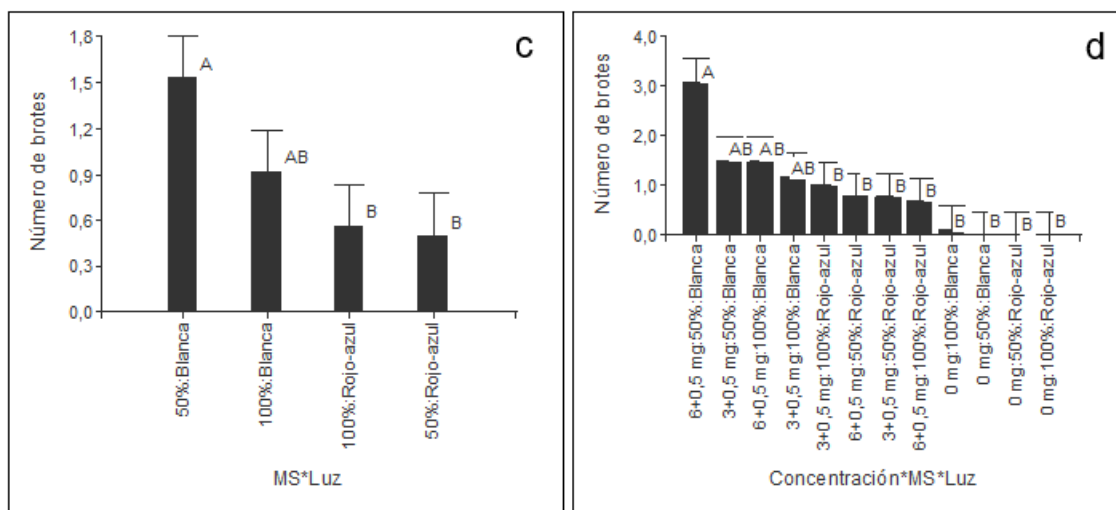


Figura 9: Interacciones entre (a) hormonas BAP+ANA y MS, (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.

A partir de la tercera semana de toma de datos se pudo observar en los plantines suplementados con dosis de hormona (T3, T4, T5, T6, T10, T11 y T12) se encontraban hinchados, estos fueron monitoreados y en la semana 5 se observaron pequeños brotes entre las hojas de los plantines.

Análisis a los 35 días

A los 35 días, la dosis de hormonas utilizadas en el ensayo y el uso de la luz blanca demostraron diferencias significativas para el desarrollo de brotes en plantines de Phalaenopsis con relación al testigo, de esta manera el tratamiento T12 se ve influenciado por estos factores (Figura 7). La concentración de Murashige Skoog hasta este momento no demuestra influencia en el desarrollo de brotes. Analizadas las interacciones entre factores estudiados se demuestra que todos ellos contribuyen al incremento del número de plantines como muestra la Figura 11.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	39,68	14	2,83	4,81	0,0001
Concentración	17,01	2	8,51	14,44	<0,0001
MS	0,52	1	0,52	0,88	0,3539
Luz	5,1	1	5,1	8,65	0,0059
Tratamiento	7	7	1	1,7	0,1436
Réplicas	10,05	3	3,35	5,68	0,003
Error	19,44	33	0,59		
Total	59,12	47			

Cuadro 7: Análisis de varianza para número de brotes a los 35 días (24 de enero de 2022). Fuente: Propia.

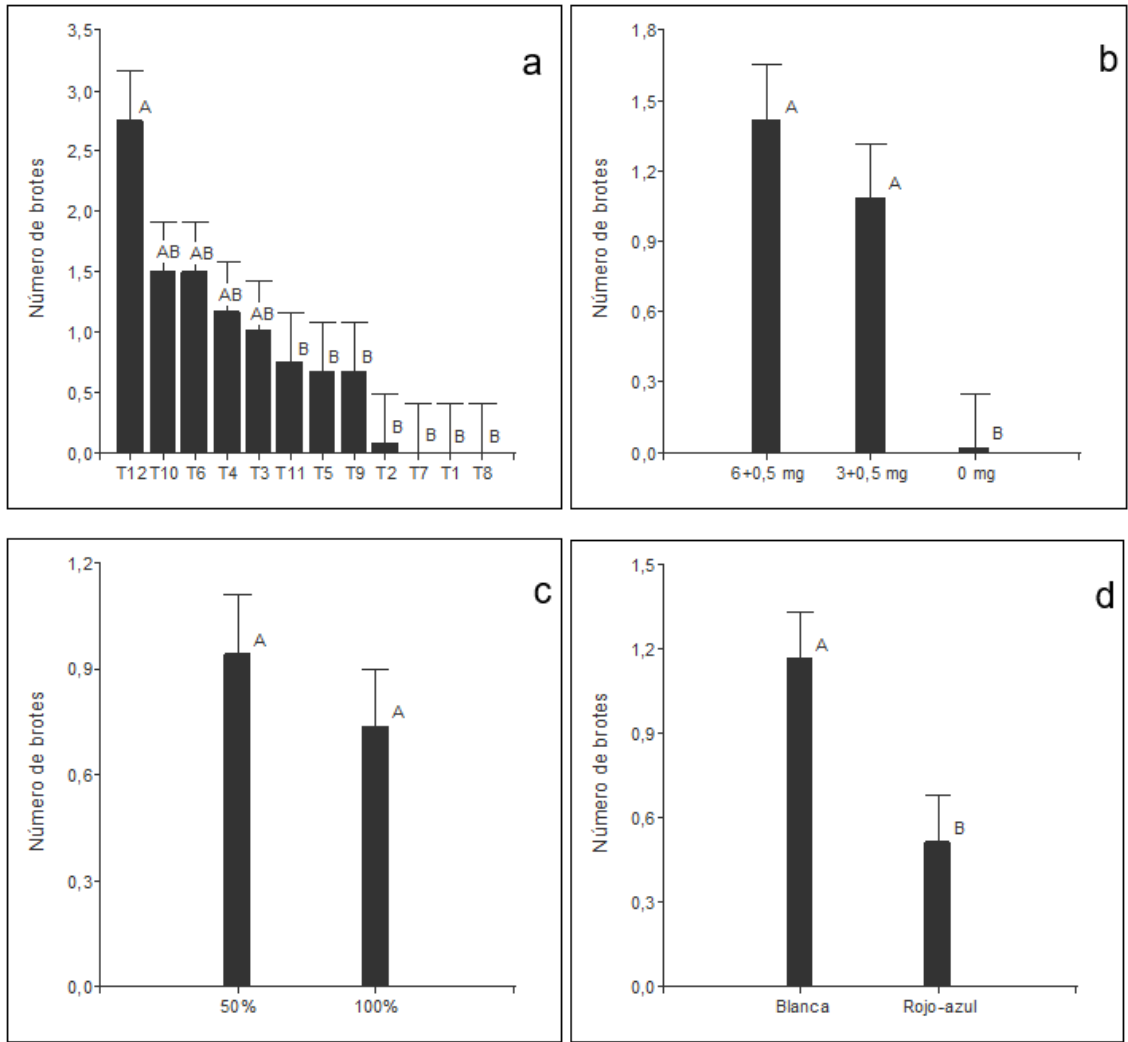
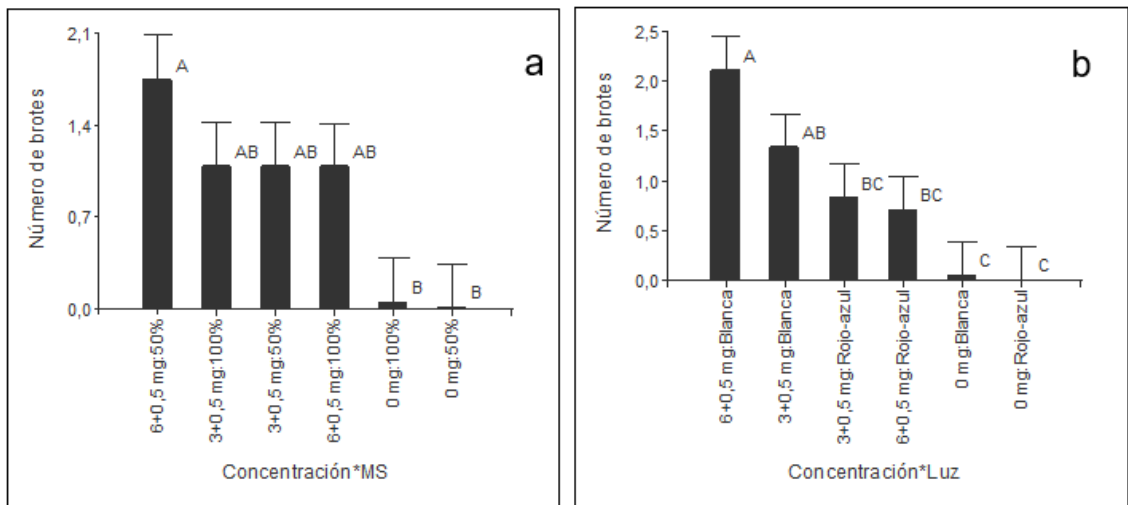


Figura 10: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b), Dosis de hormonas aplicadas BAP+ANA, (c) Concentración de MS y (d) efecto de la luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.



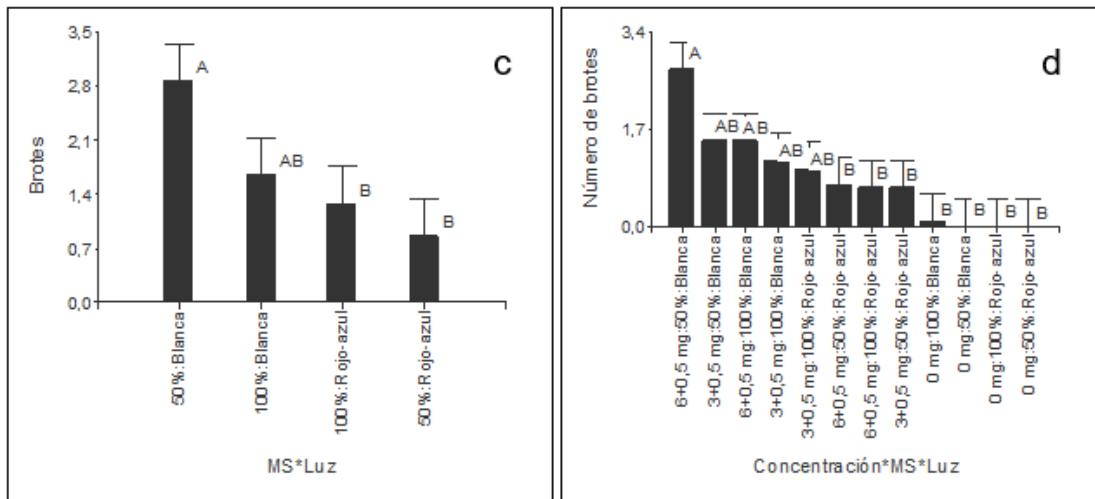


Figura 11: Interacciones entre (a) hormonas BAP+ANA y MS), (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.

Análisis a los 49 días

A los 49 días, las concentraciones de Murashige y Skoog (MS) no muestran influencia en brotes (figura 12). Las dosis hormonales aplicadas y el color de la luz influyen favorablemente el crecimiento y desarrollo de nuevos brotes.

La tendencia de los resultados se mantiene, donde la concentración de hormonas BAP+ANA (6+0,5 mg), Murashige Skoog al 50% y color de la luz blanca contribuyen a la cantidad de brotes de plantines de Phalaenopsis (Figura 13).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	138,14	14	9,87	5,48	<0,0001
Concentración	62,51	2	31,26	17,37	<0,0001
MS	1,81	1	1,81	1,01	0,3227
Luz	17,1	1	17,1	9,5	0,0041
Tratamiento	31,07	7	4,44	2,47	0,0376
Réplicas	25,65	3	8,55	4,75	0,0073
Error	59,39	33	1,8		
Total	197,52	47			

Cuadro 8: Análisis de varianza para número de brotes a los 49 días 7 de febrero

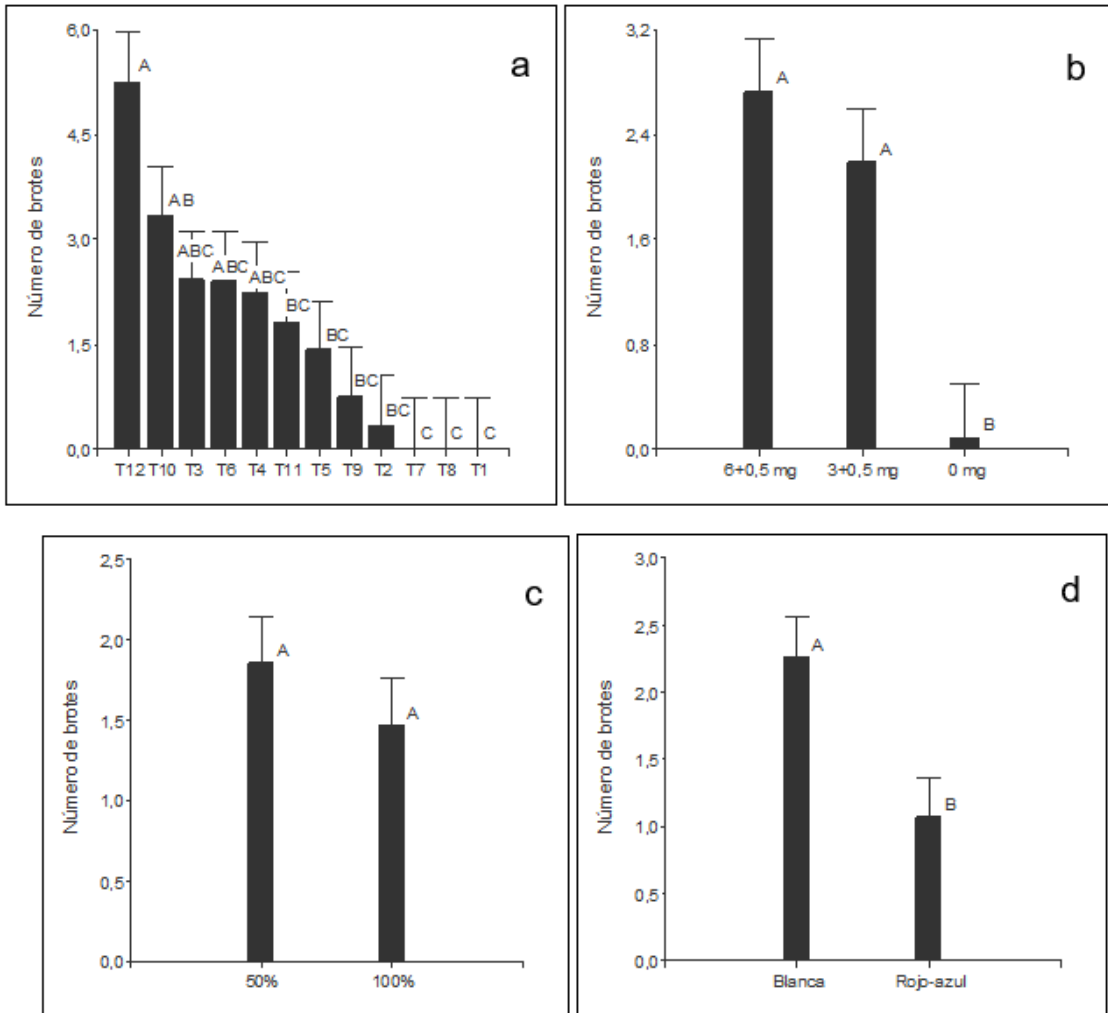
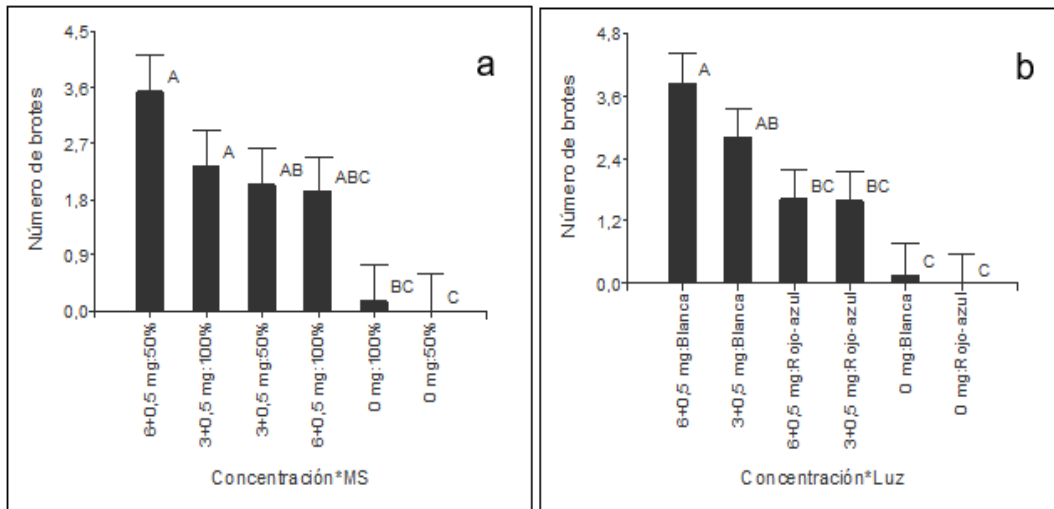


Figura 12: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b) Dosis de hormonas BAP+ANA (c), Concentración de MS y (d) Espectros de luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.



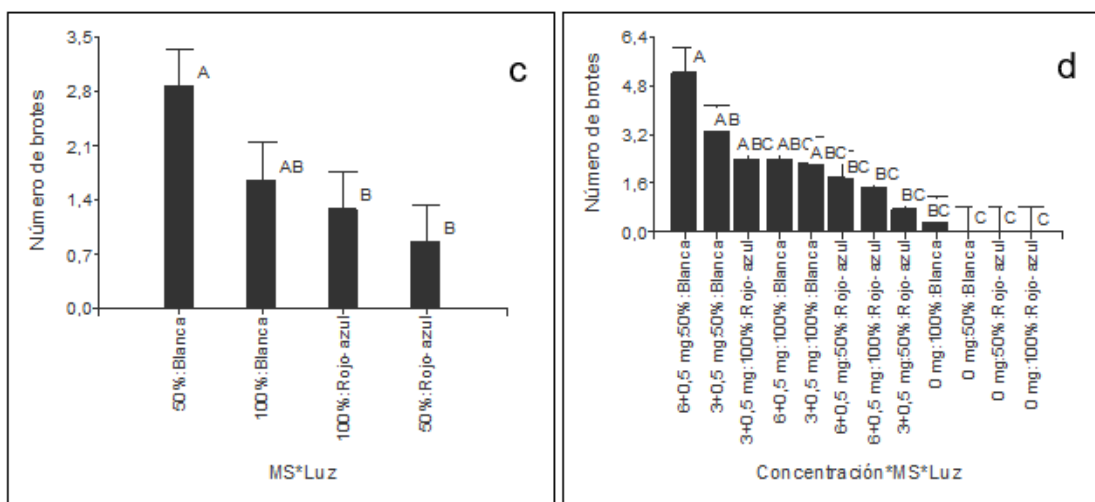


Figura 13: Interacciones entre (a) hormonas BAP+ANA y MS), (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.

Análisis a los 63 días

Transcurridas 9 semanas de ensayo, el análisis de datos demuestra mediante el ADEVA que en definitiva las hormonas BAP y ANA en la dosis 6+0,5 mg y la luz de color blanca tiene un efecto positivo sobre el número de brotes. En tanto, la concentración de MS fue indiferente (Figura 14). La tendencia de las interacciones entre los factores analizados en este estudio se ha mantenido a través del tiempo, en vista que la concentración de hormonas BAP+ANA (6+0,5 mg), Murashige Skoog al 50% y color de la luz blanca contribuyen de manera conjunta a incrementar la cantidad de brotes de plantines en Phalaenopsis (Figura 15)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	168,85	14	12,06	4,51	0,0002
Concentración	91,94	2	45,97	17,2	<0,0001
MS	0,45	1	0,45	0,17	0,6834
Luz	11,37	1	11,37	4,25	0,0471
Tratamiento	37,64	7	5,38	2,01	0,0832
Réplicas	27,44	3	9,15	3,42	0,0284
Error	88,2	33	2,67		
Total	257,05	47			

Cuadro 9: Análisis de varianza para número de brotes a los 63 días 21 de febrero. Fuente: Propia.

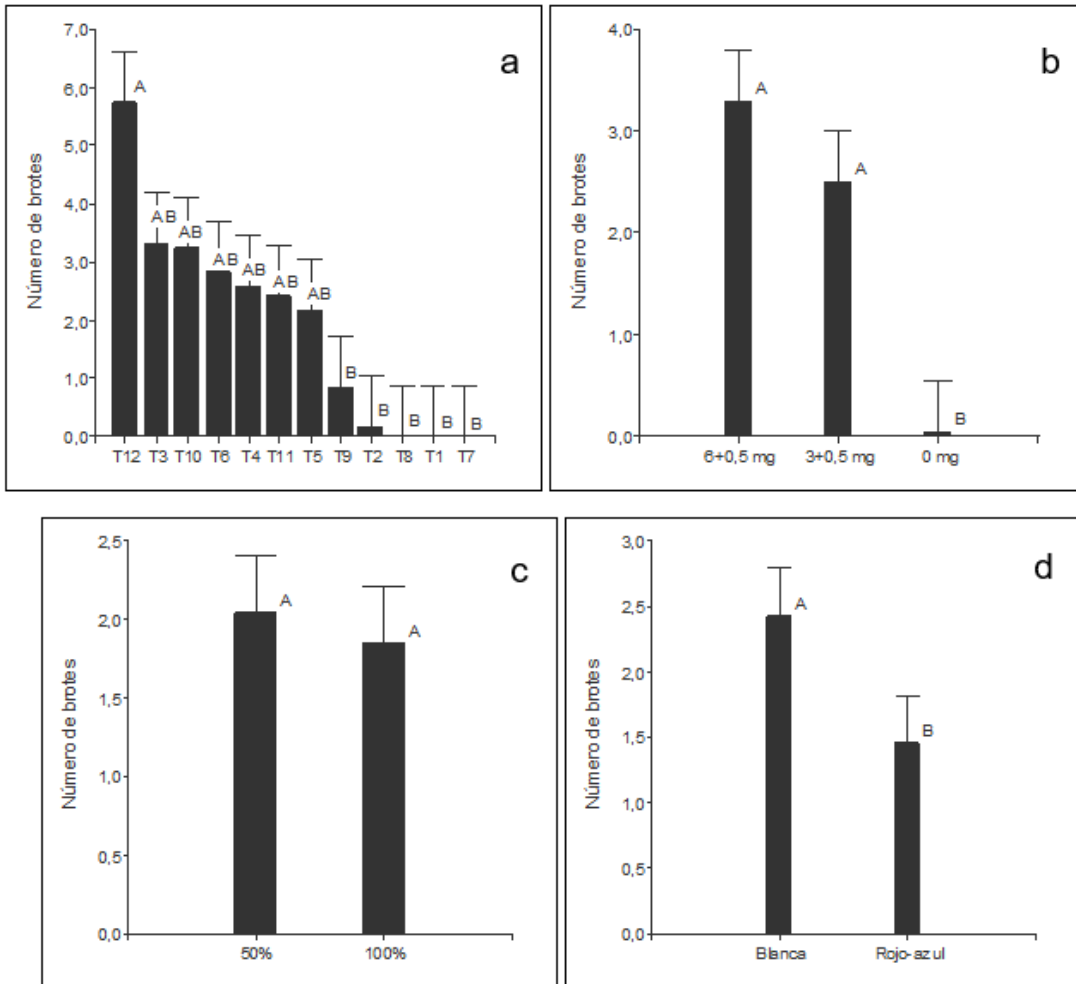
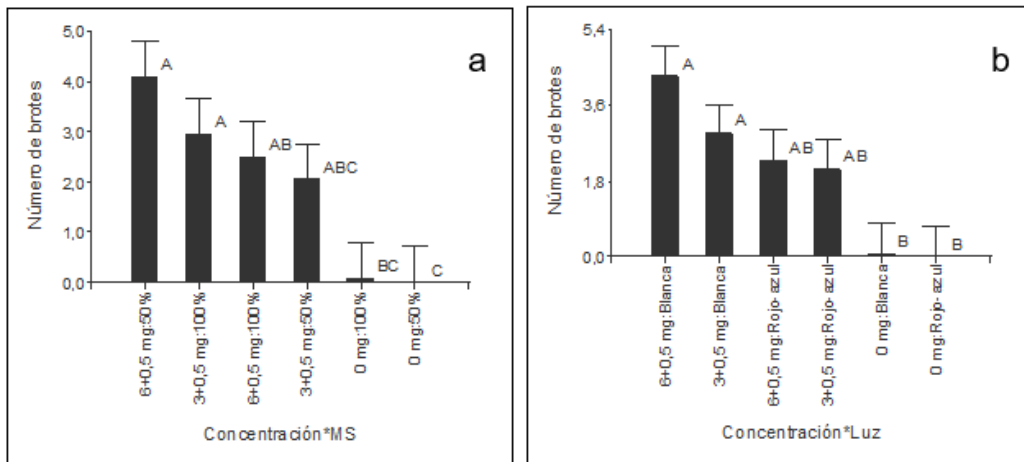


Figura 14: Gráficos de (a) Distribución de los tratamientos, (b) Dosis de hormonas BAP+ANA, (c) Concentración de MS y (d) Espectro de luz sobre crecimiento de brotes. Prueba de significancia de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.



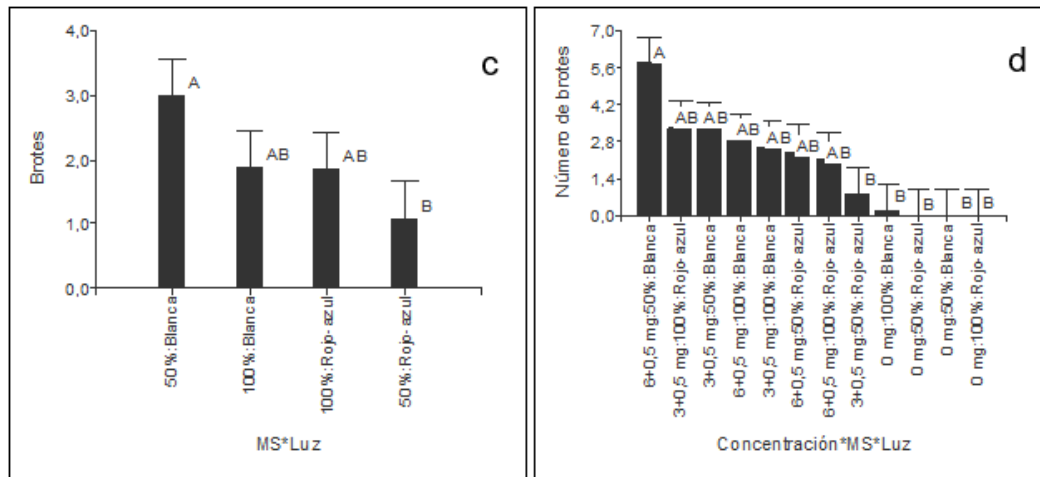


Figura 15: Interacciones entre (a) hormonas BAP+ANA y MS, (b) Hormonas BAP+ANA y espectro de luz, (c) MS y color de luz, (d) Hormonas BAP+ANA, MS y espectro de luz (d). Prueba de Tukey al 0.05. Letras iguales corresponden a rangos iguales.

La evolución del número de brotes en plantines fue diferente para cada tratamiento. De los cuales T12, con las dosis de 6+0,5 mg de las hormonas BAP y ANA, aplicación de luz blanca y Murashige Skoog al 50% de la concentración, demostró mayor rendimiento en el número de brotes.

Podemos argumentar que la utilización de hormonas en este caso BAP y ANA, si intervienen en la inducción de brotes en los plantines *in vitro* de Phalaenopsis, las dosis hormonales, es decir, BAP 6 mg/l + ANA 0,5 mg/l tiene una pequeña diferencia en cuanto a la inducción de brote, versus la dosis BAP 3 mg/l + ANA 0,5 mg/l.

Según García et al. (2009) dicen que en el cultivo *in vitro* de *Bambusa vulgaris var. Vulgaris* en medio líquido, el BAP en 3 y 6 mg/l favoreció la inducción de brotes y que la mezcla de BAP + ANA no tiene una respuesta efectiva en la inducción. Frausto Jaime et al. (2019) declararon que la utilización de reguladores de crecimiento BAP 20.2 µM + ANA 5.37 µM combinados para la inducción de brotes en varas florales de Phalaenopsis muestran mejores resultados, a diferencia de la utilización solo de BAP.

Araya et al. (2000) establece que la luz promueve sustancias que influyen el crecimiento en cultivos *in vitro*. Tavares et al. (2009) declara que la luz roja y azul influyen en la calidad de las plántulas cultivadas *in vitro*. En relación con los espectros de luz usados en la investigación, demostró mejor resultado el uso de luz blanca en la inducción de brotes.

Frausto Jaime et al. (2019) declara que inducción de brotes a varas florales de Phalaenopsis, el uso de MS 100% que es un medio completo con una cantidad de sales alta es beneficioso para ciertos cultivos, pero en el caso de las orquídeas que evolucionaron y se adaptaron a un bajo requerimiento mineral, debido a que necesitan sobrevivir a medios de poca disponibilidad de agua y nutrientes, determina que MS 50% resulta favorable para la para la viabilidad de los explantes.

En el caso de esta investigación se determinó que tanto el MS al 100% como al 50% no tienen una diferencia significativa en la inducción de plantines de Phalaenopsis. Sin embargo, el MS al 50% tiene una pequeña elevación en comparación MS al 100%.

La figura 16 muestra la evolución de la inducción de brotes a través de las semanas, en el cual algunos tratamientos muestran cierto número de brotes en una semana y la siguiente disminuyen, esto se debe a que los individuos contaminados fueron descartados.

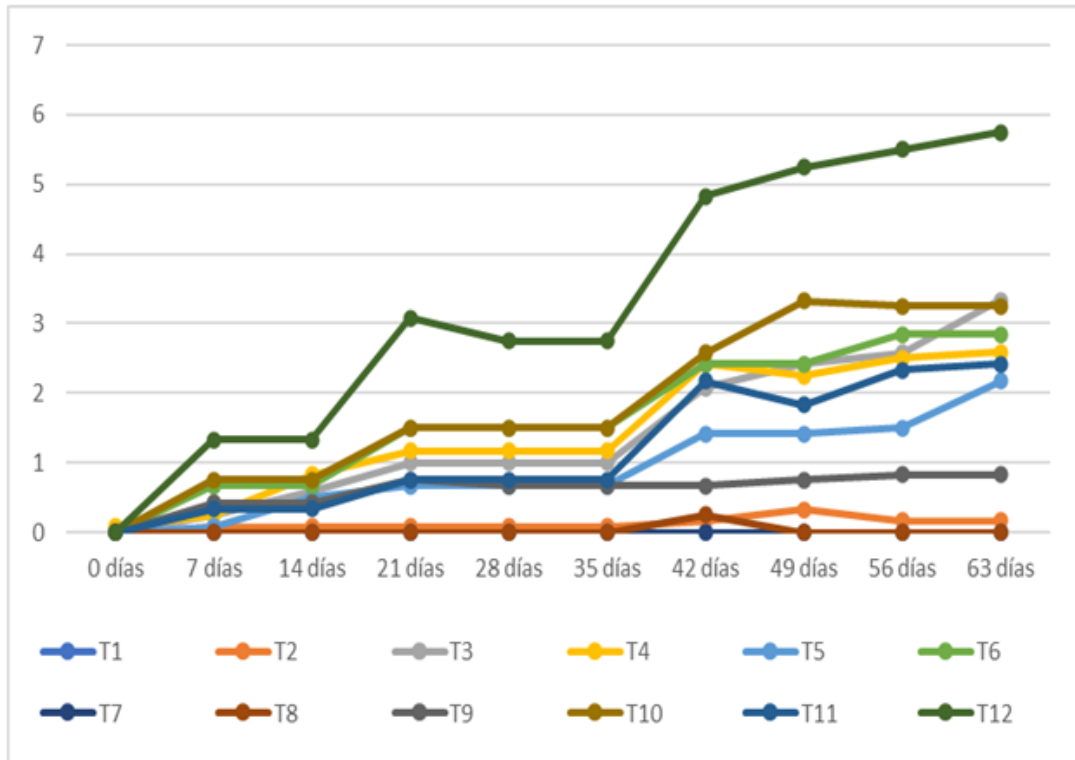


Figura 16: Evolución del número de brotes de plantines de *Phalaenopsis* de 0 a 9 semanas de proceso.

De acuerdo con lo observado en la investigación, los tratamientos con dosis hormonal BAP 3 mg/l + ANA 0,5 mg/l, si presentaron inducción de brotes, sin embargo, tuvieron mayor índice de brotación con la dosis hormonal BAP 6 mg/l + ANA 0,5 mg/l y en cambio los tratamientos con 0 dosis hormonal no presentaron brotes, se puede decir que una concentración baja de ANA es adecuada para la inducción de brotes, acompañada de una dosis alta de BAP.

Frausto Jaime et al (2019) establecen que la combinación adecuada de hormonas puede influir de manera significativa la inducción de brotes en *Phalaenopsis*.

En cuanto a la dosis de MS al 100% y al 50%, se puede decir que ambas concentraciones tuvieron iguales resultados puesto que ninguna es significativamente diferente en la inducción de brotes en plantines *in vitro* de *Phalaenopsis*.

En el caso de la luz, el espectro de luz blanca muestra una diferencia significativa al del espectro de luz roja azul, en la inducción de brotes de *Phalaenopsis*.

Otro aspecto importante en los tratamientos que no tuvieron influencia de hormonas de crecimiento (T1, T2, T7 y T8) presentaron formación de raíces, pero no presentaron formación de brotes. Tampoco hubo diferencia en el número de raíces en cuanto al espectro de luz, pero se puede decir que las concentraciones de MS al 50 y 100%, si intervinieron de manera favorable en el crecimiento de raíces en plantines de *Phalaenopsis* como se observan en la figura 17.



Figura 17: Tratamientos T1 y T2 que presentaron formación de raíces.

5.1. CONCLUSIONES

- Con respecto a la oxidación que presentó el cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis* podemos atribuirlo a la no incorporación de sustancias catalizadoras en el medio de cultivo.
- Podemos afirmar que el uso de reguladores de crecimiento promueve la inducción de brotes, debido a que todos los tratamientos suplementados con reguladores indujeron mayor número de brotes en plantines de *Phalaenopsis*, frente a los no hormonados, siendo la concentración de 6 mg/l + 0,5 mg/l de hormonas BAP y ANA los que más influyeron en la inducción de brotes en plantines de *Phalaenopsis* con un total de 6 brotes por plantín.
- En referencia al medio de cultivo Murashige y Skoog en las concentraciones probadas (50% y 100%) no se evidenció diferencia significativa.
- El espectro de luz blanca ha demostrado que influye en la inducción de brotes, pues los tratamientos bajo su influjo presentaron mayor número de brotes.
- En cuanto al

5.2. RECOMENDACIONES

- Al trabajar con frascos comunitarios se debe observar que el frasco esté adecuadamente sellado y que el medio de cultivo no se encuentre muy viejo.
- Se podría establecer una cuarentena de los plantines en medio con baja concentración de sales, con una desinfección previa durante 15 días, después de este tiempo, transferirlo a medio de cultivo con reguladores de crecimiento.
- Añadir sustancias catalizadoras al medio de cultivo para remover la oxidación o sustancia fenólicas.
- Se podría evaluar el Murashige y Skoog en concentraciones más bajas que las utilizadas en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour, A., & Esacalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Turrialba, CATIE/CEE/CIRAD, CR. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=T9QOAAIAAJ&printsec=frontcover&dq=cultivo+de+tejidos+vegetales&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=cultivo%20de%20tejidos%20vegetales&f=false

Aguirre, G., Pierre, J., & Leigue, L. (2016). Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos Fitogenéticos. *Universidad Mayor de San Simón*. Obtenido de <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>

Alburqueque, D., & Gusqui, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498. doi:<http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>

Allende, R., Picos, P., Márquez, I., Carrillo, J., García, R., & León, J. (2013). Identificación Morfológica y Molecular de *Penicillium oxalicum* Causante de Pudrición de Tallos y Frutos de Tomate. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(1), 13-19. Obtenido de www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100002&lng=es&nrm=iso

Alvarado, Y., Cruz, M., Portal, N., Acosta, M., & Leiva, M. (2004). Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento de contaminantes bacterianos de la micropropagación de la caña de azúcar. *Bioteología Vegetal*, 4(3), 139-142. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/409>

Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N., & Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y del ácido gibberalico sobre la germinación *in vitro* de (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense*, 24(1), 75-80. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43624108>

Arditti, J. (1980). Aspects of the Physiology of Orchids. 7, 421-655. doi:[https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60091-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60091-9)

Ávila, I., & Salgado, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*(8), 138-149. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/233799527_Propagacion_y_mantenimiento_in_vitro_de_orquideas_mexicanas_para_colaborar_en_su_conservacion

Ávila, I., Orijel, R., Magaña, R., & Oyama, K. (2013). Molecular evidence reveals Fungi associated withing the Epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences*, 91(4), 523-529. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-42982013000400011&lng=es&tlng=

Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.

Blanchard, M., & Runkle, E. (2006). La temperatura durante el día, pero no durante la noche, controla la floración de las orquídeas *Phalaenopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4043-4049. doi:10.1093/jxb/erl176

Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos en la desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon careño. *Revista Colombiana de Bioteología*, 11(2), 127-135. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3105408.pdf>

Burguet, N., & Castillo, L. (2013). Control de calidad de los medios de cultivo utilizados en el monitoreo ambiental de las áreas clasificadas de producción. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(2), 155-160. Obtenido de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000200004&lng=es&tng=es

Campos, J., Arteaga, M., & Campos, S. (2020). Establishment of an *in vitro* de caoba, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), disinfection and micropropagation protocol. *Arnaldoa*. doi:10.22497/arnaldoa.271.27107

Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J., & Mosquera, T. (2007). Evaluation of different concentrations of some plant growth regulators on *in vitro* multiplication and rooting of *Limonium* var. Misty blue. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 47-53. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n1/v25n1a06.pdf>

Chen, B., Zhang, Y., Cao, Y., Zheng, Y., Weia, Z., Zhaob, K., . . . Zhou, Y. (2020). Chloroplast characterizations of a *Phalaenopsis* native to China, *Phalaenopsis*. *MITOCHONDRIAL DNA PART B*, 5(3), 3707–3708. doi:<https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1833776>

Chugh, S., Guha, S., & Rao, U. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 507-520. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>.

Cob, J., Ríos, D., Sabja, A., Cartes, P., & Sánchez, M. (2016). Organogénesis directa para la propagación *in vitro* de Quillaja saponaria Molina en Sudamérica Austral. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(34), 57-68. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322016000200057&lng=es&nrm=iso

Colombo, R., Favetta, V., & Tadeu, R. (2012). Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Ceres*, 59(6), 873-876. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226962019>

Corral, V., Sucoshañay, D., Álvarez, L., & Castro, P. (2017). La actividad ecoturística y su incidencia en la conservación ambiental del Jardín Botánico Las Orquídeas del sector Los Ángeles de Puyo, Pastaza, Ecuador. *Revista Interamericana de ambiente y turismo*, 129-137. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-235X2017000200129>

Costa, T., Coelho, D., Zotz, G., Winkler, U., & Franco, A. (2017). "The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption". *Flora*, 235, 66-74. doi:<https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.009>

Cseke, L., Kaufman, P., Podilla, G., & Chung, J. (2003). *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. CRS Press LLC. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=uAheSu_8hKsC&pg=PA361&dq=murashige+skoog&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjP68uU48n2AhWvRjABHdCjAK0Q6AF6BAgFEAI#v=onepage&q=murashige%20skoog&f=false

Cueva, A., & González, Y. (2014). Efectos del fotoperiodo, reguladores del crecimiento vegetal y medios de cultivo sobre el crecimiento *in vitro* de plántulas de *Cyrtochilum loxense* (Lindl.) Kraenzl. una orquídea endémica y en peligro de extinción de Ecuador. *Revista Perú biol*, 21(2), 189-192. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v21i2.9826>.

Díaz, M. (2013). *Manual de Cultivo de Orquídeas*. Mexico: Secretaría de Educación de Veracruz. Obtenido de https://www.sev.gob.mx/servicios/publicaciones/serie_paradocencia/ManualCultivoOrquideas.pdf

Duarte, A., Panizo, M., Ferrara, G., Lage, L., Reviakina, V., & Dolande, M. (2014). Susceptibilidad *in vitro* a cinco antifúngicos de aislamientos del Complejo *Fusarium olani*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34(2), 75-80. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199437912006>

Duarte, D., Gómez, S., & Monsalve, H. (2015). Orquídeas. Obtenido de <https://sie.car.gov.co/bitstream/handle/20.500.11786/33803/29121.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Emeterio, A., Palma, V., Vázquez, L., & Mejía, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México. *Polibotánica*(42), 197-214. doi:<https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.10>

Endara, L., Williams, N., & León, S. (2009). Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids. *Patrones de endemismo de orquídeas endémicas ecuatorianas: Perspectivas y prioridades de la conservación*. (págs. 63-70). Pridgeon A M. Obtenido de PATRONES DE ENDEMISMO DE ORQUÍDEAS ENDÉMICAS ECUATORIANAS:: <https://www.researchgate.net/profile/Susana-Leon-Yanez/publication/319040057>

Flores, L., Robledo, A., & Jimarez, M. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6), 1315-1328. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000601315&lng=es&nrm=iso

Frausto, K., Ojeda Zacarías, M., Alvarado Gómez, O., García Zambrano, E., Rodríguez Fuentes, H., & Rodríguez Pérez, G. (2019). Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1207-1218. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.608>

Freuler, M. (2006). *100 Orquídeas Argentinas*. Albatros. Obtenido de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=IOiVpaB-Fm4C&oi=fnd&pg=PA4&dq=orqu%C3%ADdeas&ots=jsJX9gWRlZ&sig=hQmESSRFAWpmzjQxEB4IHTjbaRM#v=onepage&q=orqu%C3%ADdeas&f=false>

García, D., Mesa, N., & Ocampo, M. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76-84. doi:DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277

García, L., Gómez Kosky, R., Albany, N., Vilchez, J., Alvarado, Y., & Reyes, M. (2007). Influencia de las condiciones de iluminación en la germinación de embriones somáticos del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(4). Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182007000400005

García, Y., Freire, M., Pérez, B., & Hurtado, O. (2009). Efecto de BAP y ANA en la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. *Biotecnología Vegetal*, 9(3), 189-192. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/322>

Gil, A., Ariza, C., Castillo, L., Salgado, L., Banda, L., & Vanegas, L. (2019). Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2). doi:10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275

Golovatskaya, I., & Karnachunk, R. (2015). Role of green light in physiological activity of plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62, 727-740. doi:<https://doi.org/10.1134/S1021443715060084>

Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de Medios de Cultivos para Microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de Biopredadores de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17-24. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215825002>

González, M. (2013). *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. Obtenido de https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers14-02/010060280.pdf

Griesbach, R. (2002). Horticulture & Landscape Architecture. 458-465. ASHS Press. Obtenido de Development of *Phalaenopsis* Orchids for the Mass-Market: <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/v5-458.html>

Gutierrez, A., & Gonzales, P. (2019). Reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de tres cultivares portainjertos de vid (*Vitis vinifera* L.) para su uso en la industria del pisco. *Scientia Agropecuaria*, 10(4). doi:<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.02>

Hernández, Y., & Gonzáles, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de Frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015

Hong, H., & Wen, H. (2007). Genetic Transformation as a Tool for Improvement of Orchids. En *Orchid Biotechnolgy* (págs. 225-253). World Scientific Publishing Company. doi:10.1142/9789812775900_0013

INIVIT. (2018). *Engormix Agricultura Artículos técnicos*. Obtenido de Influencia de la edad fisiológica de la planta donante sobre contaminantes microbianos en la micropropagación de *Colocasia Esculenta* (L.) Schott: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/influencia-edad-fisiologica-planta-t42112.htm>

Jiménez, M. (2014). Orquídeas del Ecuador, número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado. *Yaguarzongo*, 31-32. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/268632113>

Kumar, M., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Bairwa, K., & Jana, S. (2015). Caracterización física, térmica y espectroscópica de los medios de cultivo celular de murashige y Skoog tratados con energía de biocampo. *Biología Celular*, 3(4), 50-57. doi:10.11648/j.cb.20150304.11

Lucía, D., Namur, J., Bollati, S., & Arce, O. (2010). Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 27-40. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77617808003>

Martín, R., Chong, B., & Pérez, N. (2015). Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. *Biotecnología Vegetal*, 15(4). Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/497/html>

McKendrick, S. (2000). Manual para la Germinación *in vitro* de Orquídeas. Recuperado el 15 de Marzo de 2022, de https://www.academia.edu/15686103/MANUAL_PARA_LA_GERMINACION_IN_VITRO_DE_ORQUIDEAS

Menezes, L., Machado, M., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M., & Mangolin, C. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia*, 47-54. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>

Millones, C., & Vásquez, E. (2020). Regeneración y enraizamiento de brotes adventicios etiolados de cultivares de zarzamora (*Rubus* sp). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(4), 338-342. doi:<https://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.195>

Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (2021). *Manual para la indentificación de Orquídeas*. Obtenido de <http://otca.org/wp-content/uploads/2021/06/LibroOrquideas21x21.pdf>

Mohammadi, M., Kaviani, B., & Sedaghatoor, S. (2021). Inducción de poliploidía *in vivo* de *Phalaenopsis amabilis* en un sistema de biorreactor de burbujas usando colchicina. *Horticultura ornamental*, 27(2), 204-212. doi:[doi:doi.org/10.1590/2447-536X.v27i2.2275](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v27i2.2275)

Muñoz, C. (2014). Orquídeas de Aragón. España: Jolube. Obtenido de http://www.jolube.es/editorial_jolube/Oferta.php

Murillo, M., Pedraza, M., Gutiérrez, N., Rodríguez, M., Lobit, P., & Martínez, A. (2016). Calidad de la luz led y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (orchidaceae). *Agrociencia*, 50(8), 1065-1080. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000801065

Nauray, W. (2013). Manual de Orquídea. Ministerio del Ambiente Perú. Obtenido de www.minam.gob.pe

Ordóñez, J. (2016). Investigación e Innovación tecnología y apropiación social del conocimiento científico de Orquídeas nativas de Condinamarca. *Taxonomía de Orquídeas y Manejo de Colecciones*. Colombi. Obtenido de <http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/32665/2016-Ordenez-Tallerorquideas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

OTCA. (1 de Septiembre de 2021). Organización del Tratado de Cooperación Amazónica. *Boletín Bioamazonía*(10). Obtenido de <http://otca.org/las-orquideas-y-el-paiche-una-oportunidad-para-mejorar-las-cadenas-de-valor-para-productos-de-la-biodiversidad-ecuadoriana/#:~:text=En%20Ecuador%20se%20registran%20m%C3%A1s%20de%204.187%20especies,alcanz%C3%B3%20USD%201%20C939%20C403.570%20>

Paniagua, G., Hernández, C., Rico, F., Domínguez, F., Martínez, E., Martínez, E., & Martínez, C. (2015). Efecto de la luz led de alta intensidad sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* L.). *Polibotánica*(40), 199-212. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682015000200013&lng=es&tlng=es.

Pedraza, M. (2017). Propagación Masiva de Orquídeas (Orchidaceae); una Alternativa de Conservación de especies Silvestres,. *Agroproductividad*, 6(10), 31-36. Obtenido de https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2017/AGROPRODUCTIVIDAD_VI-2017.pdf

Pedroza, J., & Caballero, M. (2009). Evaluación del efecto del medios MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchatia Polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 85-104. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-34752009000200010&lng=en&nrm=is&tlng=es

Perea, M. (2009). *Cultivo de tejidos Vegetales In vitro*. Bogotá: Proceditor Ltda. Obtenido de http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf

Pérez, J., Blanco, T., García, L., Veitia, N., Bermúdez, I., Collado, R., . . . Romero, C. (2012). Influencia del tipo e intensidad de luz en la formación y multiplicación de embriones somáticos de soya. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 139-146. doi:<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n2/v14n2a15>

Pérez, S., Leyva, N., Magallanes, M., Arce, A., & Méndez, A. (2016). Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de ápices de papa. *Cultivos Tropicales*, 37(4). doi:<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.26063.69284>

Reyes, A., Alejo, J., Ruiz, E., & Tun, J. (2012). Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*, 15(3), 161-165. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126907006>

Rivas, C., Oranday, M., & Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience. doi:<http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>

Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura (Fundamentos y Aplicaciones)*.

Rodríguez, A., Acevedo, G., Rodríguez, J., Rodríguez, B., Cervantes, J., & Castellanos, O. (2011). Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 271-275. doi:10.1007/s11240-010-9815-4

Rojas, S., Garcia, J., & Alarcón, M. (2004). *Propagación Asexual de Plantas*. Corpoica. Obtenido de

https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/17056/41359_27553.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Salazar, S., Amaya, A., & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de Phalaenopsis (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97-105. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77629802012>

Salgado, J., & Peñaranda, L. (2019). Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción *in-vitro* de orquídeas. *Revista Colombiana De Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 16-28. Obtenido de <https://www.proquest.com/scholarly-journals/modificaciones-en-medios-de-cultivo-aplicadas/docview/2232652450/se-2>

Sanchez, M., & Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 21-26. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/27790780_Control_of_oxidation_and_contamination_of_f_strawberry_Fragaria_X_ananassa_Duch_cultivated_in_vitro

Sedano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. (2015). Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 451-456.

Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Manual de Propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. *Plantas de Probeta*. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__pdf-PDFA.pdf?sequence=1

Stefanel, C., Silveria, L., Dutra, L., Machado, S., & Buuron, K. (2020). Diodos emisores de luz (LEDS) no cultivo *in vitro* de Eugenia involucrata. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 40. doi:<https://doi.org/10.4336/2020.pfb.40e201901930>

Tavares, F., Pasqual, M., Castro, E., Dignart, S., Biagiotti, G., & Padovani, J. (2009). Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. *Ciência e Agrotecnologia*, 502-508. Obtenido de <https://www.scielo.br/j/cagro/a/KRQH6RWCr5SnX6bdKMM6VDM/?format=pdf&lang=pt>

Tejeda, O., Téllez, M., & Trejo, L. (2017). Características Ornamentales de Orquídeas Silvestres y su Propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable ex situ. *Agroproductividad*, 10(6), 37-45. Obtenido de https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2017/AGROPRODUCTIVIDAD_VI-2017.pdf

Téllez, M., Escobar, J., & Tejeda, O. (2017). Estado y Conservación de Orquídeas Silvestres (Orchidaceae). *Agroproductividad*, 10(6), 3-12. Obtenido de https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2017/AGROPRODUCTIVIDAD_VI-2017.pdf

Tirado, J., Naranjo, E., & Atehortúa, L. (2005). Propagación *in vitro* de Phalaenopsis (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(1), 25-31. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77670104>

Uribe, M., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., & Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Botánica*, 69(1), 105-112. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/gbot/v69n1/art10.pdf>

Zahara, M., Datta, A., Boonkorkaew, P., & Mishra, A. (2017). Los efectos de diferentes medios, concentraciones de sacarosa y aditivos naturales en el crecimiento de plántulas de Phalaenopsis Hybrid 'Pink'. *Ciencia y Tecnología de Alimentos/Piensos*, 60. doi:<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160149>

ANEXOS

Fotografías de los materiales usados en la preparación del medio de cultivo



Figura A 1: Agar-Agar utilizado para la preparación del medio de cultivo.

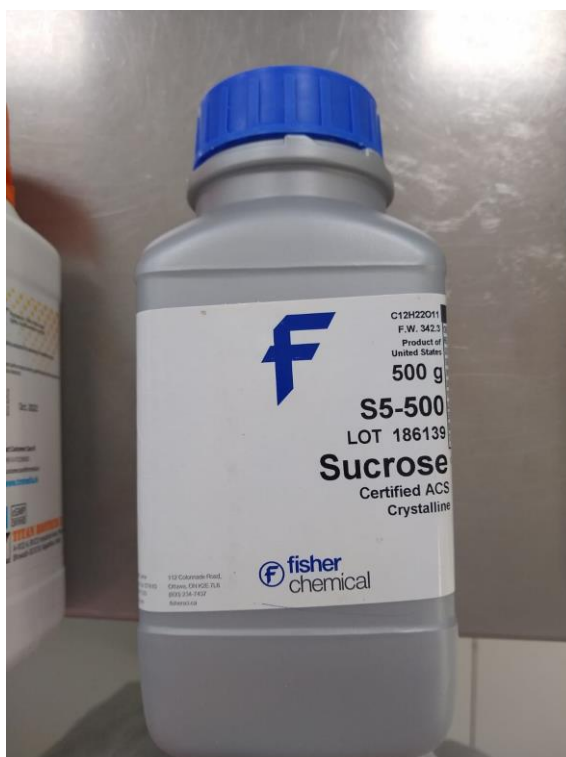


Figura A 2: Marca comercial de sacarosa para preparación del medio de cultivo.

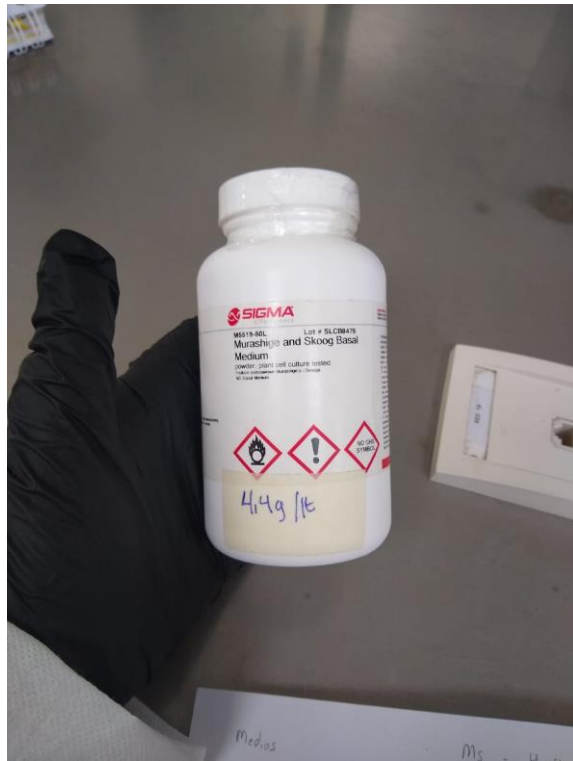


Figura A 3: Murashige y Skoog sales minerales para preparación del medio de cultivo.



Figura A 4: Pesaje de los elementos utilizados para la preparación del medio,

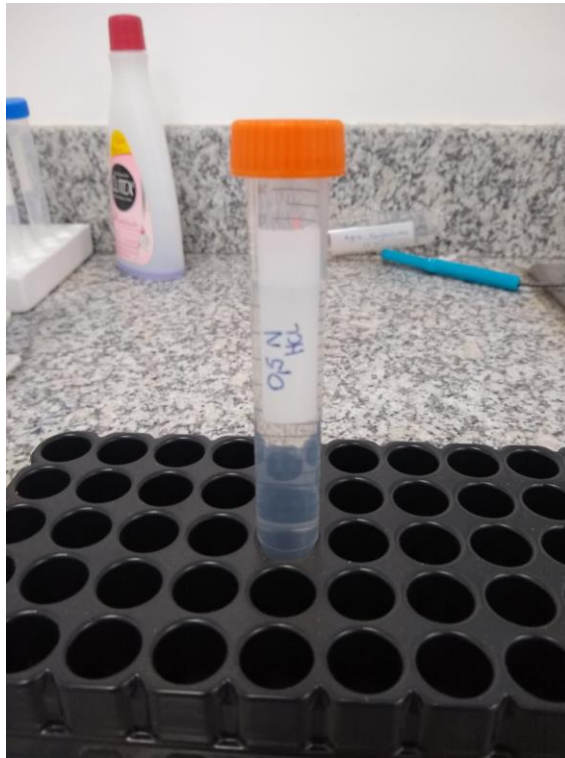


Figura A 5: Ácido Clorhídrico.



Figura A 6: Hormonas BAP y ANA.



Figura A 7: Disolución de las hormonas con ácido clorhídrico al 0,5 N.

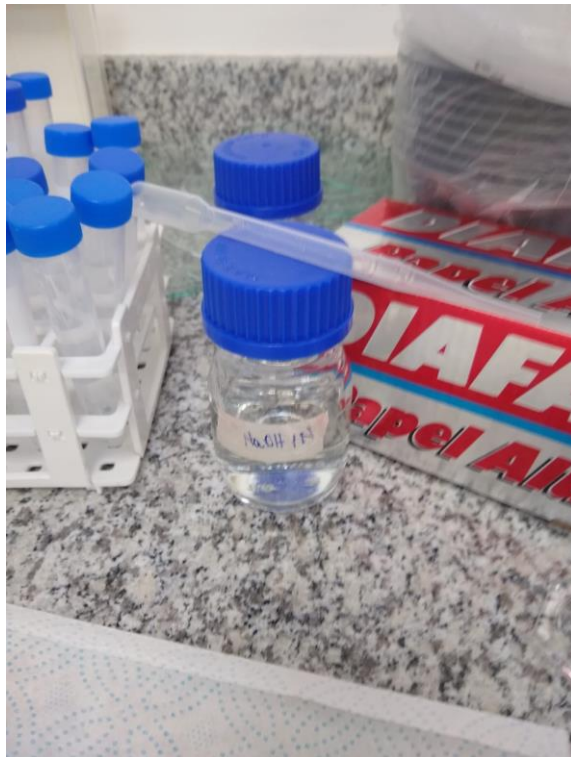


Figura A 8: Hidróxido de sodio 0.5 N.



Figura A 9: Frasco que se utilizarón para la colocación del medio de cultivo.



Figura A 10: Frascos esterilizados y etiquetados.



Figura A 11: Enfriamiento de frascos previos a la etiquetación.

Fotografías de los materiales usados para la siembra de los plantines



Figura A 12: Siembra de plantines in vitro de Phalaenopsis.



Figura A 13: Preparación de materiales para su esterilización.

Fotografías de los frascos por tratamiento



Figura A 14: Plantín con brotes laterales.



Figura A 15: Plantín grueso con brotes entre hojas.



Figura A 16: Plantín con brotes.



Figura A 17: Plantín con formación de raíces.



Figura A 18: Plantín con oxidación fenólica.



Figura A 19: Plantín con formación de brotes.

Número de Brotes

FECHA: _____

Tratamiento	Descripción	R1		R2		R3		R4	
T1	MS 100% + H1 + Luz Roja-Azul H1MS100LAR								
T2	MS 100% + H1 + Luz Blanca H1MS100LB								
T3	MS 100% + H2 3mg-L + Luz Roja-Azul H2MS100LAR								
T4	MS 100% + H2 + Luz Blanca H2MS100LB								
T5	MS 100% + H3 + Luz Roja-Azul H3MS100LAR								
T6	MS 100% + H3 + Luz Blanca H3MS100LB								
T7	MS 50% + H1 + Luz Roja-Azul H1MS50LAR								
T8	MS 50% + H1+ Luz Blanca H1MS50LB								
T9	MS 50% + H2 + Luz Roja-Azul H2MS50LAR								
T10	MS 50% + H2 + Luz Blanca H2MS50LB								
T11	MS 50% + H3 + Luz Roja-Azul H3MS50LAR								
T12	MS 50% + H3 + Luz Blanca H3MS50LB								

Figura 2. Matriz usada en la toma de datos de inducción de brotes

Autorización de publicación en el repositorio institucional



Universidad
Católica
de Cuenca

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

CÓDIGO: F – DB – 30

VERSION: 01

FECHA: 2022-04-18

Página 1 de 1

Cintya Karina Encalada Rhea portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105127484**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Inducción hormonal (BAP-ANA) de brotes en plantines in vitro de Phalaenopsis bajo dos espectros de luz y dos concentraciones de Murashige Skoog”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **20 de abril de 2022**

F: 

Cintya Karina Encalada Rhea

C.I. 0105127484