



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE LA ORQUÍDEA *Dracula vampira*”

Trabajo de Titulación Previa a la Obtención del Título de  
Ingeniero en Biotecnología

AUTOR:

ADRIÁN DAVID TORRES YÁNEZ

DIRECTORA:

Silvia Montes Cruz PhD.

Ibarra – Ecuador

JULIO 2019

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EMBRIOGÉNESIS  
SOMÁTICA DE LA ORQUÍDEA *Dracula vampira*”

Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor; por lo cual, se autoriza su presentación  
como requisito parcial para obtener el Título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

APROBADA:

SILVIA MONTES PhD.

**DIRECTORA**

FRANKLIN SÁNCHEZ MSc

**ASESOR**

LUCÍA VÁSQUEZ MSc.

**ASESORA**

CRISTINA ECHEVERRÍA PhD.

**ASESORA**



## UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

### BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN

### A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

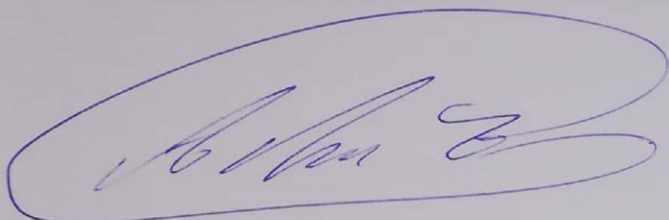
DATOS DE CONTACTO			
<b>CÉDULA DE DENTIDAD:</b>	1003604046		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Torres Yáñez Adrián David		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Ibarra, Galo Plaza 10-102 y Dolores Gómez		
<b>EMAIL:</b>	adtorresy@outlook.com		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	(06)2660270	<b>MÓVIL:</b>	0986367091
DATOS DE LA OBRA			
<b>TÍTULO:</b>	ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA DE LA ORQUÍDEA <i>Dracula vampira</i> .		
<b>AUTOR:</b>	TORRES YÁNEZ ADRIÁN DAVID		
<b>FECHA:</b>	11 de Julio del 2019		
<b>PROGRAMA:</b>	PREGRADO		
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniero en Biotecnología		
<b>DIRECTOR:</b>	Silvia Montes PhD.		

## 2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 11 días del mes de Julio de 2019

**EL AUTOR:**



ADRIÁN DAVID TORRES YÁÑEZ

## **PRESENTACIÓN**

Yo, ADRIÁN DAVID TORRES YÁNEZ como autor de la Tesis Titulada **“ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE LA ORQUÍDEA *Dracula vampira*”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por nunca abandonarme y aún en mis días más oscuros iluminarme.

A mi directora, Doctora Silvia Montes por su guía y motivación desde el inicio de mis actividades en el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A mis asesores, doctora María Cristina Echeverría, magister Lucía Vásquez y magister Franklin Sánchez, por su ayuda y la aplicación de sus conocimientos durante el desarrollo de mi trabajo de titulación.

A mis padres, Luis y Ana quienes por su amor confianza y apoyo no dejaron que me rinda ni en las más difíciles situaciones.

A la Ingeniería Evelyn Gómez por su ayuda en el desarrollo y formulación de medios de cultivo.

A la doctora Luz Marina Pereira y al doctor Juan Carlos García por su guía y colaboración en el desarrollo del diseño experimental y redacción del documento de trabajo de titulación respectivamente.

A los señores David Blanco y Darwin Pasquel por su amistad y capacitación en el proceso de histología.

A todos quienes forman parte del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte por la ayuda prestada.

Adrián

## **DEDICATORIA**

A Alexandra, mi esposa por el cariño, comprensión e inspiración que me brinda durante todos estos años, quien ha sido y será el motor de esta y futuras investigaciones.

Adrián

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
RESUMEN .....	XIV
ABSTRACT .....	XVI
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo General.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos .....	3
CAPITULO II.....	4
REVISIÓN LITERARIA .....	4
2.1 Género <i>Dracula</i> .....	4
2.1.1 <i>Dracula vampira</i> .....	4
2.1.1.1 Descripción botánica .....	5
2.2 Reproducción de orquídeas .....	6
2.2.1 Biología de la germinación de las orquídeas .....	7
2.2.1.1 Germinación asimbiótica de orquídeas.....	7
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> .....	8
2.3.1 Selección de plantas madre .....	8
2.3.2 Desinfección de explantes .....	9
2.3.4 Siembra de explantes .....	9
2.3.5 Crecimiento .....	9
2.3.6 Aclimatación.....	9
2.3.7 Medios de cultivo .....	10
2.3.7.1 Reguladores de crecimiento.....	10
2.3.7.1.1 Auxinas.....	10
2.3.7.1.2 Citoquininas.....	11
2.3.7.1.3 Giberelinas.....	11
2.4 Micropropagación de orquídeas .....	11
2.4.1 Morfogénesis .....	12



2.4.2 Organogénesis .....	12
2.4.3 Embriogénesis somática .....	12
2.4.3.1 Embriogénesis somática directa .....	13
2.4.3.2 Embriogénesis somática indirecta - Inducción y cultivo de callo .....	13
2.4.3.2.1 Fases de la embriogénesis somática indirecta .....	13
2.4.4.2.2 Factores que afectan el cultivo de tejidos vía embriogénesis somática.....	14
2.5 Histología .....	14
2.5.1 Técnicas Histológicas .....	15
2.5.1.1 Fijación .....	15
2.5.1.2 Deshidratación .....	16
2.5.1.3 Infiltración .....	16
2.5.1.4 Seccionamiento en micrótomo .....	16
2.5.1.5 Desparafinado, rehidratación y tinción.....	16
2.5.1.6 Montaje.....	17
CAPITULO III .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Caracterización del área de estudio .....	18
3.2 Obtención del material biológico .....	18
3.2.1 Disección de la flor.....	19
3.3 Selección y desinfección de hojas .....	20
3.4 Preparación de medios de cultivo.....	23
3.6 Siembra de explantes foliares en medio de cultivo .....	24
3.7 Siembra de protocormos en medio de formación de callo .....	25
3.8 Técnicas Histológicas .....	25
3.8.1 Fijación .....	26
3.8.2 Deshidratación .....	26
3.8.3 Infiltración .....	26
3.8.4 Inclusión .....	26
3.8.5 Corte .....	27
3.8.6 Desparafinado, hidratación y tinción.....	27
3.8.7 Preparación de placas permanentes .....	27
3.8.8 Observación y caracterización de tejidos. ....	28
3.9 Análisis estadístico .....	28

CAPÍTULO IV .....	29
RESULTADOS .....	29
4.1 Resultados obtenidos al analizar la oxidación de explantes por efecto de la desinfección. .....	29
4.2 Contaminación.....	31
4.3. Formación de callo de cicatrización en segmentos foliares .....	32
4.4 Formación de callo embriogénico en segmentos foliares.....	33
4.5 Supervivencia de segmento foliares en el día 35.....	34
4.6 Desarrollo de callo embriogénico en protocormos.....	35
4.7 Caracterización histológica.....	38
4.7.1 Explante inicial Día 1 .....	38
4.7.2 Masas de callo .....	40
4.7.3 Desarrollo de embriones.....	43
4.7.2 Embrión con primordios foliares .....	45
CAPÍTULO V .....	46
DISCUSIÓN.....	46
CAPÍTULO VI.....	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	49
6.1 Conclusiones.....	49
6.2 Recomendaciones .....	49
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	51
ANEXOS .....	58
ANEXO 1. Registro de peso de los explantes .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 FLOR.....	5
FIGURA 2 ILUSTRACIÓN DE LA DISECCIÓN FLORAL .....	6
FIGURA 3 CÁPSULA DE ORQUÍDEA SIN ABRIR, PREVIO A LA SIEMBRA DE SEMILLAS <i>IN VITRO</i> ..	7
FIGURA 4 CÁPSULA ABIERTA DE ORQUÍDEA CON SEMILLAS INMADURAS .....	8
FIGURA 5 PLANTAS DE ORQUÍDEA <i>IN VITRO</i> .....	12
FIGURA 6 FLOR PREVIO A L DISECCIÓN.....	18
FIGURA 7 FLOR CORTADA EN PLACA DE DISECCIÓN .....	19
FIGURA 8 ESTRUCTURA REPRODUCTIVA - VISTA FRONTAL.....	18
FIGURA 9 ESTRUCTURA REPRODUCTIVA - VISTA LATERAL.....	19
FIGURA 10 LABELO.....	19
FIGURA 11 A: COLUMNA, B: ANTERA Y C: ESTIGMA .....	20
FIGURA 12 COLUMNA CON POLÍNEOS.....	19
FIGURA 13 PÉTALOS BIVALVOS .....	20
FIGURA 14 HOJAS SELECCIONADAS .....	21
FIGURA 15 LAVADO DE HOJAS CON DETERGENTE .....	22
FIGURA 16 DESINFECCIÓN DE HOJAS .....	22
FIGURA 17 ESQUEMA DE INTRODUCCIÓN DE EXPLANTES EN MEDIO DE CULTIVO .....	24
FIGURA 18 SIEMBRA DE PROTOCORMOS EN MCE .....	25
FIGURA 19 COMPARACIÓN DE NÚMERO DE EXPLANTES OXIDADOS POR TRATAMIENTO .....	29
FIGURA 20 COMPARACIÓN DE EXPLANTES CONTAMINADOS Y NO CONTAMINADOS POR TRATAMIENTO.....	31
FIGURA 21 RECUENTO DE SEGMENTOS FOLIARES CON CALLO DE CICATRIZACIÓN .....	33
FIGURA 22 RECUENTO DE SEGMENTOS FOLIARES CON CALLO EMBRIOGÉNICO .....	33
FIGURA 23 PORCENTAJES DE SUPERVIVENCIA Y VIABILIDAD .....	34
FIGURA 24 CALLO AL DÍA 35.....	33
FIGURA 25 EXPLANTES MUERTOS DÍA 35.....	34
FIGURA 26 GRÁFICO Q-Q NORMAL .....	35
FIGURA 29 PROTOCORMO SECCIONADO.....	35
FIGURA 30 PROTOCORMO CON CALLO EN FORMACIÓN .....	36
FIGURA 31 CALLO EMBRIOGÉNICO.....	36
FIGURA 32 CALLO FRIABLE CON EMBRIONES .....	37

FIGURA 33 DIAGRAMA DE CAJAS Y BIGOTES PARA PESO FRESCO DÍA 28 .....	38
FIGURA 34 CORTE TRANSVERSAL DE EXPLANTE INICIAL .....	38
FIGURA 35 CORTE TRANSVERSAL EXPLANTE INICIANDO FORMACIÓN DE CALLO .....	39
FIGURA 36 CORTE LONGITUDINAL DE PORCIÓN DE CALLO Y PROTOCORMO .....	39
FIGURA 37 CORTE TRANSVERSAL DE MASA DE CALLO AL DÍA 21 8 $\mu$ M .....	40
FIGURA 38 CORTE TRANSVERSAL DE MASA DE CALLO 8 $\mu$ M .....	40
FIGURA 39 CORTE TRANSVERSAL DE CALLO EMBRIOGÉNICO AL DÍA 35 .....	41
FIGURA 40 CORTE TRANSVERSAL DE CALLO EMBRIOGÉNICO.....	41
FIGURA 41 CORTE TRANSVERSAL DE CALLO CON EMBRIONES AL DÍA 49 .....	42
FIGURA 42 CORTE LONGITUDINAL DE CALLO EMBRIOGÉNICO AL DÍA 56 .....	42
FIGURA 43 CORTE LONGITUDINAL DE EMBRIÓN INICIAL .....	43
FIGURA 44 CORTE LONGITUDINAL DE EMBRIÓN AL DÍA 70 DE LA SIEMBRA .....	43
FIGURA 45 CORTE LONGITUDINAL DE EMBRIÓN (PLB).....	44
FIGURA 46 CORTE LONGITUDINAL DE EMBRIÓN SOMÁTICO (PLB) .....	44
FIGURA 47 CORTE LONGITUDINAL DE EMBRIÓN EN FASE TORPEDO.....	45
FIGURA 48 CORTE LONGITUDINAL DE PLB CON BROTES FOLIARES .....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 . FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA .....	14
TABLA 2 TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN.....	23
TABLA 3 MEDIO DE INCUBACIÓN (MI) .....	23
TABLA 4 MEDIO DE FORMACIÓN DE CALLO Y EMBRIONES (MCE).....	24
TABLA 5 FIJADOR FAA .....	26
TABLA 6 PORCENTAJES DE OXIDACIÓN .....	29
TABLA 7 PRUEBA CHI CUADRADO OXIDACIÓN.....	30
TABLA 8 MEDIDAS SIMÉTRICAS OXIDACIÓN .....	30
TABLA 9 PORCENTAJES DE CONTAMINACIÓN.....	31
TABLA 10 CHI CUADRADO CONTAMINACIÓN.....	32
TABLA 11 MEDIDAS SIMÉTRICAS CONTAMINACIÓN .....	32
TABLA 12 PRUEBA DE NORMALIDAD KOLMOGOROV-SMIRNOV PESO DÍA 28 .....	35
TABLA 13 PRUEBA DE LEVENE .....	36
TABLA 14 PESO FRESCO AL DÍA 28 RESUMEN .....	36

## RESUMEN

*Dracula vampira* es una especie endémica del Ecuador, muy valorada en el comercio ornamental, la dificultad de germinación y el lento desarrollo de las semillas, dificultan su propagación. La embriogénesis somática, se plantea como una alternativa para su reproducción in vitro, se requieren procesos de: selección de explantes, desinfección, y multiplicación para la obtención de embriones, así como también la caracterización histológica del proceso. El material biológico, para esta investigación fueron secciones foliares y protocormos de *Dracula vampira*, que se obtuvieron de plantas *in vivo* e *in vitro* respectivamente. A las hojas previamente seleccionadas de plantas sanas y vigorosas, se les realizó un lavado con detergente y en el proceso de desinfección se utilizó NaClO en distintas concentraciones (v/v) y tiempos de exposición: 0,5% durante 20 min, 1 y 2% con exposición de 15, 20 y 25 min cada uno. Se procedió a cortar las hojas en porciones de 1cm<sup>2</sup> aproximadamente y se colocó 1 explante por tubo con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo y se incubó en oscuridad. La introducción de los explantes se realizó en medio ½ Murashige & Skoog modificado sin reguladores de crecimiento adicionado con cisteína (25 mgL<sup>-1</sup>), peptona 1000 (mgL<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (170mgL<sup>-1</sup>), gelrite (2 gL<sup>-1</sup>) y sacarosa (20 gL<sup>-1</sup>) a los 7 días se evaluaron, la contaminación y supervivencia de los explantes. Se utilizaron 24 repeticiones por tratamiento y se realizó un análisis descriptivo a través de tablas de contingencia y la prueba de chi cuadrado de Pearson. La exposición de los explantes a NaClO al 0,5%, durante 20 minutos fue la más adecuada para garantizar la supervivencia del tejido, sin embargo, todos los tratamientos resultaron idóneos para el proceso de desinfección. Las secciones foliares no prosperaron en ningún medio suplementado con fitohormonas después de los 28 días y tampoco se observó el crecimiento del callo de cicatrización por lo cual no se consideró viable el uso de este material para la obtención de embriones somáticos. Se utilizaron protocormos como segunda fuente de explante, estos se obtuvieron a partir de la germinación de semillas *in vitro* y al provenir de un medio estéril no fue necesario un proceso de desinfección para el desarrollo del experimento. Explantes de aproximadamente 4 meses de edad, fueron subcultivados en medio de formación de callo y embriones, en total se utilizaron 9 tratamientos con distintas concentraciones de citoquininas y auxinas (BAP, 2-4D y NAA), un tratamiento control sin reguladores de crecimiento y 12 repeticiones por tratamiento, para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA y se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. El medio basal fue

½ Murashige & Skoog, modificado. El tratamiento 5 que contenía 2-4D (2 mg L<sup>-1</sup>) y BAP (2 mgL<sup>-1</sup>) fue el más adecuado, en la prueba de rangos múltiples de Duncan presentó diferencias estadísticamente significativas con varios tratamientos, un mayor valor del peso fresco medio y se observó la presencia de callo embriogénico friable en todos los explantes evaluados. Los explantes se cultivaron en oscuridad durante 56 días, posteriormente se expusieron a un fotoperíodo de 16h luz para estimular el desarrollo de los embriones. En el proceso de embriogénesis somática, se tomaron muestras cada 7 días, desde el subcultivo de los protocormos, hasta la obtención de embriones somáticos, para la observación de tejidos. Se observó que el proceso de embriogénesis somática a partir de protocormos tarda 100 días desde la introducción del protocormo en medio de cultivo y la producción de embriones somáticos inicia en el día 28 observando el crecimiento de las estructuras embrionarias.

**PALABRAS CLAVES:**

Callo, desinfección, embriogénesis somática, explantes, histología , orquídea, protocormos

## ABSTRACT

*Dracula vampira* is an endemic species from Ecuador, its valued in the ornamental field, the difficulty of germination and the slow development of seeds, hinder its propagation. Somatic embryogenesis is considered as an alternative for *in vitro* reproduction. It's necessary develop process of selection of explants, disinfection, and multiplication are required to obtain embryos, as well as the histological characterization. Leaf sections and protocorms from *Dracula vampira* were used as explants. Healthy and vigorous leaves were collected and washed with detergent before disinfection with NaClO in different concentrations (v / v) and exposure time: 0.5% by 20 min, 1 and 2% with 15, 20 and 25 min each one. Leaves were cut in portions 1cm<sup>2</sup> and 1 explant per tube were incubated in darkness. Explants were culture in ½ Murashige & Skoog medium modified without growth regulators and cysteine (25 mgL<sup>-1</sup>), Peptone (1000 mgL<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (170mgL<sup>-1</sup>), gelrite (2 gL<sup>-1</sup>) and sucrose (20 gL<sup>-1</sup>) after 7 days contamination and survival of the explants were evaluated, 24 repetitions per treatment were used and a descriptive analysis was performed through contingency tables and Pearson's chi-squared test. Exposure of the explants to 0.5% NaClO for 20 minutes was the best treatemente to guarantee the survival of the samples, however, all the treatments were suitable for the disinfection process. Foliar sections did not develop callus in any medium supplemented with phytohormones after 28 days, so the use of this material was not considered viable. Protocorms were used as second source of explant, these are obtained from germination of seeds *in vitro* in a sterile medium, a disinfection process was not necessary for the development of the experiment. Explants of approximately 4 months of age were subcultured in callus and embryo formation, in total 9 treatments were used with different concentrations of cytokinins and auxins (BAP, 2-4D and NAA), a control treatment without regulators and 12 repetitions per treatment, for the statistical analysis an ANOVA and Duncan's multiple comparisons was used. Basal medium was ½ Murashige & Skoog, modified. Treatment 5 that contained 2-4D (2 mg L<sup>-1</sup>) and BAP (2 mgL<sup>-1</sup>) was the better concentrations. In the Duncan multiple range test presented statistically significant differences, a higher value of fresh weight medium and the presence of friable embryogenic callus was observed in all evaluated explants. Protocorms were grown 56 days in darkness and 44 days with 16h in light. Samples were taken every 7 days, to analyze tissues. Process of somatic embryogenesis from protocorms takes 100 days from the introduction of explants



in culture medium, the production of somatic embryos begins on day 28 with cells of large nuclei forming tetrads.

**KEY WORDS**

Callus, disinfection somatic embryogenesis, explants, histology, orchid, protocorms

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Ecuador, es un país megadiverso con gran variedad de especies vegetales endémicas entre las cuales se encuentran las orquídeas. Posee 4 de las 5 subfamilias existentes en el mundo con 4032 registradas (Islam & Bhattacharjee, 2015). La familia Orchidaceae representa el 37,9 % de plantas nativas, con 1709 hasta el año 2011, están en distintos niveles de riesgo debido a la contaminación, el cambio climático, la expansión de la frontera agrícola o el comercio ilegal (Yáñez et al., 2011).

Las orquídeas, son plantas apreciadas debido a sus floraciones de larga duración y variedad de características morfológicas (Endara, Grimaldi, & Roy, 2010). *Dracula vampira*, es una planta localizada en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha, al oeste de la cordillera de los andes donde es localmente abundante (Pupulin, Merino, & Medina, 2009); está catalogada en estado vulnerable debido a la reducción de su hábitat (Yáñez et al., 2011).

Las semillas de las orquídeas, no poseen reservas de nutrientes y requieren la asociación con un hongo micorriza para su correcto desarrollo (Kaur & Bhutani, 2013). Esta asociación suele ser muy específica y muchas germinan en presencia de un hongo en particular que dependerá de la orquídea y el hábitat de donde provenga (Novak, Luna, & Gamage, 2014).

La dificultad de propagar masivamente orquídeas hizo que estas plantas alcanzaran elevados costos en su comercialización (Chugh, Guha, & Rao, 2009). Lewis Knudson, desarrolló un método para la propagación asimbiótica de semillas de orquídea, que consistía en colocar azúcares, nutrientes, gelificantes y las semillas en un frasco de vidrio, debido a la presencia de estos elementos, no se requerían la presencia del hongo (Knudson, 1922).

El proceso de germinación asimbiótica, se sigue utilizando como método básico de producción de plantas a gran escala (Huang, Tsai, Cheng, Chen, & Chen, 2014). La micropropagación, puede tener distintos objetivos como: comercialización ornamental, producción de nuevas variedades, conservación *ex situ* y reintroducción de especies (Arditti, 2008). Las desventajas, de este método son el largo tiempo (3-5 años) que conlleva hasta la obtención de ejemplares adultos en estado reproductivo y la alta

variabilidad morfofisiológica en el desarrollo de las plantas debido a la fecundación cruzada (Zeng et al., 2016).

La embriogénesis somática, se presenta como una alternativa para la obtención de plantas en menor tiempo y en mayor cantidad que las obtenidas a partir de semillas. Se requiere la introducción de explantes viables y la estimulación con reguladores de crecimiento para la producción de embriones somáticos (Da Silva, 2013). Esto garantiza homogeneidad y reducción del tiempo en la cadena de producción (Conger, Novak, Afza, Erdelsky, 1987).

Se puede utilizar cualquier tejido susceptible a estímulos fitohormonales como fuente de explante, sin embargo, en el caso de las orquídeas se recomienda el uso protocormos, debido a la abundancia de células meristemáticas (Chugh et al., 2009). Estos son una fase de desarrollo del embrión cigótico después de su germinación y previo a la formación de una planta, consisten en una estructura con forma esférica no uniforme, el cual responde rápidamente a la presencia de reguladores de crecimiento (Novak et al., 2014a).

La inducción de embriones somáticos, puede ser directa desde el explante o indirecta, previa formación de callo para obtener mayor cantidad de tejido embriogénico (Williams & Maheswaran, 1986a). Las células son totipotenciales y se puede regenerar una planta a partir de cada célula (Petru, 1970). Se requiere una adecuada concentración de fitohormonas para inducir el crecimiento del tejido embrionario, debido a que una concentración no adecuada puede provocar oxidación, muerte o inhibición del desarrollo (Tisserat, Esan, & Murashige, 1979).

Durante la embriogénesis somática, se producen cambios en el explante, y solo determinados tejidos son capaces de formar callo y embriones, debido al contacto con las hormonas, la edad del tejido, la velocidad de crecimiento de sus estructuras y la transformación de las células especializadas en embriones (Poobathy, Sinniah, Rathinam, & Subramaniam, 2013). El registro de estos cambios permitió descubrir el origen de las células embrionarias y el momento de aparición de las mismas, esto se realizó a través de observaciones histológicas desde la introducción del explante, hasta la obtención de los embriones (Poobathy et al., 2013).

El objetivo de la presente investigación fue, establecer una metodología para la embriogénesis somática de la orquídea *Dracula vampira* y su micropropagación acelerada.

El desarrollo de esta metodología ofrece una alternativa al procedimiento tradicional de propagación por semillas al obtener plantas en menor tiempo. Esta información será útil para la propagación comercial de esta especie, la conservación ex situ, y en futuras investigaciones relacionadas a la micropropagación del género *Dracula*, así como propiciar variabilidad genética con el fin de la obtención de genotipos de interés únicos.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo General**

Establecer una metodología para la embriogénesis somática de la orquídea *Dracula vampira*

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Seleccionar el método de desinfección que propicie el control de patógenos y supervivencia del explante.
- Definir la composición adecuada del medio de cultivo para la formación de callo y embriones.
- Caracterizar de forma histológica los tejidos obtenidos, durante el proceso de embriogénesis somática.

## CAPITULO II

### REVISIÓN LITERARIA

#### **2.1 Género *Dracula***

Las orquídeas *Dracula* se encontraban descritas erróneamente en el género *Masdevallia*, sin embargo, se determinó que debían ser clasificadas en un grupo diferente, recibieron esta denominación del latín “*dracus*”, debido a los espolones que salían de sus sépalos (Luer, 1978). Son orquídeas con un alto valor ornamental y conocidas desde que el profesor Heinrich Gustav Reichenbach describió a *Masdevallia chimaera* en 1872 (Pupulin et al., 2009).

Estas plantas tienen un rizoma corto, no poseen pseudobulbos y cada tallo desarrolla una hoja grande y delgada con una nervadura central definida (Endara et al., 2010). Las varas florales, son erectas y se desarrollan hacia la base del sistema radicular, además las flores poseen una forma triangular y los sépalos presentan apéndices alargados, sus pétalos son pequeños y gruesos (Pupulin et al., 2009). El labelo, es pequeño, con su parte basal hendida también llamada hipochilo, la zona terminal se denomina epichilo es redondeada y cóncava. La columna, pequeña y bien desarrollada, presenta 2 polineas que guardan el polen compactado (Luer, 1978).

#### **2.1.1 *Dracula vampira***

*Dracula vampira* fue recolectada por primera vez por el político y docente Benigno Malo, a una elevación de 2000 m.s.n.m en la provincia de Pichincha, la descripción botánica se realizó en 1978 por Carlyle Luer. Su distribución se observa en los bosques montanos de las provincias de Imbabura y Pichincha siendo catalogada en estado vulnerable por las amenazas a su hábitat (Yáñez et al., 2011). Esta planta posee un alto valor comercial, debido a que también es utilizada como patrón para el desarrollo de nuevos híbridos y variedades (Pupulin et al., 2009).



**Figura 1** Flor de *Dracula vampira*

**Fuente:** El Autor

### **2.1.1.1 Descripción botánica**

**Nombre científico:** *Dracula vampira*

**Nombre común:** Cara de mono negra/ El vampiro negro/ Orquídea negra

**Reino:** *Plantae*

**Orden:** *Asparagales*

**Familia:** *Orchidaceae*

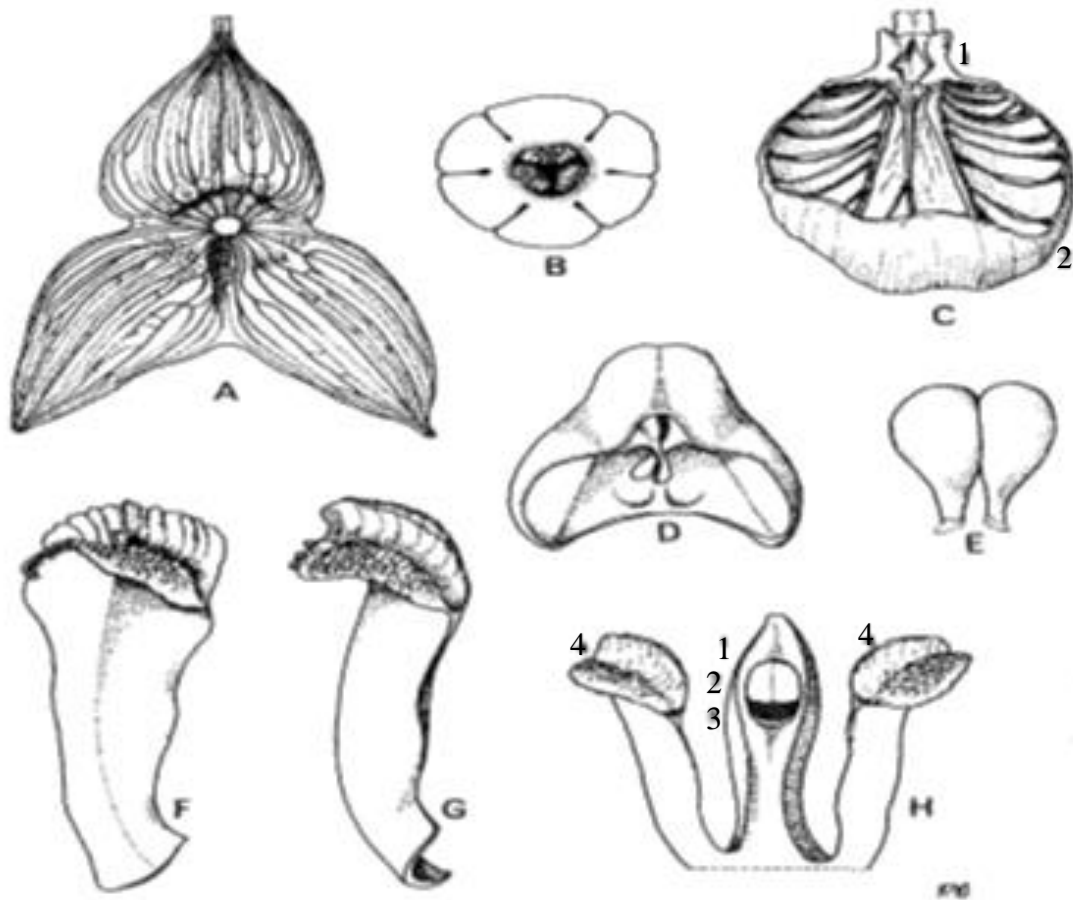
**Subfamilia:** *Epidendroidae*

**Tribu:** *Epidendrae*

**Subtribu:** *Pleurothallidinae*

**Género:** *Dracula*

(Luer, 1978)



A.1 Sépalos con la cola removida. B.- Ovario, sección transversal. C.-Labelo (C1: Hipochilo, C2: Epichilo. D.- Capa de la antera. E.- Polineos. F&G.- Pétalos bivalvos. H.- Columna y Pétalos desde abajo (H1.- Columna H2.- Capa de la antera H3.- Estigma H4.- Pétalos)

**Figura 2** Ilustración de la disección floral de *Dracula vampira*

(Endara et al., 2010)

## 2.2 Reproducción de orquídeas

Las orquídeas, pueden propagarse de forma sexual y asexual. La reproducción sexual requiere la polinización de la flor por parte de un insecto, este insecto suele ser específico para algunas orquídeas y solo ha evolucionado para polinizar una determinada especie o un determinado género de orquídeas, también se suele realizar su polinización manual sin la presencia del insecto, sin embargo se requiere gran destreza y habilidad para lograrlo

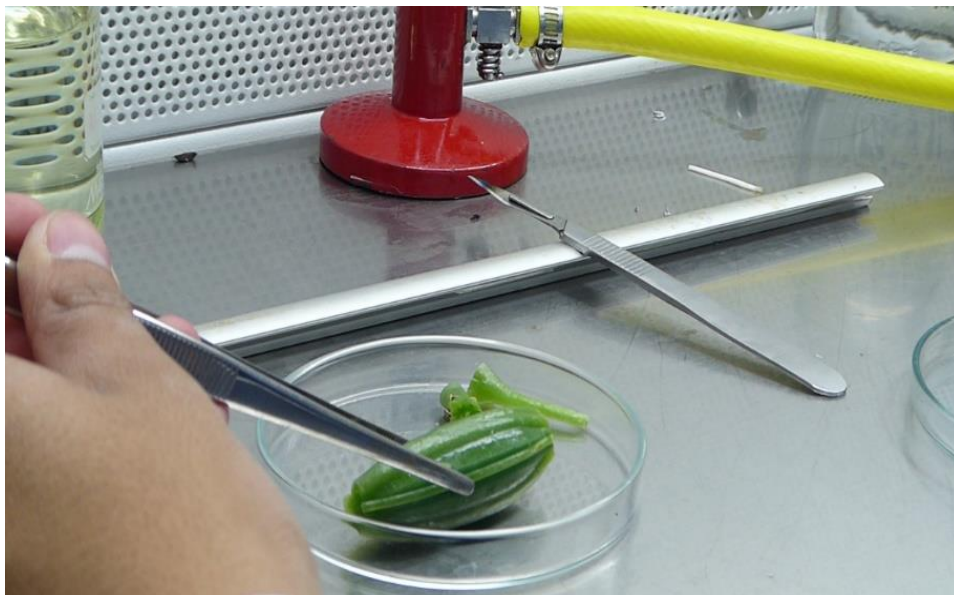
(Endara et al., 2010). La forma asexual es menos frecuente en la naturaleza pero es utilizada por cultivadores particulares y en pequeños programas de reforestación, consiste en la división del rizoma de la planta madre y el crecimiento de las secciones divididas por separado (Zeng et al., 2014).

### **2.2.1 Biología de la germinación de las orquídeas**

Las cápsulas de las orquídeas contienen miles de semillas y tienen distintos períodos de maduración que oscila entre los 3 y 14 meses dependiendo de la especie (Kaur & Bhutani, 2013). El elevado número de semillas se debe a que carecen de reservas de nutrientes y pueden propagarse fácilmente por el viento debido a su reducido tamaño (Zeng et al., 2016). Se requiere de la asociación con un hongo micorriza que le aporta nutrientes en las primeras etapas de desarrollo de la planta además el hongo suele ser específico para una especie de orquídea, por esta razón el porcentaje de germinación es bajo a comparación con el número de semillas (Lee et al., 2009).

#### **2.2.1.1 Germinación asimbiótica de orquídeas**

En 1922 se desarrolló la germinación asimbiótica de orquídeas en un medio de cultivo estéril y con los nutrientes necesarios para estimular el crecimiento de los embriones (Lewis, 1922).



**Figura 3** Cápsula de orquídea sin abrir, previo a la siembra de semillas *in vitro*

**Fuente:** El Autor





**Figura 4** Cápsula abierta de orquídea con semillas inmaduras

**Fuente:** El Autor

### **2.3 Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* es una de las múltiples aplicaciones de la biotecnología vegetal para la propagación de plantas en condiciones controladas y en espacios pequeños (Rout, Mohapatra, & Jain, 2018). Consiste en la introducción de explantes en un medio de cultivo suplementado con: nutrientes, agua, antioxidantes, vitaminas, minerales, reguladores de crecimiento, un gelificante (opcional) y una fuente de carbono, que estimularán el desarrollo de plantas de pequeño tamaño (Hossain et al., 2013). Esta metodología posee 5 fases: Selección de plantas madre, desinfección, siembra en medio de cultivo, crecimiento y aclimatación.

#### **2.3.1 Selección de plantas madre**

Los individuos que actuarán como donantes de los tejidos utilizados en el cultivo *in vitro* son seleccionados ya sea en campo o invernadero (Liao, Tsai, Sun, Lin, & Wu, 2011). Las plantas madre deben ser vigorosas, sin infecciones de ningún tipo y con alta producción en su cultivo (Lee & Chen, 2014).

### **2.3.2 Desinfección de explantes**

Es la fase más compleja, se necesita establecer un protocolo que se caracterice por su alta repetibilidad, con ello se disminuye la pérdida de material vegetal, en esta fase se reduce la presencia de microorganismos que pudiesen crecer en el medio de cultivo (Marulanda & Isaza, 2004). Se procede a desinfectar las muestras con distintos reactivos, la concentración, el tipo de reactivo y el tiempo de exposición dependerán del explante y el estado de salud de la planta madre. (Conger et al., 1987).

### **2.3.4 Siembra de explantes**

El material vegetal se lleva a una cámara de flujo laminar y se siembra en recipientes como: frascos, tubos de ensayo, recipientes plásticos, entre otros, que contienen medio de cultivo previamente esterilizado (Rout et al., 2018). La densidad de plantación y la concentración de nutrientes dependen del explante, la cantidad de medio de cultivo y el tamaño del frasco, en esta fase se debe trabajar en un ambiente estéril preferiblemente en una cabina de flujo laminar con material de manipulación que garantice la asepsia necesaria. (Hernández et al., 2016).

### **2.3.5 Crecimiento**

En esta fase se da el desarrollo de los explantes, con fotoperiodo, intensidad lumínica y temperatura adecuados al tipo de explante y al objetivo del cultivo (Lee et al., 2009). Los explantes se propagan y reproducen y pueden ser subcultivados cuando se agoten los nutrientes del medio de cultivo o se requiera aplicar una formulación diferente para avanzar en el desarrollo del cultivo (Garro, Monge, Arias, & Valdez, 2008). El cuarto de crecimiento es un área aislada que debe mantenerse en condiciones asépticas y a la cual se debe ingresar con indumentaria adecuada (Da Silva, 2013).

### **2.3.6 Aclimatación**

La aclimatación es necesaria para el desarrollo en campo de los ejemplares, es crítica debido a que una mala práctica puede provocar la pérdida del material obtenido en el cultivo *in vitro*, se aplican compuestos como el metil jasmonato o el ácido salicílico para evitar la evaporación excesiva de agua, es necesario usar sustratos estériles y recipientes

que garanticen un 90% de humedad ambiental a los cuales se les proporcionará ventilación paulatinamente (Rout et al., 2018). El trasplante de las vitroplantas y el establecimiento completo en invernadero puede ser complejo para algunas especies, pues en las plantas “*in vitro*” se producen anomalías, estas se acentúan como resultado de las tasas de evapotranspiración elevadas, ya que pasan de una condición semiheterótrofa a una autótrofa (Montes, Lalama, Echeverría, & Salazar, 2016)

### **2.3.7 Medios de cultivo**

El medio de cultivo contiene los componentes necesarios para el establecimiento y la reproducción de las plántulas y existen diferentes composiciones que se pueden utilizar. El medio basal propuesto por (Murashige & Skoog, 1962) es el más utilizado y en forma general consta de: macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, se pueden adicionar reguladores de crecimiento, fuentes de carbono (azúcar), un gelificante (agar, phytigel, gelrite, gelzan) y en algunos casos antioxidantes. El mismo debe ser esterilizado en una autoclave, a 121 °C con una presión de 1,5atm y un tiempo de exposición de entre 15 y 20 minutos, antes de ser utilizado debido a que pueden desarrollarse organismos patógenos en el medio.

#### **2.3.7.1 Reguladores de crecimiento**

Los reguladores, de crecimiento son moléculas que permiten inducir el crecimiento y desarrollo del explante, pueden ser fitohormonas naturales o sintéticas con compuestos que actúan de igual forma que una hormona (Da Silva, 2012). Estos reguladores de crecimiento, se dividen en auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico, entre otros que inducen la formación de tejidos radiculares, tejidos estructurales, tejidos de elongación y efectos inhibidores, respectivamente pueden ser utilizadas solas o en combinación, dependiendo de la estructura que se requiera, para la embriogénesis somática se usan auxinas y citoquininas (Novak, Luna, & Gamage, 2014b).

##### **2.3.7.1.1 Auxinas**

Las auxinas son fitohormonas que permiten la elongación de las células y se encuentran en mayor concentración en los puntos apicales de la planta y en los períodos de crecimiento, como el Ácido Naftalen Acético (NAA), el 2,4-diclorofenoxiacético (2-4D), el Ácido Indol Butírico o el Ácido Indolacético (IAA), entre otros. Estas tienden a

desarrollar las raíces adventicias y están presentes en el desarrollo temprano de los individuos, desde la formación y germinación del embrión (Novak et al., 2014).

#### **2.3.7.1.2 Citoquininas**

Las citoquininas o citocininas, actúan al promover la división celular, se utilizan principalmente en la inducción de organogénesis y embriogénesis, regulan procesos como la fotosíntesis, la senescencia, la apoptosis y la resistencia a patógenos (Chung, Chen, & Chang, 2005). Entre estas se encuentran la Kinetina (KIN), Benzil-aminopurina (BAP), el Thidiazuron (TDZ) o el 2iP (2 Isopentil-adenina).

#### **2.3.7.1.3 Giberelinas**

Las giberelinas son reguladores de crecimiento de los organismos vegetales que intervienen en procesos de elongamiento, desarrollo de yemas, crecimiento de frutos, flores y en la interrupción de la latencia de las semillas, su acción es contraria a la del ácido abscísico, ácido jasmónico, ácido salicílico (Da Silva, Kerbauy, Zeng, Chen, & Duan, 2013).

#### **2.3.7.1.4 Antioxidantes**

La oxidación u oscurecimiento de los tejidos introducidos, lo que provoca el deterioro de los tejidos y en algunos casos la muerte del explante (Concepción et al., 2005). Los antioxidantes se utilizan para evitar la producción de estos compuestos y mejorar el desarrollo de los tejidos (Montes et al., 2016). Algunos antioxidantes son; la cisteína, el ácido ascórbico, el ácido cítrico, el carbón activado, entre otros.

### **2.4 Micropropagación de orquídeas**

Las orquídeas, se propagan a través de semillas cultivadas en condiciones estériles y con una adecuada concentración de nutrientes, azúcares, vitaminas, fitohormonas y en contenedores herméticos (Kaur & Bhutani, 2013). La micropropagación de orquídeas se puede realizar también por metodologías conocidas como organogénesis y embriogénesis somática: directa e indirecta, para la reproducción de estas plantas (Hossain et al., 2013).



**Figura 5** Plantas de Orquídea *in vitro*

#### **2.4.1 Morfogénesis**

La morfogénesis es el origen y los cambios ocurridos en una forma específica (estructura y organización) de un tejido (Marinucci, Ruscitti, & Abedeni, 2004). Este proceso ocurre tanto en la organogénesis como en la embriogénesis somática.

#### **2.4.2 Organogénesis**

La organogénesis es un proceso de regeneración de estructuras a partir de un explante, se utilizan reguladores de crecimiento para la obtención de estructuras específicas (Plana, Alvarez, Florido, Lara, & Nuñez, 2002). En este proceso no es obligatoria la formación de una planta completa y se suele utilizar en especies de ciclo corto para la obtención masiva de ejemplares. (Marinucci et al., 2004).

#### **2.4.3 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática, es una técnica de micropropagación en la cual se induce la producción de embriones a partir de cualquier célula de la planta (J. Chen & Wei, 2006). Es adecuada para la multiplicación masiva ya que se menciona que de cada célula puede regenerarse una planta completa, gracias a la totipotencialidad que poseen (Arditti, 2008). La ventaja, de esta metodología es que permite la obtención de embriones, morfológica y fisiológicamente similares, estableciendo una población homogénea (Petru, 1970). Ésta puede ser usada posteriormente para aplicaciones como la crioconservación de germoplasma, la producción de semilla sintética, transformación genética, obtención de

metabolitos secundarios o la regeneración de plántulas a partir de los embriones (Zimmerman, 1993).

#### **2.4.3.1 Embriogénesis somática directa**

Es un proceso en el cual se utiliza células que por naturaleza tienen afinidad al desarrollo de embriones somáticos, no es necesaria la inducción de un callo y los embriones son obtenidos directamente (Chen & Wei, 2006). Esta técnica es utilizada generalmente en estructuras cotiledonares debido a su predisposición a desarrollar nuevos embriones y se plantea para especies forestales con reducida cantidad de embriones viables (Tulecke & Mcgranahan, 1985). Su uso no está extendido debido a la dificultad de encontrar estructuras con estas características (Tisserat et al., 1979).

#### **2.4.3.2 Embriogénesis somática indirecta - Inducción y cultivo de callo**

El callo, es una masa de células no diferenciadas, la cual se propaga rápidamente y proviene de la aplicación de hormonas de tipo auxinas y citoquininas en el medio de cultivo (Cueva, Chicaiza, & Cella, 2013). Esta estructura, debe presentar un estado denominado friable en el cual el callo se disgrega fácilmente y es adecuado para la producción de embriones somáticos (Mikula, Pozoga, & Rybcznski, 2015). Existen otros tipos de callos como son: compacto, esponjoso, acuoso que difieren en su morfología y potencial para formación de embriones (Ptak & Bach, 2007). Los factores que influyen en el desarrollo de estas estructuras pueden ser: la temperatura, edad de la planta, el fenotipo, el genotipo, edad del tejido, tipo de tejido, la acumulación de células predispuestas entre otros (Williams & Maheswaran, 1986). Es un modelo de desarrollo temprano y acelerado para aquellas plantas que poseen ciclos de desarrollo muy largos (Stolarz, Macewicz, & Lörz, 1991).

##### **2.4.3.2.1 Fases de la embriogénesis somática indirecta**

El proceso de embriogénesis somática presenta distintas fases sin embargo, la respuesta dependerá de la especie y de la fuente de explante, (Fujimura, 1979). (ver Tabla 1)

**Tabla 1 .** Fases de la embriogénesis somática indirecta

Fase	Descripción
Fase 0:	En esta fase ocurre la división constante de las células, principalmente meristemáticas hasta formar agregados celulares. Esto se debe a la presencia de auxinas en el medio de cultivo que inducen esta división principalmente 2-4D
Fase 1:	Se elimina la auxina del medio de cultivo, lo que evita la estimulación de nuevos agregados celulares. Se reduce la velocidad de crecimiento y posteriormente se puede inducir la formación de embriones
Fase 2:	Los agregados celulares comienzan a diferenciar sus estructuras y sucede nuevamente la división del tejido, esto ocurre varios días después de retirar la auxina. Los agregados celulares empiezan a formar tejidos embrionarios
Fase 3:	Los cotiledones de los embriones comienzan a formarse y se observan las distintas etapas del embrión; globular, acorazonado y torpedo.

#### **2.4.4.2 Factores que afectan el cultivo de tejidos vía embriogénesis somática**

Algunos factores pueden afectar el desarrollo de los embriones somáticos, entre ellos se pueden nombrar: el tipo de explante, los reguladores de crecimiento, la fuente de carbono, la temperatura o el fotoperiodo (Liao, Huang, Huang, Ikuo, & Hsu, 2015). El principal factor es la oxidación y posterior senescencia del tejido, esta es producida por el etileno que los tejidos de la planta liberan en determinadas circunstancias, para evitar esto es necesario utilizar antioxidantes en el medio de cultivo, promoviendo la supervivencia del explante (Huang et al., 2014). El callo y los embriones somáticos se desarrollan a mayor velocidad cuando se brindan las condiciones de temperatura y concentración de reguladores adecuada, de esta manera se obtiene mayor número de ejemplares en menor tiempo (Ishii, Takamura, Goi, & Tanaka, 1998).

### **2.5 Histología**

La histología, es una rama de la anatomía que se encarga del estudio de los tejidos animales, vegetales y humanos (Lee, Hsu, & Yeung, 2013). Se enfoca al estudio de: células, tejidos, órganos y sistemas con énfasis en su funcionamiento y estructura, se

relaciona con otras áreas de la biología para la mejor comprensión del funcionamiento de los organismos, también se requiere la aplicación de distintas técnicas que permitirán mantener la integridad estructural del tejido (Poobathy et al., 2013).

La caracterización se realiza al observar las estructuras en la imagen proyectada en el microscopio (Da Silva, 2012). Se pueden distinguir los tejidos gracias a la tinción que mantiene la forma y cambia el color según el tipo de célula, esto dependerá del colorante utilizado (Da Silva, Goncalves, Gaspar, & Asensao, 2007).

### **2.5.1 Técnicas Histológicas**

El tejido debe ser fino y transparente, de modo que permita el paso de luz en el microscopio además si se trata de una muestra fresca o de inmediata observación pueden utilizarse técnicas de inmovilización para histoquímica (Lam et al., 2005). Para una mejor precisión se recomiendan las técnicas histológicas de fijación, deshidratación, inclusión en una matriz, corte, rehidratación, tinción y diafanización para observarlo (Tokuhara & Mii, 2003).

#### **2.5.1.1 Fijación**

El proceso de fijación se realiza para preservar la célula sin alterar su estructura química también pueden aplicarse agentes físicos (calor, frío, deshidratación) o químicos, teniendo en cuenta que estos últimos, precipitan proteínas y endurecen el tejido (Da Silva et al., 2007).

Los fijadores químicos se utilizan solos o en combinación, los más comunes son: etanol 70%, ácido acético 5%, formaldehído, acetona o tetroxido de osmio. Las combinaciones más usuales son: FAA (Formaldehído, ácido acético y alcohol etílico), el FPA donde se sustituye el ácido acético por ácido propiónico y Nawaschin. (Lee et al., 2010). La concentración, el tiempo de exposición y el volumen del fijador en relación con la muestra, dependerá de la resistencia que esta presenta al fijador, muestras delgadas y con poco tejido (menos de 100 gramos) pueden permanecer entre 12 y 24 horas, en tanto las más grandes y con tejidos más densos pueden permanecer hasta 7 días en esta fase (Zhao, Wu, Feng, & Wang, 2008)



### **2.5.1.2 Deshidratación**

La deshidratación elimina el agua de los tejidos fijados y endurecidos, es necesario para que la matriz ingrese adecuadamente y la muestra pueda resistir el impacto del micrótopo (Ptak & Bach, 2007). El método más común para deshidratar los tejidos es pasar el material por una serie ascendente de etanol por un tiempo determinado (Chang & Chang, 1998).

### **2.5.1.3 Infiltración**

Este proceso consiste en infiltrar una matriz (parafina o resina) determinada dentro del tejido de la muestra para su seccionamiento en el micrótopo, en caso de que la matriz escogida no sea soluble en etanol, se debe reemplazar el mismo por un solvente (Conger et al., 1987). El material deberá ser infiltrado en un molde de plástico o papel para formar un bloque con la matriz escogida. Este bloque debe encajar en el micrótopo para cortar láminas delgadas de tejido (Da Silva et al., 2007; Hilda Lee et al., 2010).

### **2.5.1.4 Seccionamiento en micrótopo**

El micrótopo manual es un equipo que permite realizar cortes delgados de entre 20 a 5  $\mu\text{m}$  de grosor (Calandra, Mauro, Cutugno, & Martino, 2002). Se utiliza este tipo de micrótopo para los cortes en parafina, sin este equipo no sería posible obtener cortes tan finos, es recomendable hacer varias láminas para colocarlos en el portaobjetos (Cueva Agila, Guachizaca, & Cella, 2015). Existen otros equipos que realizan funciones más especializadas, el criótopo permite realizar cortes a muestras en bloques de hielo de entre 10 a 20  $\mu\text{M}$ , sin embargo, solo se utiliza en casos urgentes ya que el grosor de la muestra no es preciso también el ultra micrótopo permite obtener un grosor de 0,5  $\mu\text{M}$ , ya que posee una cuchilla de cristal o diamante y se utiliza en caso de que la matriz sea resina (Lam et al., 2005).

### **2.5.1.5 Desparafinado, rehidratación y tinción**

En caso de que las muestras sean incluidas en una matriz de parafina, debe eliminarse por acción de un solvente (xilol o toluol) que permitió su inclusión. Se tiñen por un proceso de rehidratación, solución de colorante y secado (Hossain et al., 2013). Posteriormente se realiza un proceso de rehidratación para que la muestra recupere su forma inicial, se

diluye y aplica el colorante según las especificaciones dadas por el fabricante (Da Silva et al., 2007).

#### **2.5.1.6 Montaje**

Para la preparación de una placa con muestras permanentes y que no pierda su coloración con el tiempo se requiere un medio para mantenerla (Chung, Chen, & Chang, 2005). Se seleccionan las muestras y se aplica el medio de montaje (bálsamo de Canadá, albumina de mayer o resinas sintéticas), sobre ella se coloca un cubreobjetos y se asegura la muestra ya que el medio de montaje actúa como conservante y adhesivo (Da Silva et al., 2007).

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Caracterización del área de estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales en la Universidad Técnica del Norte, ubicada en la provincia de Imbabura, Cantón Ibarra, parroquia El Sagrario, en el campus Hospital San Vicente de Paúl.

Las muestras biológicas fueron adquiridas a la casa comercial “GENEROS ECUATORIANOS ECUAGENERA CIA. LTDA” quienes garantizan la identificación taxonómica de la especie.

#### 3.2 Obtención del material biológico

Se adquirieron plantas de *Dracula vampira* de entre 2 y 3 años, las plantas contaban con abundante follaje, presentaban vigorosidad y no tenían alteraciones físicas provocadas por parásitos o enfermedades visibles. Protocormos in vitro fueron adquiridos en frascos sellados.



**Figura 6:** Ejemplares de *Dracula vampira*

**Fuente:** El Autor

### 3.2.1 Disección de la flor

Flores de *Dracula vampira* fueron seleccionadas para su disección y caracterización floral y confirmar la identificación de la especie.



**Figura 6** Flor previo a la disección



**Figura 7** Flor cortada en placa de disección

Fuente: El Autor



**Figura 8** Estructura reproductiva - vista frontal



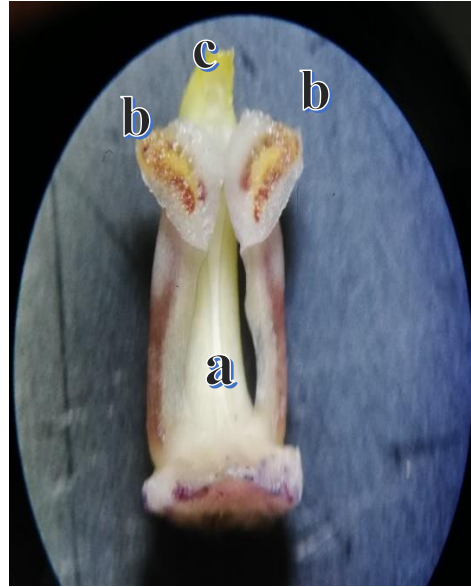
**Figura 9** Estructura reproductiva - vista lateral

Fuente: El Autor





**Figura 10** Labelo



**Figura 11** a: Columna, b: antera y c: estigma



**Figura 12** Columna con políneos



**Figura 13** Pétalos bivalvos

**Fuente:** El Autor

### **3.3 Selección y desinfección de hojas**

Hojas de la zona media de la planta fueron cortadas desde el pedúnculo. Las hojas se encontraban saludables, vigorosas y completamente desarrolladas (Figura 15). Se descartaron hojas jóvenes debido a su corto tamaño y al no encontrarse desarrolladas.



**Figura 14** Hojas seleccionadas

**Fuente:** El Autor

El material fue desinfectado según el método descrito en la embriogénesis somática del café. Las hojas se lavaron con agua potable para eliminar impurezas, restos de sustrato, polvo y otros contaminantes. Se preparó una solución con detergente comercial  $5\text{gL}^{-1}$ , más una gota de Tween 20. Se utilizó una esponja y se aplicó un lavado con suavidad y firmeza para evitar dañar la hoja. Se repitió el proceso de lavado con detergente 3 veces y se enjuagó con agua destilada. En la cámara de flujo laminar se colocaron las hojas en inmersión en  $\text{NaClO}$ , en las concentraciones y tiempo descritos en la tabla 1. Finalmente se realizaron 3 enjuagues con una solución de  $25\text{mgL}^{-1}$  de cisteína y se procedió a la introducción en medio de incubación. La evaluación de sobrevivencia y contaminación de los explantes se realizó a los 7 días (Montes et al., 2017). La muestra fue de 24 explantes y se analizó la oxidación y contaminación, la prueba de chi cuadrado de Pearson.





**Figura 15** Lavado de hojas con detergente



**Figura 16** Desinfección de Hojas

**Fuente:** El Autor

**Tabla 2** Tratamientos de desinfección.

Tratamiento	Concentración de NaClO (v/v)	Tiempo de exposición (min)
T1	1%	15
T2	1%	20
T3	1%	25
T4	2%	15
T5	2%	20
T6	2%	25
*T7	0,5%	20

\* El tratamiento 7, se describe en los resultados obtenidos en la investigación de la embriogénesis somática de cafeto (Montes et al., 2017).

### 3.4 Preparación de medios de cultivo.

Se preparó medio de cultivo (Murashige & Skoog, 1962) modificado según los requerimientos del proceso a desarrollar. El medio de incubación (MI) se usó para determinar la contaminación y sobrevivencia de los explantes foliares solamente con los parámetros modificados y el medio de formación de callo y embriones (MC) fue suplementado con reguladores de crecimiento. La concentración de sales minerales, reguladores de crecimiento, vitaminas MS, sacarosa, se redujo a la mitad y se disolvieron en agua destilada (Chang & Chang, 1998). Se midió el pH cultivo con un potenciómetro HANNA (HI 2210-01) y se ajustó a 5,2 con unas gotas de ácido clorhídrico 1N. Se añadió el gelzan y se llevó a ebullición en una placa calefactora marca IKA (C-MAG HS 10). Posteriormente se dispensó 20 ml de medio, en tubos de 2 cm de ancho por 15 cm de largo y en frascos de 100ml de capacidad. Finalmente se esterilizaron en autoclave Tuttnauer (N2340M) a una temperatura de 121°C, durante 15 minutos a una presión de 1,5 atm. El medio basal es 1/2 (Murashige & Skoog, 1962) .

**Tabla 3** Medio de Incubación (MI)

Reactivo	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )
Peptona	1000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Gelrite	2500
Cisteína	25
Sacarosa	20000



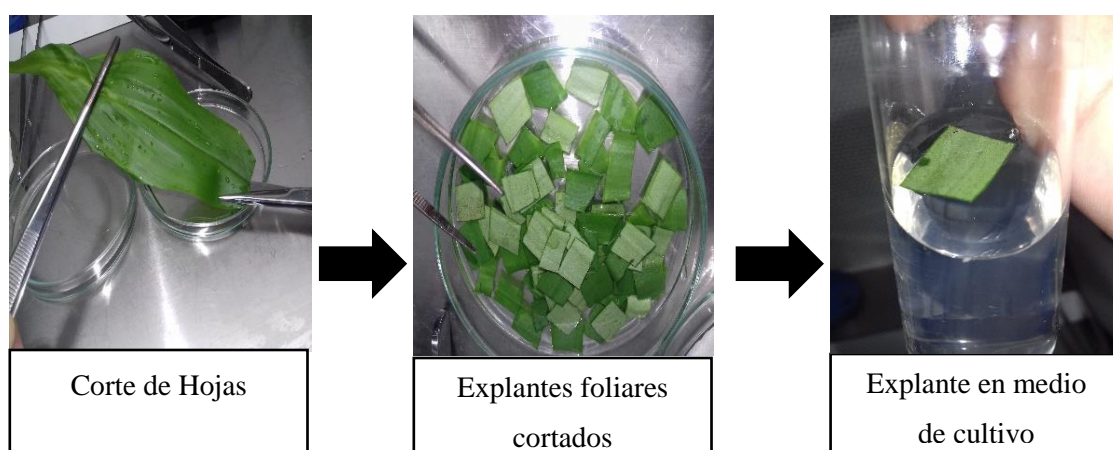
**Tabla 4** Medio de formación de callo y embriones (MCE).

Tratamiento	BAP (mgL <sup>-1</sup> )	2-4D (mgL <sup>-1</sup> )	ANA (mgL <sup>-1</sup> )
MCE 0	-	-	-
MCE 1	1	-	3
MCE 2	2	-	2
MCE 3	3	-	1
MCE 4	1	3	-
MCE 5	2	2	-
MCE 6	2	3	-
MCE 7	2	5	-
MCE 8	1	0,5	-
MCE 9	1	1	-

El medio basal fue ½ (Murashige & Skoog 1962), más peptona 1000 (mgL<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (170 mgL<sup>-1</sup>), gelrite (2 gL<sup>-1</sup>), sacarosa (20 gL<sup>-1</sup>) y cisteína (25 mgL<sup>-1</sup>).

### 3.6 Siembra de explantes foliares en medio de cultivo

Las hojas fueron manipuladas con pinzas en la cámara de flujo laminar y se eliminaron los bordes con cortes longitudinales sin tocar la nervadura central. Se observó la presencia de haces vasculares y se cortaron segmentos de 1cm<sup>2</sup> aproximadamente y se introdujo un explante por tubo. La superficie abaxial se colocó hacia arriba y la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo y los explantes se almacenaron en oscuridad a una temperatura de ±2 23 °C (Montes et al., 2017). Las variables analizadas fueron, la sobrevivencia (no oxidación) y la contaminación a través de un análisis descriptivo y una muestra de 24 explantes por tratamiento. Se aplicó la prueba de chi cuadrado y tablas de contingencia.



**Figura 17** Esquema De introducción de explantes en medio de cultivo

Fuente: El Autor

### 3.7 Siembra de protocormos en medio de formación de callo

Los protocormos de aproximadamente 1-2 mm de diámetro se subcultivaron en medio fresco, primero se seleccionaron los más aptos, aquellos que no tenían primordios foliares visibles para favorecer la formación de callo. El explante se dividió en 2, de forma longitudinal y cada porción se colocó en contacto con el medio de cultivo. La siembra se realizó en cámara de flujo laminar y se sembró una porción de protocormo por tubo y 4 por frasco. Los explantes se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de  $\pm 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 56 días (Chugh et al., 2009).

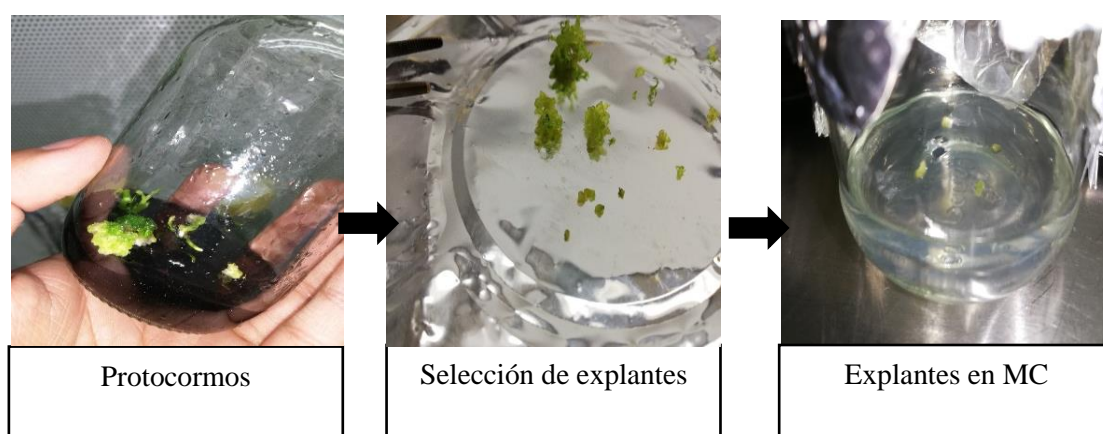


Figura 18 Siembra de protocormos en MCE

Fuente: El Autor

Se realizaron en total dos siembras con 30 días de diferencia para mantener material en diferentes estados de desarrollo y procesar las muestras con técnicas histológicas para la observación de los tejidos. El subcultivo a medio fresco se realizó cada 30 días para mantener la cantidad de nutrientes. La evaluación de desarrollo de callo se realizó a los 28 días, y se determinó como variable de análisis el peso de los explantes que presentaban formación de callo embriogénico, la muestra fue de 12 repeticiones siendo 1 explante una repetición. La prueba estadística fue un ANOVA a la cual con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

### 3.8 Técnicas Histológicas

Se usó una técnica general a todas las etapas del proceso de embriogénesis somática. Las muestras fueron tomadas cada siete días durante todo el proceso de embriogénesis, en total sumaron nueve, donde la primera correspondía al explante antes de ingresar al medio de cultivo y ocho correspondientes al proceso de embriogénesis somática.

### 3.8.1 Fijación

El tejido se colocó en un recipiente con fijador en una proporción 20:1. El fijador utilizado fue FAA (Formaldehído, ácido acético glacial y alcohol etílico) (tabla 5). Se mantuvieron las muestras durante 24 horas para mantener la integridad estructural del tejido (Teixeira, 2012). El recipiente fue cubierto con papel aluminio para evitar la evaporación del fijador y se etiquetó, el material se conservó en alcohol al 70% una vez transcurrido el período de fijación, hasta su procesamiento (Zhao et al., 2008).

**Tabla 5** Fijador FAA

Reactivo	Volumen (ml)
Formaldehído 40%	50
Alcohol etílico 50% o 70%	900
Ácido acético glacial	50

### 3.8.2 Deshidratación

El proceso de deshidratación elimina el agua de los tejidos y permite el ingreso a la matriz. La muestra se colocó en una serie de etanol ascendente (50, 70, 90, 100 y 100 %) durante 15 minutos en cada serie. Posteriormente se puso la muestra en etano-xilol (3:1, 1:1, 1:3) durante 15 minutos en cada concentración ya que el etanol no es miscible con la parafina.

### 3.8.3 Infiltración

La matriz utilizada fue parafina y debió ser infiltrada en el tejido, para ello se derritió parafina a 60°C y se mezcló 1 parte de parafina con 1 parte de xilol, se introdujo la muestra y se colocó en la estufa durante una hora, luego se reemplaza la mitad de esta mezcla con parafina líquida, nuevamente durante una hora y finalmente se reemplazó por parafina líquida durante cuatro horas o más.

### 3.8.4 Inclusión

En una máquina de inclusión marca Leica modelo serie EG 1150 H se colocó la muestra en moldes y se formó un bloque de parafina. Para solidificar la matriz se colocaron los bloques calientes en una placa fría marca Leica EG 1150 C, al solidificarse se retiraron

las placas del molde con cuidado. Cada muestra se etiquetó con la fecha de procesamiento.

### **3.8.5 Corte**

El corte de los bloques se realizó en un micrótopo manual marca Leica serie RM 2125 RTS. Se ajustó el grosor del corte a 8 micrómetros para observar el tejido. Se obtuvo una tira de entre 6 y 10 laminillas. Posteriormente se trasladaron con un pincel suave a agua caliente a 50°C, para esto se utilizaron moldes de aluminio con agua destilada en un módulo caliente marca Leica serie HI1220, de esta forma se extienden las laminillas y se eliminan las arrugas formadas en el corte, mejorando la visualización del tejido.

Una vez se extendieron las muestras, se sumergió un portaobjetos en el agua y se tomaron las laminillas con precaución. Se secaron las placas en módulo caliente o en estufa a 60°C según disponibilidad para adherir la muestra.

### **3.8.6 Desparafinado, hidratación y tinción**

Para favorecer la transparencia de la placa se eliminó la parafina primero sumergiendo la placa en xilol puro y luego en una serie de etano-xilol (1:3, 1:1, 3:1) durante 5 minutos en cada concentración.

El siguiente paso fue rehidratar la muestra a través de una serie descendente de etanol (100, 100, 90, 70, y 50 %) durante 10 minutos por cada reactivo.

La tinción se realizó con azul de toluidina en concentración de 100 mgL<sup>-1</sup> y la placa se sumergió por 2 minutos, se enjuagó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar hasta la observación.

### **3.8.7 Preparación de placas permanentes**

Para mantener las características de la muestra y observarla posteriormente se seleccionaron las placas con mejor transparencia, tinción y observación las que se colocaron en medio de montaje. El medio de montaje utilizado fue Bálsamo de Canadá, una resina que mantiene la muestra en el tiempo, se colocaron gotas del bálsamo y se colocó un cubreobjetos para proteger la placa, se presionó para evitar la formación de burbujas, se eliminó el exceso de bálsamo y finalmente se dejó secar durante una semana.

El bálsamo se diluyó con xilol en una proporción 3:1 para su aplicación, se identificaron las muestras que presentaban mejor coloración, integridad y transparencia. El exceso de resina fue retirado con una aguja de disección y una cuchilla sumergidas en xilol y con un algodón se retiró el sobrante.

Las placas se almacenaron en una caja de madera debidamente etiquetada para su observación posterior.

### **3.8.8 Observación y caracterización de tejidos.**

Las placas se observaron en un microscopio Olympus CX31 y con aumentos 4x, 10x y 40x. Se acopló una cámara marca Sony Dsc-H300 y se tomaron fotografías para realizar un registro documental e identificar las estructuras con mayor facilidad.

La caracterización se realizó de manera descriptiva, identificando las estructuras observadas desde el día 1 hasta la formación de los embriones. Se describen los tejidos observados, su localización y los cambios observados entre las estructuras.

### **3.9 Análisis estadístico**

Para el proceso de desinfección se realizó un análisis cualitativo con la aplicación de tablas de contingencia, se tomó una muestra de 24 explantes, siendo 1 explante por tubo una unidad experimental. A los 7 días se evaluaron las variables contaminación y sobrevivencia, el análisis fue independiente para cada variable, tomando en cuenta la concentración de NaClO y el tiempo de exposición.

Para la determinación del medio de cultivo adecuado, las variables analizadas fueron el aumento de peso fresco en cada tratamiento a los 28 días. Los resultados se procesaron a través de un ANOVA con la prueba de rangos múltiples de Duncan para determinar el aumento de peso fresco a través de la comparación de medias. En total se utilizaron 12 explantes como unidad experimental elegidos al azar entre las muestras cultivadas. El procesamiento de datos fue realizado en el programa SPSS.

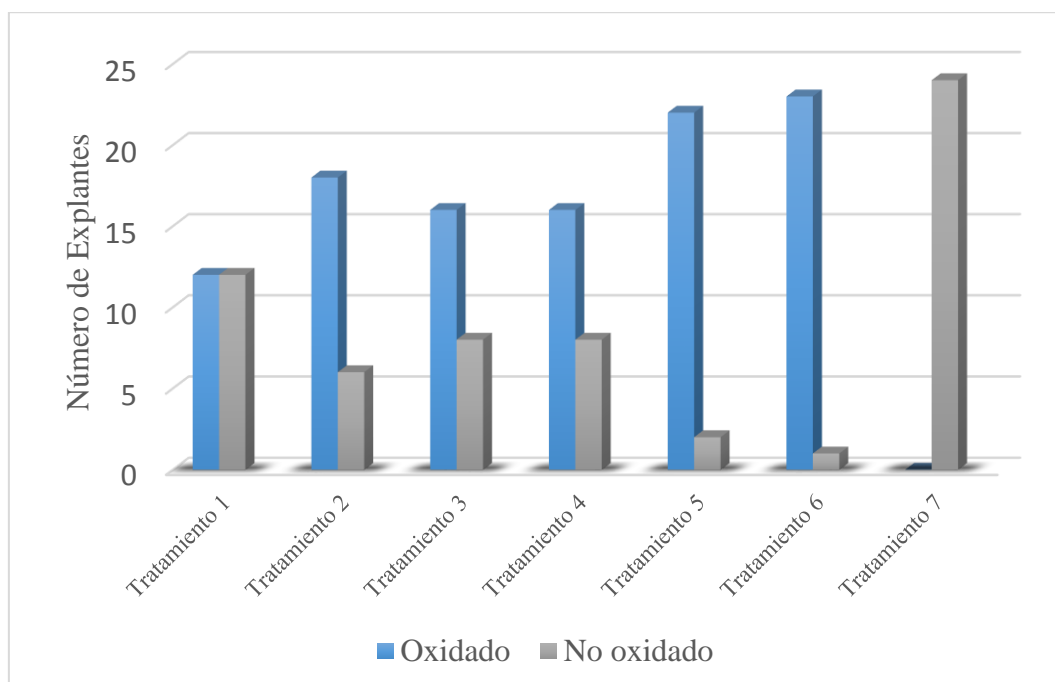
## CAPÍTULO IV RESULTADOS

### 4.1 Resultados obtenidos al analizar la oxidación de explantes por efecto de la desinfección.

El tratamiento 7, con una concentración de NaClO del 0,5% y un tiempo de exposición de 20 min, presentó la mejor respuesta con un 0% de explantes oxidados. En la aplicación de los tratamientos de desinfección se observó la presencia de tejidos oxidados desde el 50% hasta el 95%. (Ver figura 20 y tabla 6)

**Tabla 6** Porcentajes de Oxidación

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Oxidación	12	18	16	16	22	23	0
	50%	75%	66,7%	66,7%	91,7%	95,8%	0%
Sin oxidación	12	6	8	8	2	1	24
	50%	25%	33,3%	33,3%	8,3%	4,2%	100%



**Figura 19** Comparación de número de explantes oxidados por tratamiento

**Tabla 7** Prueba Chi cuadrado Oxidación

	Valor	Grados de libertad	Significancia asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	64,400	6	0,000
Razón de verosimilitud	76,89	6	0,000
Asociación lineal por lineal	2,559	1	0,110
Número de casos válidos	168		

**Tabla 8** Medidas Simétricas Oxidación

	Valor	Aproximación Significativa
Phi	0,619	0,000
V de Cramer	0,619	0,000
Coefficiente de contingencia	0,526	0,000
Número de casos válidos	168	

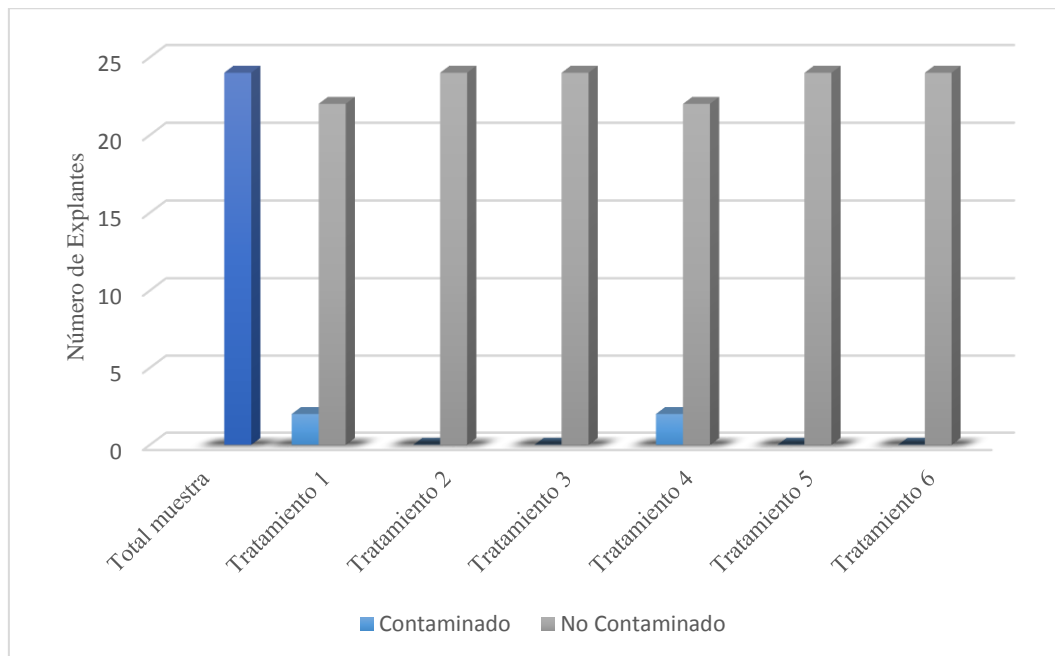
Existe una asociación entre la exposición al tratamiento y la oxidación de los explantes de acuerdo con la prueba de Chi cuadrado con 6 grados de libertad  $X^2 = 64,400$  y  $p < 0,05$ . Se encontró una relación estadísticamente significativa, alta y directamente proporcional (Coeficiente de contingencia = 0,526 y  $p < 0,05$ ). Al exponer durante más tiempo y una mayor concentración de NaClO el tejido se deteriora en mayor cantidad, reduciendo la supervivencia de los explantes y la presencia de oxidación y el deterioro del tejido.

## 4.2 Contaminación

En el caso de la contaminación se observaron resultados similares sin contaminación ni diferencias entre los tratamientos utilizados con casi 100% de explantes sanos (ver figura 21 y tabla 7).

**Tabla 9** Porcentajes de contaminación

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Sin Contaminación	22 91,7%	24 100%	24 100%	22 91,7%	24 100%	24 100%	24 100%
Contaminación	2 8,3%	0 0%	0 0%	2 8,3%	0 0%	0 0%	0 0%



**Figura 20** Comparación de explantes contaminados y no contaminados por tratamiento



**Tabla 10** Chi Cuadrado Contaminación

	Valor	Grados de libertad	Significancia método Montecarlo
Chi cuadrado de Pearson	10,244	6	0,115
Razón de verosimilitud	10,269	6	0,114
Asociación lineal por lineal	2,291	1	0,130
Número de casos válidos	168		

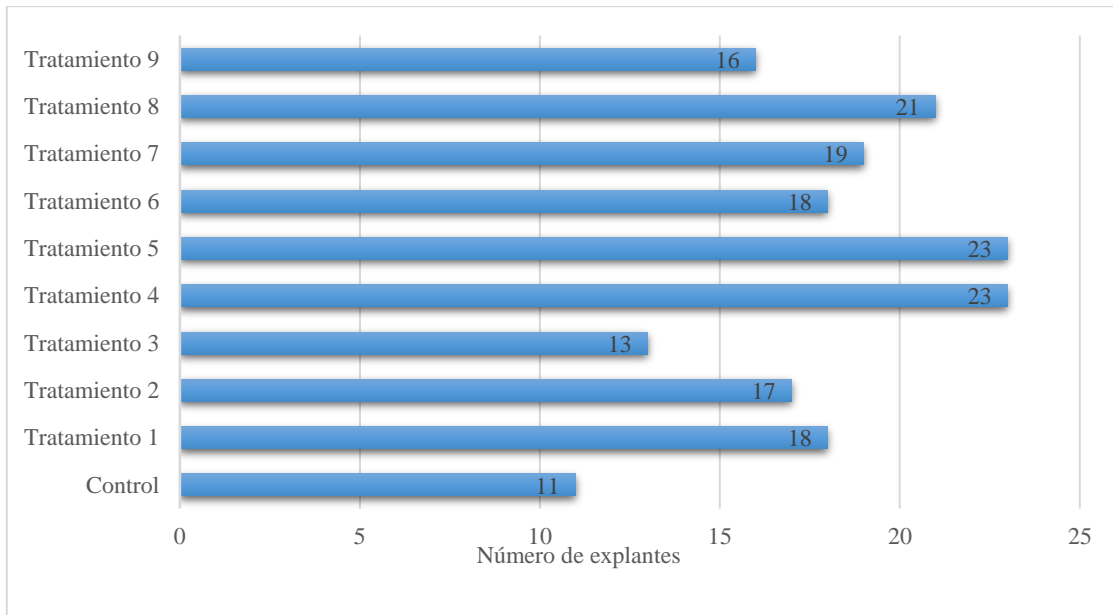
**Tabla 11** Medidas simétricas Contaminación

	Valor	Aproximación Significativa
Phi	0,247	0,115
V de Cramer	0,247	0,115
Coefficiente de contingencia	0,240	0,115
Número de casos válidos	168	

No existe, asociación estadísticamente significativa entre la exposición al tratamiento y la contaminación de los explantes de acuerdo con la prueba de Chi cuadrado con 6 grados de libertad  $X^2 = 10,244$  y  $p > 0,05$  tampoco existe relación entre las variables (Coeficiente de contingencia = 0,240 y  $p > 0,05$ ). En este caso el análisis muestra que cualquiera de los tratamientos utilizados puede ser viable para obtener una adecuada desinfección.

### 4.3. Formación de callo de cicatrización en segmentos foliares

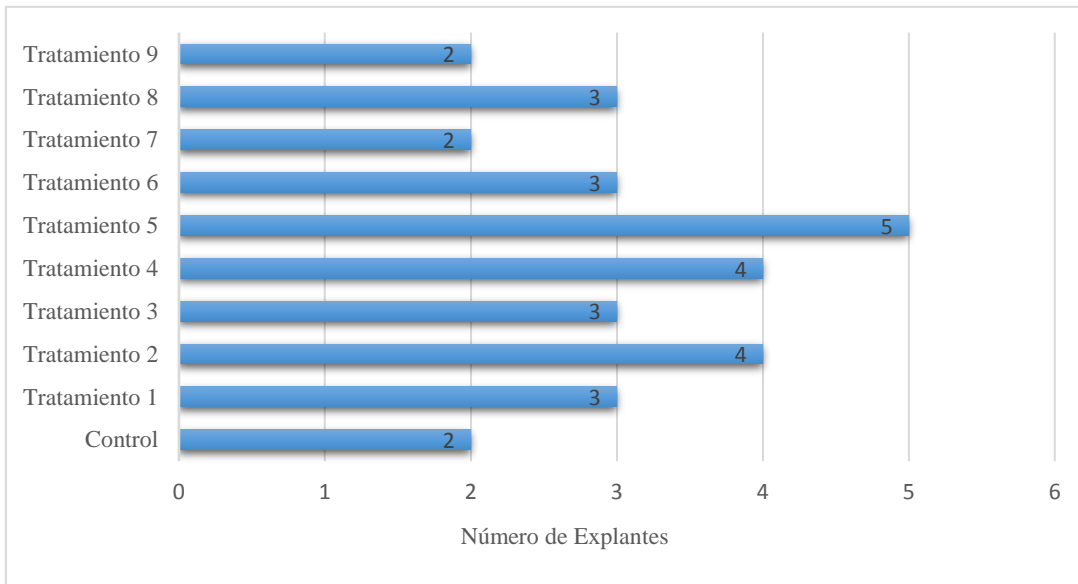
Se realizó un recuento de los explantes que formaron callo de cicatrización en explantes foliares al día 7. El callo de cicatrización se presentó solo en tejidos vivos que no presentaban oxidación ni muerte. (Ver figura 21)



**Figura 21** Recuento de segmentos foliares con callo de cicatrización

#### 4.4 Formación de callo embriogénico en segmentos foliares

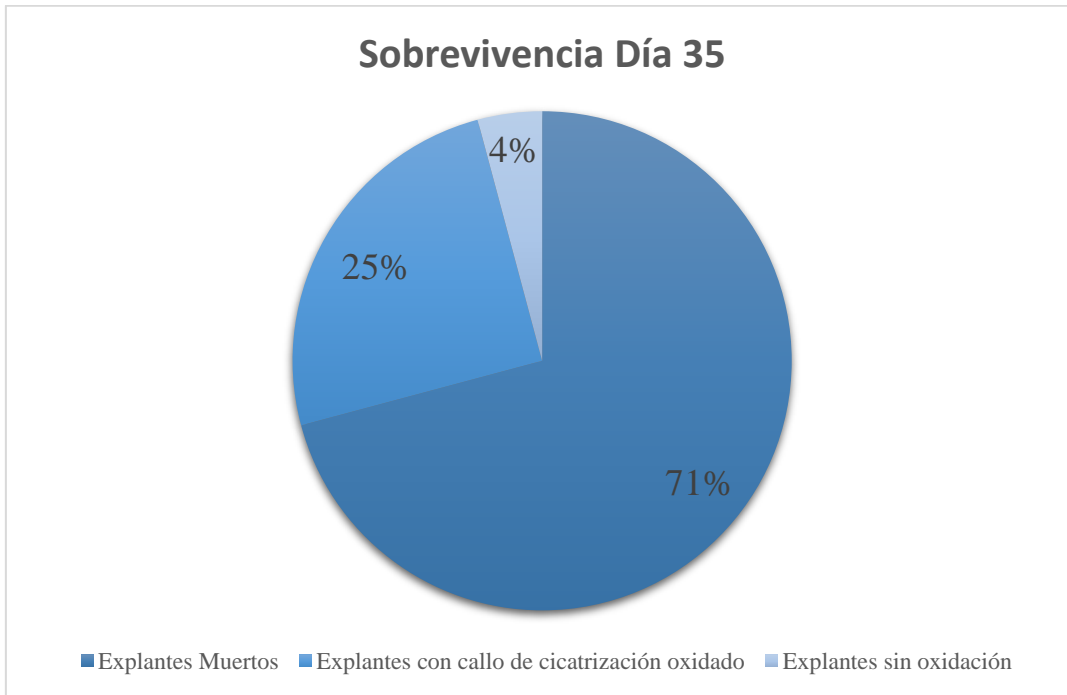
Los explantes que formaron callo embriogénico no superaban los 5 por cada tratamiento siendo una cantidad reducida en comparación con los explantes que formaron callo de cicatrización (Ver figura 22). El callo embriogénico se identifica por su coloración y consistencia, entre amarillo blanquecino y firme al tacto.



**Figura 22** Recuento de segmentos foliares con callo embriogénico

#### 4.5 Supervivencia de segmento foliares en el día 35

Se analizó la viabilidad de la supervivencia de los explantes y la capacidad para producir callo, se encontró que de la muestra total el 71% de los segmentos murió sin desarrollar callo embriogénico, el 25% presentaba callos de cicatrización oxidados y deteriorados. El porcentaje de explantes sin oxidación fue del 4% y no existió desarrollo de callo embriogénico. (Ver figuras 23, 24 y 25).



**Figura 23** Porcentajes de supervivencia y viabilidad



**Figura 24** Callo al día 35



**Figura 25** Explantes muertos día 35

**Fuente:** El Autor

#### 4.6 Desarrollo de callo embriogénico en protocormos

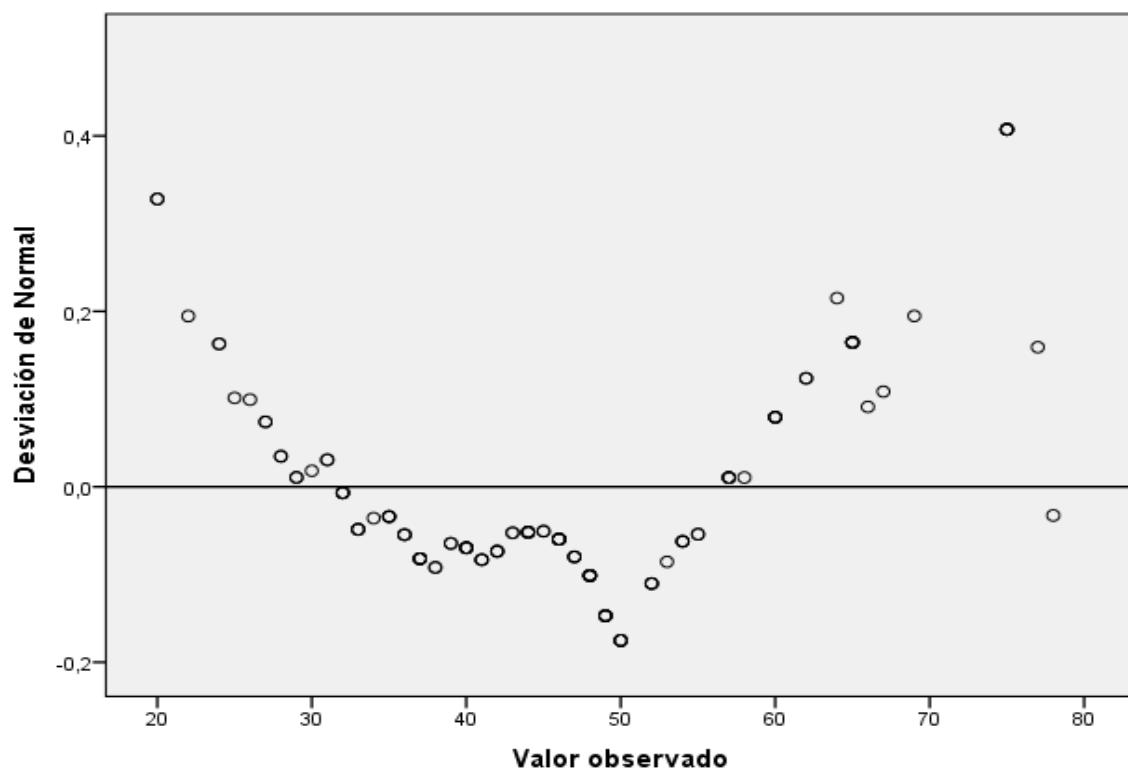
La respuesta de los protocormos a los reguladores de crecimiento dio como resultado un callo friable de consistencia cremosa y coloración blanquecina. Los tratamientos tuvieron un peso medio de entre 29,25 y 55,33 mg de peso fresco a los 28 desde la introducción del protocormo en el medio de cultivo. Al procesar los datos estadísticos se encontró que la muestra cumplió con los supuestos (normalidad, homocedasticidad, necesarios para realizar un ANOVA, excepto la no linealidad, sin embargo, al cumplirse el resto se pudo aplicar este análisis estadístico.

**Tabla 12** Prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov Peso Día 28

Estadístico	Grados de libertad	Significancia
0,083	120	0,041 <sup>a</sup>

a. Se cumple el supuesto de normalidad ( $p > 0,05$ )

**Figura 26** Gráfico Q-Q Normal



**Figura 28** Independencia de las variables

**Tabla 13** Prueba de Levene

F	df1	df2	Significancia
1,690	0	110	0,10 <sup>a</sup>

a. Se cumple el supuesto de homocedasticidad ( $p > 0,05$ )

**Tabla 14** *Peso fresco al día 28 resumen*

Tratamiento	Reguladores (mgL <sup>-1</sup> )			Peso fresco (mg)	ES
	BAP	2-4D	NAA		
M0 Control	-	-	-	29,25	±1,73
M1	1	0	3	41,83 bc	±2,36
M2	2	0	2	46,33 ab	±4,61
M3	3	0	1	55,08 a	±3,87
M4	1	3	0	52,50 a	±2,98
M5	2	2	0	55,33 a	±2,95
M6	2	3	0	51,83 a	±3,87
M7	2	5	0	41,25 bc	±2,76
M8	1	0,5	0	51,42 d	±2,83
M9	1	1	0	34,83 be	±2,67

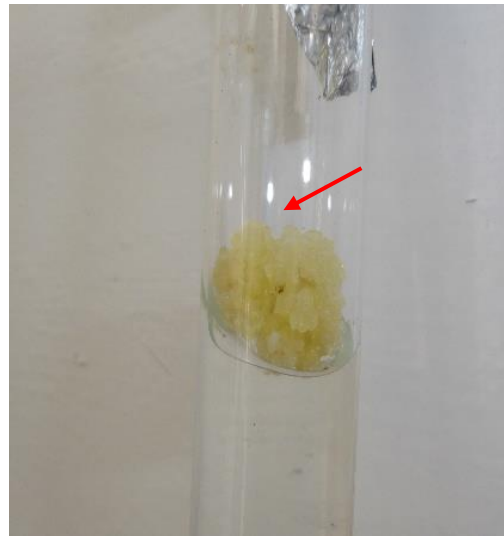
\*Se presenta la tabla para peso fresco el día 28. ES= error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas. Letras iguales, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

**Figura 27** Protocormo seccionado**Figura 28** Protocormo con callo en formación

Fuente: El Autor



**Figura 29** Callo embriogénico



**Figura 30** Callo friable con embriones

**Fuente:** El Autor



**Figura 33** Embrión somático

**Fuente:** El Autor

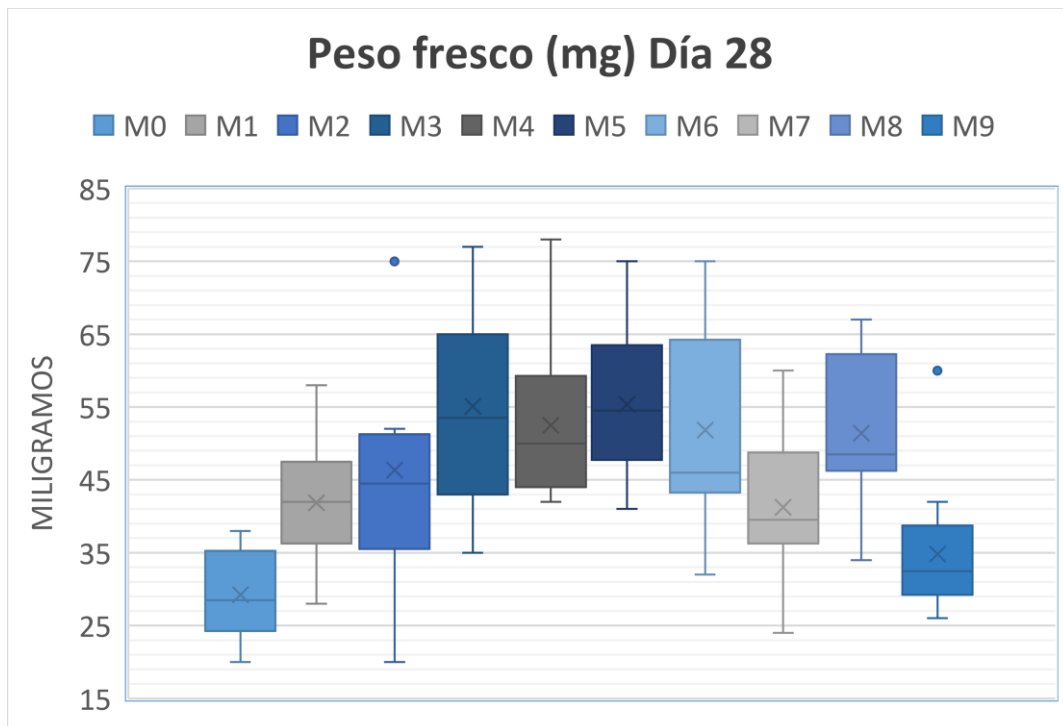


Figura 31 Diagrama de Cajas y Bigotes para Peso fresco día 28

## 4.7 Caracterización histológica

### 4.7.1 Explante inicial Día 1

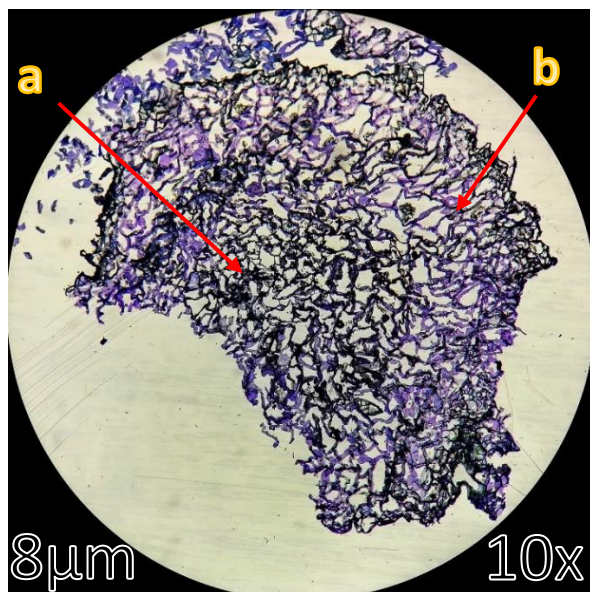
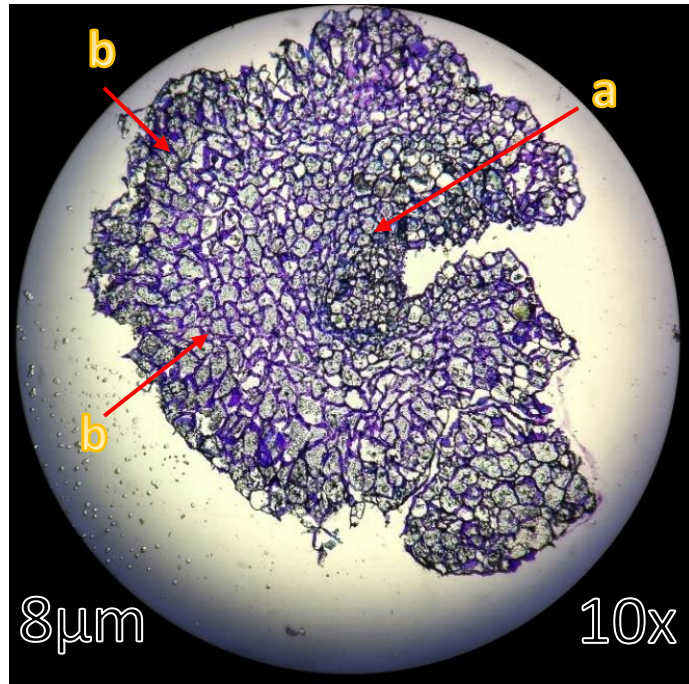


Figura 32 Corte transversal de explante inicial

a: Células meristemáticas del protocormo, b: Células parenquimáticas. Flechas: Indica la sección donde fue segmentado el protocormo.

Fuente: El Autor

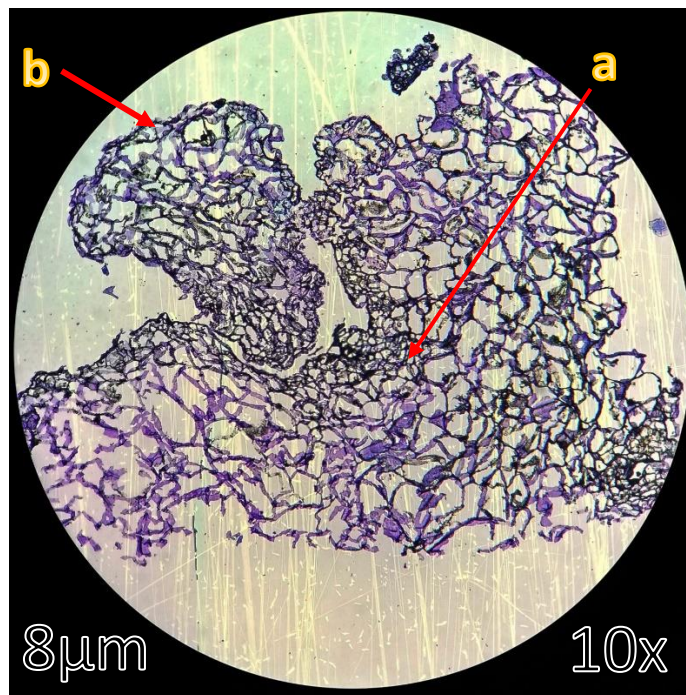




**Figura 33** Corte transversal explante iniciando formación de callo

**Fuente:** El Autor

a: células meristemáticas, b: Células parenquimáticas.

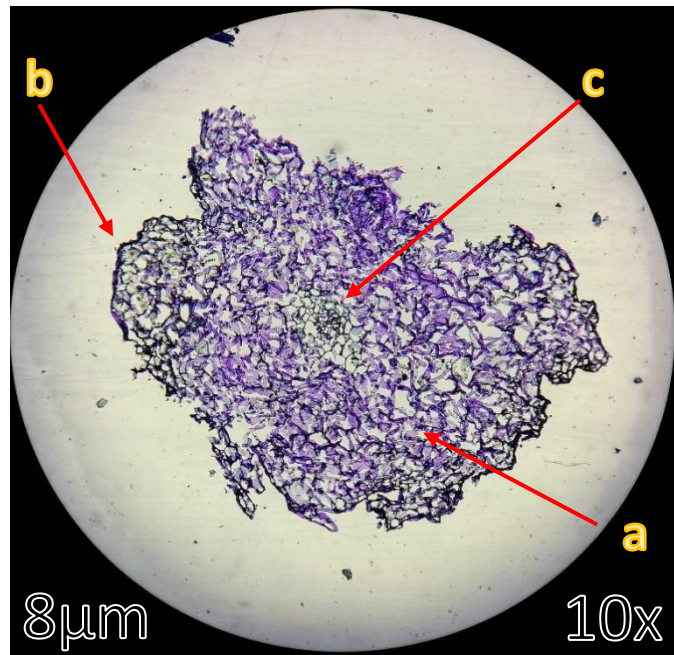


**Figura 34** Corte longitudinal de porción de callo y protocormo

a. Células con pared delgada del protocormo b. Células embrionarias

**Fuente:** El Autor



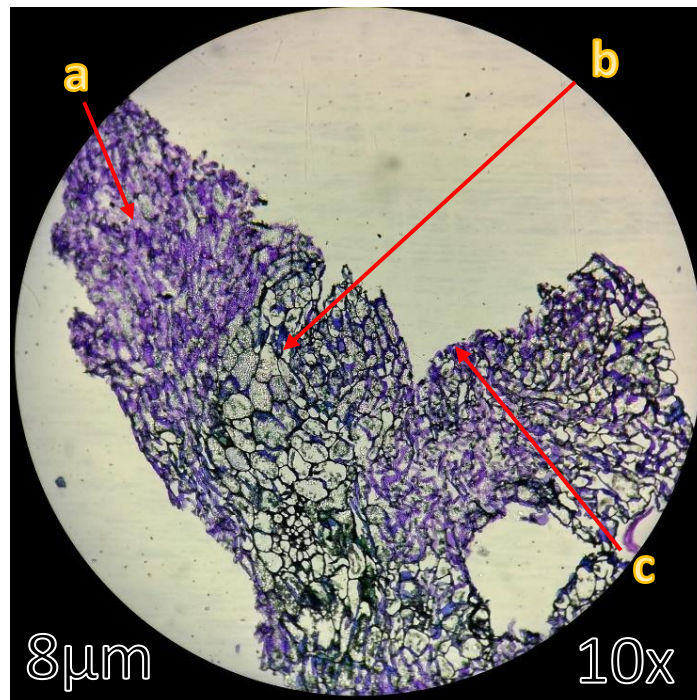


**Figura 35** Corte transversal de masa de callo al día 21 8µm

A. Células parenquimáticas de callo b. Callo embriogénico c. Meristemas

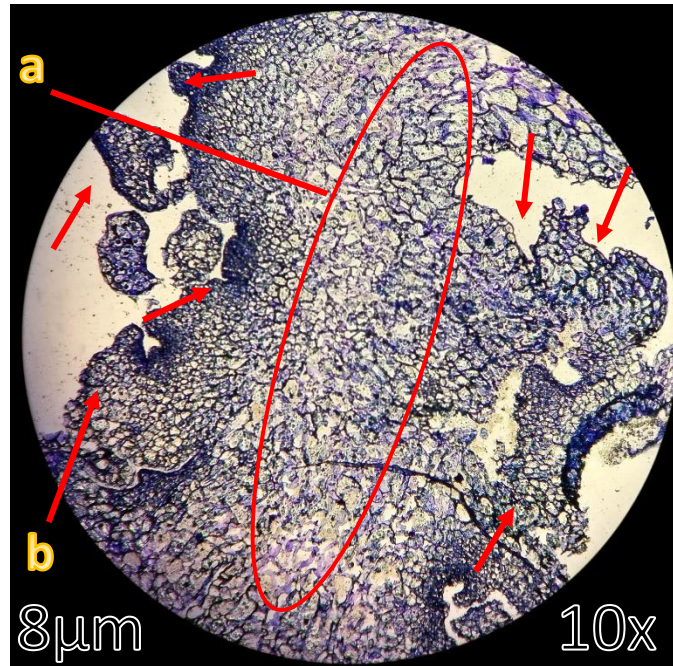
**Fuente:** El Autor

#### 4.7.2 Masas de callo



**Figura 36** Corte transversal de masa de callo 8µm

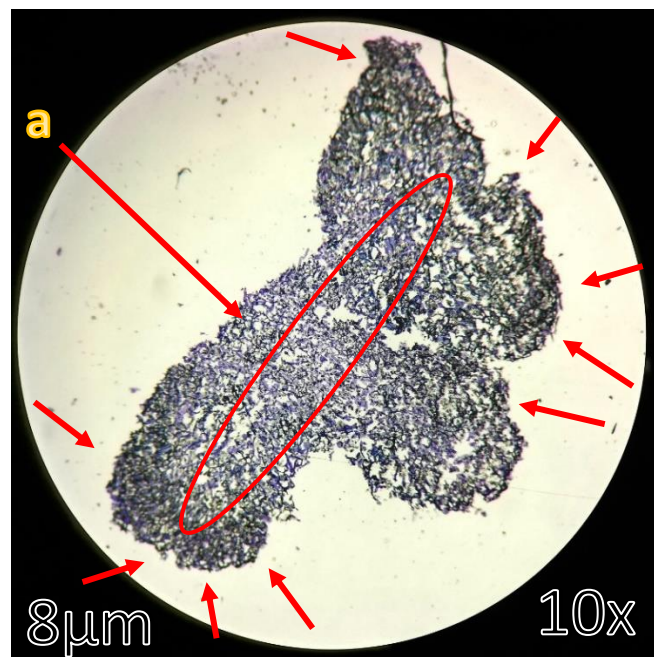
a. Células deterioradas b. Parénquima de callo c. Células con núcleos grandes



**Figura 37** Corte transversal de callo embriogénico al día 35

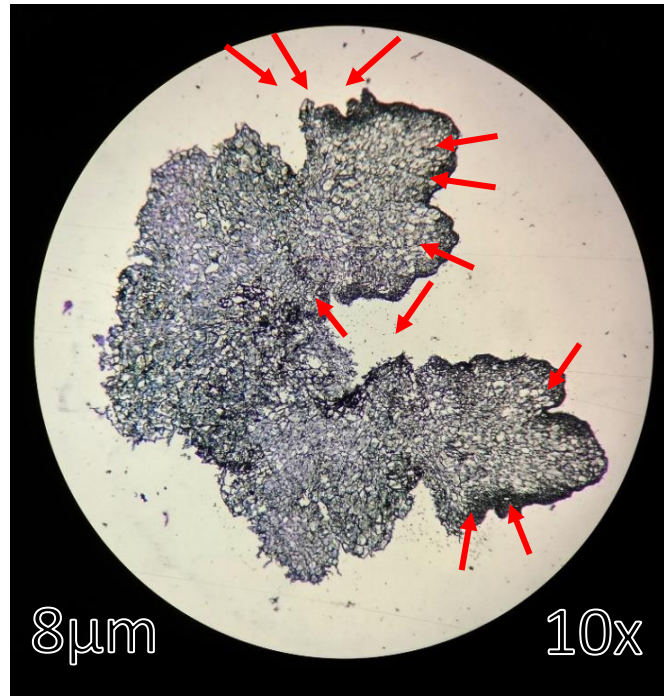
a. Células parenquimáticas. b. Meristema apical. Flechas: Embriones somáticos

**Fuente:** El Autor



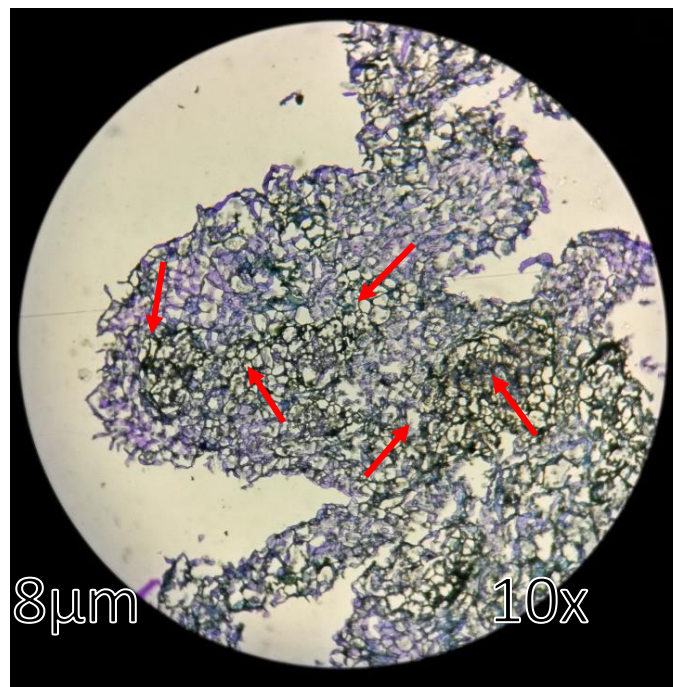
**Figura 38** Corte transversal de callo embriogénico.

a. Células parenquimáticas. Flechas: Embriones somáticos en formación



**Figura 39** Corte transversal de callo con embriones al día 49  
Flechas: Embriones somáticos desprendiéndose

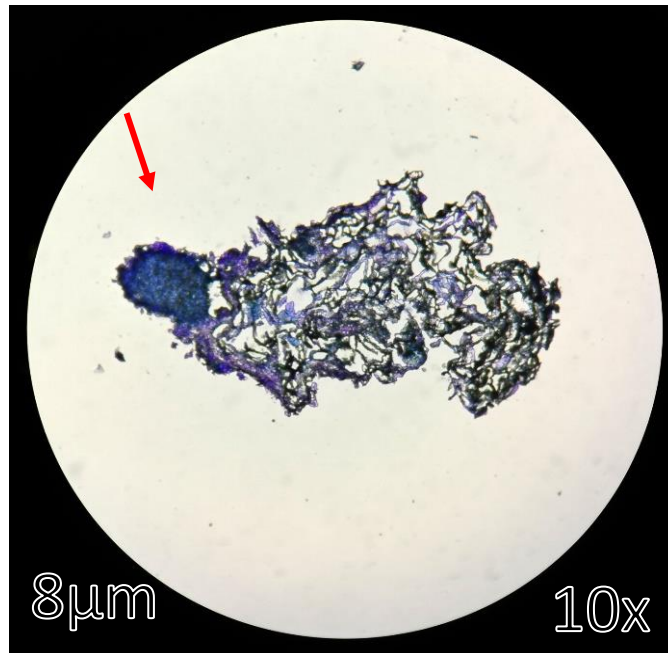
**Fuente:** El Autor



**Figura 40** Corte longitudinal de callo embriogénico al día 56  
Flechas: Embriones somáticos



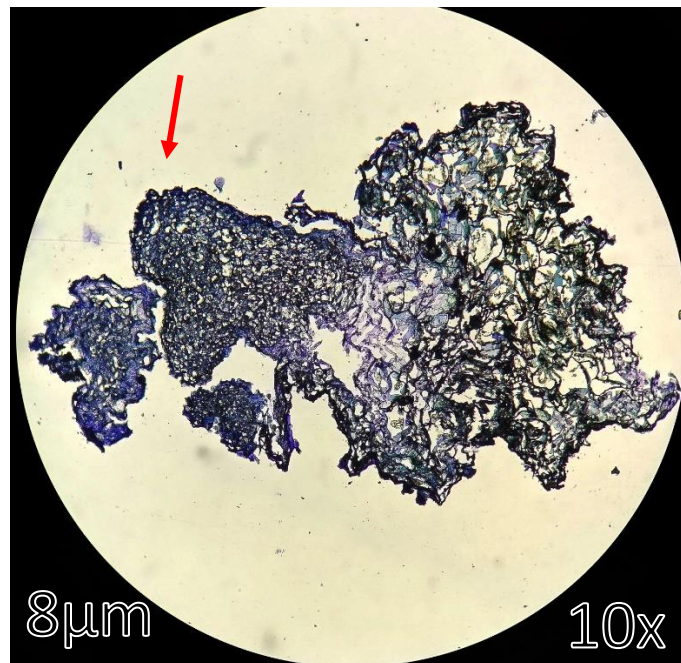
### 4.7.3 Desarrollo de embriones



**Figura 41** Corte longitudinal de embrión inicial

Flecha: Embrión somático en fase globular

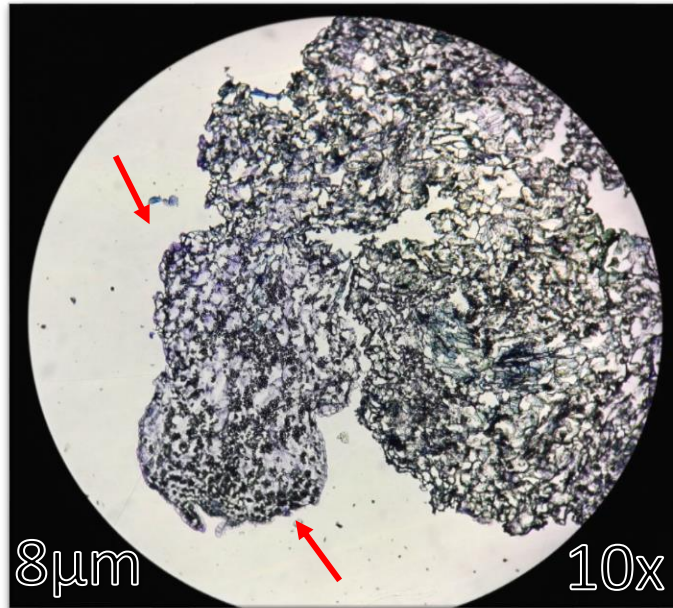
Fuente: El Autor



**Figura 42** Corte longitudinal de embrión al día 70 de la siembra

Flecha: Embrión somático en fase acorazonado

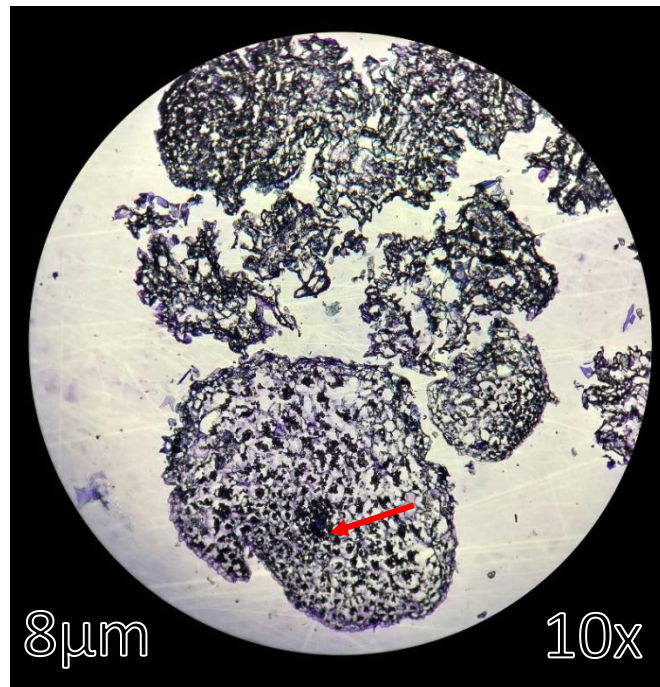
Fuente: El Autor



**Figura 43** Corte longitudinal de embrión (PLB)

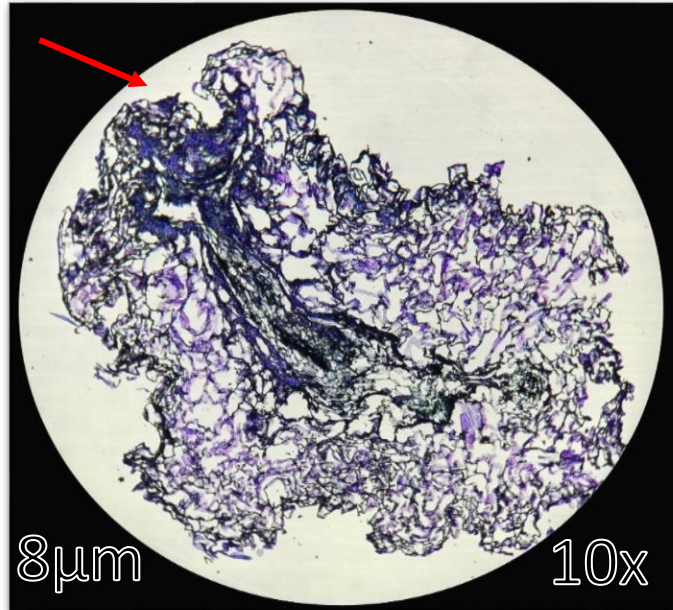
Flechas: Embriones somáticos (PLB) Desprendiéndose

Fuente: El Autor



**Figura 44** Corte longitudinal de embrión somático los 85 días (PLB)

Flecha: Cúmulo de células meristemáticas en PLB desarrollado.

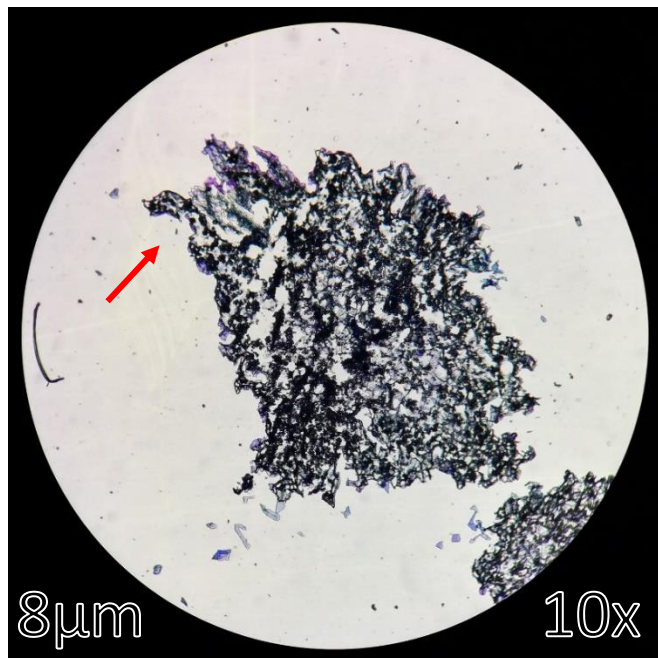


**Figura 45** Corte longitudinal de embrión en fase torpedo al día 90

Flecha: Meristema apical en formación

**Fuente:** El Autor

#### 4.7.2 Embrión con primordios foliares



**Figura 46** Corte longitudinal de PLB con brotes foliares

Flecha: Meristema apical en crecimiento

**Fuente:** El Autor

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

Al analizar la respuesta de los explantes provenientes de hojas se observó que supervivencia disminuyó al aumentar la concentración y el tiempo exposición esto pudo ocurrir debido a varios factores como: la edad de la fuente de explante, las condiciones de cultivo de las plantas madre, la genética propia de la especie, el método de introducción a medio in vitro, entre otros (Montes et al., 2016). Los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la desinfección, con un 100% de explantes sin presencia de patógenos, supera a los de investigaciones similares en Heliconias, puesto que las plantas donantes provenían de invernadero y un cultivo controlado, libre de plagas y enfermedades (Marulanda & Isaza, 2004).

En el presente estudio se obtuvo un porcentaje de explantes sin oxidación del 100% con una concentración de 0,5% NaClO y 20 min de exposición, siendo el que mejor resultados dio en comparación con los otros tratamientos utilizados, es posible que esto sea una respuesta del fenotipo de la planta y del agente de desinfección utilizado tal como se describe en pruebas de tolerancia para distintas variedades de café debido a que provenían directamente de una plantación (López et al., 2011). En el caso de la desinfección los tratamientos fueron considerablemente más eficientes que en secciones foliares de café (Montes et al., 2017).

Las hojas de *Dracula vampira* no produjeron callo o embriones somáticos, en diferentes estudios se ha reportado que algunas especies no responden adecuadamente a la presencia de 2-4D en el medio de cultivo, mientras que otras presentan alta eficiencia con este regulador (Janarthanam & Seshadri, 2008). Existen pocos reportes sobre el uso de follaje como recurso para la regeneración de orquídeas dado que estas presentan otras fuentes más eficientes y con mejor respuesta a la aplicación de fitohormonas (Chugh et al., 2009).

Los protocormos presentaron una mayor eficiencia como fuentes de desarrollo de callo y embriones frente al uso de secciones foliares, lo que concuerda con investigaciones previas en el género *Cymbidium* (Chang & Chang, 1998). La formación de callo de consistencia friable y color blanco cremoso, se observó en la totalidad de explantes cultivados independientemente del tratamiento aplicado dando como resultado una respuesta favorable bajo las mismas condiciones de cultivo debido al tejido meristemático

y parenquimático presente lo que concuerda al utilizar porciones delgadas de protocormos de otras especies (Da Silva, 2013). Los explantes en el tratamiento 5 (2 mgL<sup>-1</sup> de BAP y NAA) presentan una media de 55, 33 mg de peso fresco al día 28, en este tiempo el callo ha comenzado su desarrollo y crecimiento alrededor del explante, esto significa un menor tiempo 60 días menos que lo obtenido en orquídeas *Phalaenopsis* sp. (Ishii et al., 1998).

En los tratamientos donde se utilizó una combinación de BAP y 2-4D se observó resultados similares en cuanto al peso fresco del callo, mientras que la combinación de 2-4D y NAA no tuvo resultados eficientes en comparación el resto de formulaciones, aunque si presentó formación de callo tal como se describe en la embriogénesis somática de *Cattleya maxima* (Cueva et al., 2015). El efecto del 2-4D no está difundido en estudios previos acerca de orquídeas, esto debido a la mayor eficiencia del TDZ, ya que puede producir embriogénesis somática directa sin la necesidad de formación de callo, sin embargo debido a la poca disponibilidad y comercialización del mismo, el 2-4D tiene efectos similares si se formula adecuadamente el medio de cultivo (Chen, Chang, & Chang, 1999).

El callo proveniente de porciones de protocormos no requiere el cambio a un medio de cultivo para la estimulación de formación de embriones, puede mantenerse en el mismo medio o cambiarse a medio basal sin reguladores, la rápida propagación del tejido y a la predisposición que presenta para la formación de embriones provoca un agotamiento de la auxina disponible en el medio, lo que es necesario para continuar las distintas fases de la embriogénesis somática (Fujimura, 1979). Es necesario que se exponga los explantes a un fotoperíodo de entre 12 y 16h luz debido a que actúa como inhibidor del efecto de las auxinas y por ende promueve la división celular, en este caso se aplicó 16h fotoperíodo en el día 56 desde la siembra obteniendo los primeros embriones en las 5 semanas posteriores, en comparación con otros estudios que realizan este paso a los 90 o 100 días y obtienen los primeros embriones a los 150 días desde la siembra (Stolarz et al., 1991). El embrión se transforma en un PLB (protocorm-like bodie) o embrión somático de orquídea en el día 93 desde la siembra y el 37 desde la exposición a la luz, esto facilita y acelera la regeneración de nuevas plantas, es posible mejorar estos resultados en suspensiones celulares con medio líquido (Tokuhara & Mii, 2003).

Los estudios histológicos realizados permitieron conocer las distintas etapas del desarrollo del callo que presenta células parenquimáticas, se observó a los 7 días las



primeras masas celulares sin diferenciar, esto concuerda con resultados similares con otras especies como *Coffea arabica* y *Cymbidium ensifolium* (Zhao et al., 2008). El callo proviene de células parenquimáticas con paredes delgadas que desplazan a las células meristemáticas presentes en el centro de protocormo (Da Silva, 2013). Esta estructura parenquimática se desarrolla y comienza a presentar células embrionarias en el día 28 desde la siembra y se observó en el microscopio como células con núcleos grandes que pueden ocupar casi todo el citoplasma y algunas presentan vacuolas (Kuo, Chen, & Chang, 2005).

El tejido embrionario empieza a concentrarse en masas constantes en el borde del tejido indiferenciado, principalmente aquellas secciones que están en contacto con el medio de cultivo. Al día 35 también se pueden observar meristemas apicales y embriones somáticos que pueden llegar a regenerar una planta, en orquídeas del género *Oncidium*, se ha determinado que es posible regenerar directamente embriones somáticos a partir de protocormos, yemas y otros tejidos (Terada, Mroginski, & Luis, 2000).

En el día 49 se pueden apreciar estructuras embrionarias, como secciones prolongadas y densas con células aglomeradas, muchas se desprenden por una leve aplicación de fuerza, dado que ya no están totalmente conectadas con el tejido parenquimático proveniente del callo (Gow, Chen, & Chang, 2009). El embrión se desprendió o comenzó a desarrollarse, tomando una forma esférica irregular y en el centro presentando células embrionarias y alrededor células estructurales, el embrión empezó a crecer y puede producir nuevos embriones a partir de sus tejidos apicales entre el día 77 y el día 90 (Calandra et al., 2002). En el día 93 el embrión termina su etapa de desarrollo y es posible observar el meristemo apical y en algunos casos la aparición de meristemas radiculares, en este momento se considera que el embrión ha finalizado su etapa de desarrollo y se transforma en un PLB, en este instante se produce la regeneración plántula.

En esta investigación el proceso total de embriogénesis somática indirecta llevó aproximadamente 100 días, este proceso es mucho más eficiente que otros estudios que reportan hasta 6 meses en la obtención de plántulas (Huan, Takamura, & Tanaka, 2004).

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- El uso del tratamiento 7 (NaClO 0,05% por 20 min) garantizó la supervivencia y desinfección de explantes provenientes de hojas.
- Las secciones foliares de *Dracula vampira* no respondieron a la aplicación de reguladores de crecimiento para la formación de callo embriogénico debido a la muerte prematura del tejido.
- Los protocormos seccionados presentaron predisposición para la formación de callo y embriones somáticos. La aplicación de los reguladores 2-4D y BAP (M5) con una concentración de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  y  $2 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente produjo la respuesta más eficaz al producir mayor masa de callo de consistencia friable y coloración blanquecina-cremosa.
- Es necesario se exponer el callo embriogénico a la luz solar en el día 56 para inhibir la acción del 2-4D y promover la formación de embriones somáticos.
- El embrión somático se forma aproximadamente en el día 93 desde la introducción al medio de cultivo y 37 días después de la exposición a la luz.
- Las células embrionarias se originan desde paredes delgadas y su presencia es mayor en los bordes del callo, en las zonas donde están en contacto con el medio.
- La caracterización histológica demostró que la embriogénesis somática en *Dracula vampira* se produce dentro de los 100 días posteriores a la introducción del protocormo en medio de cultivo.

#### 6.2 Recomendaciones

- Utilizar protocormos como fuente de explante en el desarrollo de embriogénesis somática en orquídeas del género *Dracula*.
- Realizar el cultivo del callo friable en suspensiones celulares para continuar el proceso de obtención de embriones somáticos.

- Desarrollar una metodología para la regeneración de los embriones somáticos en plántulas y posteriormente un proceso de aclimatación.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Arditti, J. (Ed.). (2008). *Micropropagation of Orchids* (2nd ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Calandra, D. M., Mauro, D. Di, Cutugno, F., & Martino, S. Di. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell*, (69), 233–249.  
<http://doi.org/10.1023/A>
- Chang, C., & Chang, W. C. (1998). Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. *Plant Cell Reports*, (17), 251–255.
- Chen, J. T., Chang, C., & Chang, W. C. (1999). Direct somatic embryogenesis of leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 19, 143–149. <http://doi.org/10.1023/A:1013304101647>
- Chen, J., & Wei, C.-C. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, 50(June 2006), 169–173. <http://doi.org/10.1007/s10535-006-0002-8>
- Chugh, S., Guha, S., & Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507–520.  
<http://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>
- Chung, H.-H., Chen, J.-T., & Chang, W.-C. (2005a). Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium chiengmai* pink and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(6), 765–769.  
<http://doi.org/10.1079/IVP2005702>
- Chung, H.-H., Chen, J.-T., & Chang, W.-C. (2005b). CYTOKININS INDUCE DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *DENDROBIUM CHIENGMAI* PINK AND SUBSEQUENT PLANT REGENERATION. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, 41(December), 765–769. <http://doi.org/10.1079/IVP2005702>
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Hernández, M., Peralta, N., & Trujillo, R. (2005). EFECTO DE TRES ANTIOXIDANTES EN EL CULTIVO In Vitro DE ÁPICES DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.). Y EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS.
- Conger, B. Novak, F. Afza, R. Erdelsky, K. (1987). Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Reports*, (6), 345–347.
- Cueva, A., Chicaiza, I., & Cella, R. (2013). Combination of 2,4-D and stress improves indirect Somatic Embryogenesis in *Cattleya maxima* Lind. *Plant Biosystems*,

- (Abril 2013), 37–41. <http://doi.org/10.1080/11263504.2013.797033>
- Cueva Agila, A. Y., Guachizaca, I., & Cella, R. (2015). Combination of 2,4-D and stress improves indirect somatic embryogenesis in *Cattleya maxima* Lindl. *Plant Biosystems*, 149(2), 235–241. <http://doi.org/10.1080/11263504.2013.797033>
- Da Silva, A., Goncalves, J., Gaspar, L., & Asensao, L. (2007). *Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos*. (F. de C. da U. de L. C. de B. Vegetal, Ed.) (1st ed.). Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa Centro de Biotecnologia Vegetal.
- Endara, L., Grimaldi, D., & Roy, B. A. (2010). Lord of the flies: pollination of *Dracula* orchids. *Lankesteriana*, 10(1), 1–12. <http://doi.org/10.5958/0974-4517.2015.00025.7>
- Fujimura, T. (1979). Synchronization of Somatic Embryogenesis in a Carrot Cell. *Plant Physiology*, 64, 162–164.
- Garro-monge, G., Gatica-arias, A. M., Valdez-melara, M., Costarricense, A., & Rica, U. D. C. (2008). Somatic embryogenesis, plant regeneration and acemannan detection aloe (*Aloe barbadensis* MILL.). *Agronomía Costarricense*, 32(2), 41–52.
- Gow, W. P., Chen, J. T., & Chang, W. C. (2009). Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(2), 363–369. <http://doi.org/10.1007/s11738-008-0243-6>
- Hernández, O., Castillo, H., Daniel, F., Herrera, R., Fuentes, V., Edmundo, S., ... Alberto, J. (2016). Propagación in vitro de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia*, 67, 19–25.
- Hossain, M. M., Kant, R., Van, P. T., Winarto, B., Zeng, S., & Teixeira da Silva, J. A. (2013). The Application of Biotechnology to Orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(2), 69–139. <http://doi.org/10.1080/07352689.2012.715984>
- Huan, L. V. T., Takamura, T., & Tanaka, M. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166(6), 1443–1449. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.01.023>
- Huang, Y. W., Tsai, Y. J., Cheng, T. C., Chen, J. J., & Chen, F. C. (2014). Physical wounding and ethylene stimulated embryogenic stem cell proliferation and plantlet regeneration in protocorm-like bodies of *phalaenopsis* orchids. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 9543–9557.

<http://doi.org/10.4238/2014.November.12.3>

- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M., & Tanaka, M. (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis. *Plant Cell Reports*, (October), 446–450.
- Islam, S. M. S., & Bhattacharjee, B. (2015). Plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Rhynchosyilis retusa* (L.) Blume. *Applied Biological Research*, 17(2), 158. <http://doi.org/10.5958/0974-4517.2015.00025.7>
- Janarthanam, B., & Seshadri, S. (2008). Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(2), 84–89. <http://doi.org/10.1007/s11627-008-9123-4>
- Kaur, S., & Bhutani, K. K. (2013). In vitro conservation and asymbiotic propagation of *Coelogyne flaccida* (Lindl.): A threatened orchid. *Plant Biosystems*, 148(December 2014), 935–944. <http://doi.org/10.1080/11263504.2013.801368>
- Knudson, L. (1922). NONSYMBIOTIC GERMINATION OF ORCHID SEEDS. *Botanical Gazette*, LXXIII(1).
- Kuo, H.-L., Chen, J.-T., & Chang, W.-C. (2005). Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of Phalaenopsis ‘Little Steve.’ *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(4), 453–456. <http://doi.org/10.1079/IVP2005644>
- Lam, I. L., González, O. S., Sam, O., Hernández, M. M., Coronado, M. J., & Silva, J. J. (2005). CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE LIMBOS FOLIARES DE BONIATO (*Ipomoea batatas* L. Lam.).
- Lee, H., Gonzáles, M., Laguna, A., García, B., Gámez, M., Galindo, M., ... Santana, N. (2009). ENCAPSULACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA SINTÉTICA H. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(2), 33–40.
- Lee, H., Laguna, A., Murgía, J., Iglesias, L., García, B., Escobedo, D., ... Santana, N. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización in vitro de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 323–332.
- Lee, P. L., & Chen, J. T. (2014). Plant regeneration via callus culture and subsequent in vitro flowering of *Dendrobium huoshanense*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10), 2619–2625. <http://doi.org/10.1007/s11738-014-1632-7>

- Lee, Y. I., Hsu, S. Te, & Yeung, E. C. (2013). Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *American Journal of Botany*, *100*(11), 2121–2131.  
<http://doi.org/10.3732/ajb.1300193>
- León-yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador*. (S. León-Yáñez, R. Valencia, & H. Navarrete, Eds.) (2nd ed.). Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Lewis, K. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *The Botanical Gazette*, *73*(January), 1–25.
- Liao, Y.-W., Huang, P.-L., Huang, K.-L., Ikuo, M., & Hsu, S. (2015). Factors Affecting to Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from. *Kyushu University*, *60*(1), 13–22.
- Liao, Y. J., Tsai, Y. C., Sun, Y. W., Lin, R. S., & Wu, F. S. (2011). In vitro shoot induction and plant regeneration from flower buds in Paphiopedilum orchids. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *47*(6), 702–709.  
<http://doi.org/10.1007/s11627-011-9370-7>
- López, P., Iracheta, L., Castellanos, M., Méndez, I., Aguirre, J., Gutiérrez, A., ... Ribai, B. (2011). VARIACIÓN EN LA TOLERANCIA A DESINFECTANTES DE GENOTIPOS ÉLITE DE Coffea spp. CULTIVADOS in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *2*, 645–657.
- Luer, C. A. (1978a). DRACULA , a new genus in the Pleurothaliinidae. *Marie Selby Botanical Gardens , Inc*, *2*(2), 190–198.
- Luer, C. A. (1978b). DRACULA , a new genus in the Pleurothaliinidae. *Selbyana*, *2*(2), 190–198.
- Marinucci, L., Ruscitti, M., & Abedeni, W. (2004). Morfogénesis in vitro de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *La Plata (Argentina)*, *105*(2), 27–36.
- Marulanda, M., & Isaza, L. (2004). ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE HELICONIAS CON FINES DE PRODUCCIÓN MASIVA RESUMEN. *Scientia et Technica*, *26*(Diciembre 2004), 193–197.
- Mikula, A., Pozoga, M., & Rybcznski, J. (2015). An unique system of somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb .: the importance of explant type , and physical and chemical factors. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, *123*, 467–478. <http://doi.org/10.1007/s11240-015-0850-z>
- Montes, S., Lalama, J., Echeverría, J., Toromoren, L., Salazar, S., Benavides, S., &

- Atiaja, J. (2017). Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador. *Dominio de Las Ciencias*, 3, 918–942.
- Montes, S., Lalama, L., Echeverría, M., & Salazar, S. (2016). Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero Biotic and abiotic factors influencing acclimatization in the greenhouse Factores bióticos e abióticos que influyen a aclimataçãõ na estufa Resumen. *Dominio de Las Ciencias*, 2, 63–89.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 15(3), 473–497.  
<http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Novak, S. D., Luna, L. J., & Gamage, R. N. (2014a). Role of auxin in orchid development. *Plant Signaling and Behavior*, 9(10).  
<http://doi.org/10.4161/psb.32169>
- Novak, S. D., Luna, L. J., & Gamage, R. N. (2014b). Role of Auxin in Orchid Development. *Plant Signaling & Behavior*, 2324(October 2014).  
<http://doi.org/10.4161/psb.32169>
- Petru, E. (1970). Development of Embryoids in Carrot Root Callus Culture ( *Daucus carota* L .). *Biologia Plantarum*, 12(1), 1–5.
- Plana, D., Alvarez, M., Florido, M., Lara, R., & Nuñez, M. (2002). EFECTO DEL BIOBRAS 6 EN LA MORFOGÉNESIS In Vitro DEL TOMATE (*Lycopersicon esculentum*, Mill) VAR. AMALIA Dagmara. *Cultivos Tropicales*, 23(2), 21–25.
- Poobathy, R., Sinniah, U. R., Rathinam, X., & Subramaniam, S. (2013). Histology and scanning electron microscopy observations of cryopreserved protocorm-like bodies of *Dendrobium sonia*-28. *Turkish Journal of Biology*, 37(2), 191–198.  
<http://doi.org/10.3906/biy-1206-22>
- Ptak, A., & Bach, A. (2007). Somatic embryogenesis in tulip ( *Tulipa gesneriana* L .) flower stem cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*, 43, 35–39.  
<http://doi.org/10.1007/s11627-006-9004-7>
- Pupulin, F., Merino, G., & Medina, H. (2009). *Draculas del Ecuador* (1st ed.). Quito: Universidad Alfredo Pérez Guerrero Centro Cultural.
- Rout, G. R., Mohapatra, A., & Jain, S. M. (2018). Tissue culture of ornamental pot plant : A critical review on present scenario and future prospects, IV(October



- 2017). <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.05.001>
- Stolarz, A., Macewicz, J., & Lörz, H. (1991). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, *137*(3), 347–357. [http://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80144-6](http://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80144-6)
- Teixeira da Silva, J. A. (2013). The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *113*(2), 149–161. <http://doi.org/10.1007/s11240-012-0274-y>
- Teixeira, J. A. (2012). The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, *113*(December), 149–161. <http://doi.org/10.1007/s11240-012-0274-y>
- Teixeira, J. A., Kerbauy, G. B., Zeng, S., Chen, Z., & Duan, J. (2013). In vitro flowering of orchids. *Critical Reviews in Biotechnology*, (July 2013), 1549–7801. <http://doi.org/10.3109/07388551.2013.807219>
- Terada, E. A., Mroginski, G., & Luis, A. (2000). Regeneración de protocormos y yemas de *Oncidium bifolium* Sims . por cultivo in vitro de láminas foliares. *Plant Cell Reports*, (3400), 5–7. <http://doi.org/10.1007/s00421-010-1649-6>
- Tisserat, B., Esan, E. B., & Murashige, T. (1979). Somatic Embryogenesis in Angiosperms. *Horticultural Reviews*, *3*(January), 1–78. <http://doi.org/10.1002/9781118060742.ch1>
- Tokuhara, K., & Mii, M. (2003). Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of phalaenopsis orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *39*(6), 635–639. <http://doi.org/10.1079/IVP2003466>
- Tulecke, W., & Mcgranahan, G. (1985). SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM COTYLEDONS OF WALNUT , JUGLANS REGIA L. *Tissue and Cell*, *40*, 57–63.
- Williams, E. G., & Maheswaran, G. (1986a). Somatic embryogenesis factors in influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany*, *57*, 443–462. <http://doi.org/10.1093/aob/mcg002>
- Williams, E. G., & Maheswaran, G. (1986b). Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann. Bot.*, *57*(4), 443–462. <http://doi.org/10.1093/aob/mcg002>
- Zeng, S., Huang, W., Wu, K., Zhang, J., Teixeira Da Silva, J. A., & Duan, J. (2016). In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical Reviews in Biotechnology*,

36(3), 521–534. <http://doi.org/10.3109/07388551.2014.993585>

- Zeng, S., Zhang, Y., Teixeira Da Silva, J. A., Wu, K., Zhang, J., & Duan, J. (2014). Seed biology and in vitro seed germination of *Cypripedium*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(4), 358–371. <http://doi.org/10.3109/07388551.2013.841117>
- Zhao, P., Wu, F., Feng, F. S., & Wang, W. J. (2008). Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(3), 178–185. <http://doi.org/10.1007/s11627-007-9101-2>
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5(October), 1411–1423. <http://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1411>

## ANEXOS

### ANEXO 1. Registro de peso de los explantes

Tratamiento	Explante	Peso día 28 (mg)
M0 Control	1	64
	2	90
	3	72
	4	67
	5	50
	6	51
	7	59
	8	56
	9	54
	10	49
	11	59
	12	72
M1	1	46
	2	48
	3	32
	4	39
	5	37
	6	28
	7	44
	8	48
	9	36
	10	46
	11	40
	12	58
	1	41

M2	2	48
	3	75
	4	52
	5	35
	6	20
	7	40
	8	49
	9	35
	10	75
	11	37
	12	49
	M3	1
2		65
3		54
4		46
5		65
6		52
7		40
8		57
9		42
10		53
11		75
12		35
M4	1	43
	2	78
	3	55
	4	57
	5	50
	6	60
	7	42
	8	47
	9	50
	10	44
	11	60

	12	44
M5	1	55
	2	62
	3	47
	4	41
	5	64
M5	6	41
	7	50
	8	57
	9	75
	10	54
	11	66
	12	52
M6	1	75
	2	62
	3	46
	4	32
	5	38
	6	46
	7	57
	8	69
	9	65
	10	43
	11	44
	12	45
M7	1	36
	2	37
	3	39
	4	60
	5	24
	6	45
	7	37
	8	48
	9	40

	10	31
	11	49
	12	49
M8	1	46
	2	48
	3	50
	4	34
M8	5	44
	6	48
	7	47
	8	54
	9	65
	10	67
	11	65
	12	49
M9	1	35
	2	40
	3	33
	4	29
	5	31
	6	42
	7	60
	8	33
	9	26
	10	27
	11	30
	12	