

# Determinación del balance embriogénica de segmentos foliares de *Phaleanopsis* *amabilis* L.

*por* Francis Tananta Bardales

---

**Fecha de entrega:** 11-ene-2023 12:39p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1991324755

**Nombre del archivo:** 7.\_Francis\_Tananta\_B.\_TESIS.docx (3.62M)

**Total de palabras:** 14556

**Total de caracteres:** 77444

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**Determinación del balance embriogénica de segmentos foliares de  
*Phaleanopsis amabilis* L.**

**Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo**

**AUTOR:**

**Francis Tananta Bardales**

**ASESOR:**

**Ing. M.Sc. Harry Saavedra Alva**

**Tarapoto – Perú**

**2022**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**Determinación <sup>1</sup> del balance embriónica de segmentos foliares de  
*Phaeanopsis amabilis* L.**

**AUTOR:  
Francis Tananta Bardales**

**<sup>2</sup> Sustentada y aprobada el día 01 de febrero 2022, por los siguientes jurados**

\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Rengifo Saavedra  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Dr. Orlando Ríos Ramírez  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Ing. M.Sc. Jorge Luis Peláez Rivera  
Miembro

\_\_\_\_\_  
Ing. M.Sc. Henry Saavedra Alva  
Asesor

## Declaratoria de autenticidad

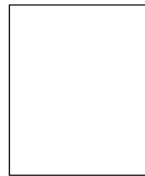
**Francis Tananta Bardales**, con DNI N° 70159047, egresado de la Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín, autor de la tesis titulada: **Determinación del balance embriogénica de segmentos foliares de *Phaleanopsis amabilis* L.**

Daclaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencias de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda información que contiene la tesis no ha sido plagiada.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados, ni copiada, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndose a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín.

Tarapoto, 1 de febrero del 2022



Francis Tananta Bardales

DNI N° 70159047



## **Dedicatoria**

### **A Dios:**

Por ser la guía y siempre estar acompañándome en mi vida diaria, ya que el con su paciencia y sabiduría me ayudo a terminar con éxito una de las metas propuestas en mi vida.

### **A mi mamá:**

**Flor Ángela Bardales Pinedo**, porque ella estuvo en las buenas y las malas y lo seguirá haciendo, además de haberme dado la vida, siempre confió en mí y nunca me abandono, Te Amo Mamita.

### **Asesor y Co-asesor:**

Por brindarme su sabiduría, sus distintos conocimientos y por su apoyo, y motivaron incondicional para desarrollarme tanto como persona y convertirme en una gran profesional en la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Y por supuesto a mi querida Universidad y todas las autoridades, por permitir concluir con una etapa más de mi vida, gracias por la paciencia, orientación y guiarme en el desarrollo de esta investigación.

## Agradecimiento

- Siempre a **Dios**, por ser la guía en mi camino y de esa manera poder concluir con mi objetivo de culminar mi carrera profesional.
- Al **Ing. M.Sc. Harry Saavedra Alva** quien es mi asesor, ya que, con su experiencia, conocimientos y sobre todo por motivarme y de esa manera me oriento en mi trabajo de investigación de tesis.
- También debo agradecer a los múltiples docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias y a mi escuela profesional de **Agronomía** ya que me transmitieron sus conocimientos durante mi proceso de estudiante para así poder formarme como un profesional competente.
- Quiero agradecer a cada uno de mis jurados: **al Dr. Carlos Rengifo Saavedra; Dr. Orlando Ríos Ramírez e Ing. M.Sc. Jorge Luis Peláez Rivera**, por sus sugerencias y distintas correcciones en mi trabajo de investigación de tesis.

## Índice general

	<b>Página</b>
Dedicatoria .....	vi
Agradecimiento .....	vii
Índice General .....	viii
Lista de Tablas .....	x
Lista de Figuras .....	xi
Resumen .....	xiii
Abstract .....	xiv
Introducción .....	1
<b>CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
1.1. Generalidades de <i>Phalaenopsis</i> .....	17
1.1.1. Origen y distribución .....	17
1.1.2. Clasificación botánica .....	17
1.1.3. Morfología general .....	18
1.1.4. Importancia económica .....	19
1.1.5. Multiplicación de <i>Phalaenopsis</i> .....	19
1.2. Cultivo de tejidos vegetales .....	19
1.2.1. Explante .....	20
1.2.2. Segmentos foliares .....	21
1.2.3. Asepsia .....	21
1.2.4. Medios de cultivo .....	21
1.2.5. Periodos de incubación .....	22
1.2.6. Condiciones ambientales de incubación .....	22
1.3. Embriogénesis somática .....	22
1.3.1. Tipos de embriogénesis somática .....	24
1.3.2. Fases de la embriogénesis somática .....	25
1.4. Hormonas reguladoras de crecimiento .....	27

1.4.1. Auxinas.....	27
1.4.2. Cito quininas. ....	28
1.4.3. Interacción auxina-citoquinina.....	29
1.5. <sup>2</sup> Antecedentes de la investigación.....	30
<b>CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	32
2.1. Localización del experimento.....	32
2.2. Materiales.....	32
<sup>21</sup> 2.3. Métodos.....	33
2.3.1. Diseño experimental.....	33
<sup>20</sup> 2.3.2. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	34
<sup>8</sup> 2.3.3. Conducción del experimento.....	36
2.3.4. Parámetros evaluados.....	45
<b>CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	32
3.1. Porcentaje de callogenesis (%).....	32
3.2. Número de Pro-Embrioides.....	37
3.3. Número de Embrioides (N°).....	42
3.4. Plantas regeneradas (N°).....	47
<b>CONCLUSIONES</b> .....	53
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	54

## Lista de tablas

Tabla 1	Combinación de los Factores a x b.....	34
Tabla 2	Análisis de Varianza para callogenesis (%), Datos Transformados ( $\text{Sen}^{-1}x$ ) .....	33
Tabla 3	Análisis de Varianza para Pro-Embrioides ( $N^\circ$ ), Datos Transformados ( $\sqrt{x}$ ).....	38
Tabla 4	Análisis de Varianza para Embrioides ( $N^\circ$ ), Datos Transformados ( $\sqrt{x}$ ).....	43
Tabla 5	Análisis de Varianza para Plantas ( $N^\circ$ ), Datos Transformados ( $\sqrt{x}$ ).....	48

## Lista de figuras

Figura 1. Cápsulas de <i>Phalaenopsis amabilis</i> L.....	36
Figura 2. Semillas Viables.....	37
Figura 3. Extracción de Semillas.....	38
Figura 4. Plantulas de <i>Phalaenopsis amabilis</i> L. ....	39
Figura 5. Stock Preparados.....	40
Figura 6. Agar-Agar y Azúcar.....	40
Figura 7. Preparación de Medio de Cultivo.....	40
Figura 8. Medio de Cultivo para Autoclave.....	41
Figura 9. Medio de Cultivo Auto Clavado.....	41
Figura 10. Extracción del Material Vegetal.....	42
Figura 11. Segmentos Foliare (Basal, Intermedio y Apical.) .....	42
Figura 12. Incubación de Segmentos Foliare.....	43
Figura 13. Calogénesis (%), Análisis Descriptivo de los Factores a y b. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
Figura 14. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para Calogénesis (%) por Tratamiento. ....	33
Figura 15. Calogénesis (%), de la Interacción del Factor a x b.....	34
Figura 16. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) Calogénesis (%), Factor “a”. ....	35
Figura 17. Calogénesis (%), en el Factor “a”. ....	35
Figura 18. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) Calogénesis (%), Factor “b”. ....	36
Figura 19. Calogénesis (%) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor “b”. ....	36
Figura 20. Pro-Embrioides (N°), Análisis Descriptivo de los Factores a y b.....	37
Figura 21. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para Pro-Embrioides (N°) por Tratamiento. ....	38
Figura 22. Pro-Embrioides (N°), de la Interacción del Factor a x b.....	39
Figura 23. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) Pro-Embrioides (N°), Factor “a”. ....	40
Figura 24. Pro-Embrioides (N°), en el Factor “a”. ....	40
Figura 25. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) Pro-Embrioides (N°), Factor “b”. ....	41
Figura 26. Pro-Embrioides (N°) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor “b”. .....	41
Figura 27. Embrioides (N°), Análisis Descriptivo de los Factores a y b.....	42
Figura 28. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para Embrioides (N°) por Tratamiento. ....	43
Figura 29. Embrioides (N°), de la Interacción del Factor a x b.....	44
Figura 30. Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) Embrioides (N°), Factor “a”. ....	45
Figura 31. Embrioides (N°), en el Factor “a”. ....	45

Figura 32. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Embrioides (N°), Factor “b”. .....	46
Figura 33. Embrioides (N°) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor “b”. .....	46
Figura 34. Plantas Regeneradas (N°), Análisis Descriptivo de los Factores a y b. ....	47
Figura 35. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Plantas (N°) por Tratamiento. ....	48
Figura 36. Plantas Regeneradas (N°), de la Interacción del Factor a x b. ....	49
Figura 37. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Plantas (N°), Factor a (Tejido Foliar). ....	50
Figura 38. Plantas (N°), en el Factor “a”. .....	50
Figura 39. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Plantas (N°), Factor b. ....	51
Figura 40. Plantas (N°) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor b. ....	51

## Resumen

El objetivo de la investigación fue determinar el balance embriogénico de segmentos foliares de *Phaleanopsis amabilis* L. Se desarrollo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín. Utilizando un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial de 3 x 4, el factor a “región del tejido foliar”, factor b “tiempo de oscuridad”. La metodología se baso en: primero en la separación y elaboracion de las plantas madre. Segundo que es la Primera fase: Inducción de la embriogénesis somática. Tercero que es la Segunda fase: Multiplicación y desarrollo de callos. Cuarto que es la cuantificación de Auxinas y Citocininas: Los resultados fueron presentados en una estadística descriptiva e inferencial con Análisis de Varianza (ANVA), prueba de rango múltiple Duncan ( $\alpha=0.01$ ). En los resultados se hallo la diferencia entre los tratamientos, factores e interacción entre los niveles de factores. Logrando obtener en promedios; 48.82% de callogénesis, 8 pro-embrioides, 7 embrioides y 6 plantas regeneradas, estos resultados expresendonos demuestran que a mayor tiempo de oscuridad (05 días, 10 días, 15 días y 20 días), mayor callogénesis (%), pro-embrioides, embrioides y plantas regeneradas, generando una respuesta lineal y una relación de correlación muy alta, en la región foliar basal y apical no se lograron resultados para la regeneración de plantas.

**Palabras claves:** embriogénesis somática, embrioides



## Abstract

The objective of the research was to determine the embryogenic balance of leaf segments of *Phaleanopsis amabilis* L. It was developed in the Laboratory of Plant Tissue Cultures of the National University of San Martín. Using a Completely Random Design with a factorial arrangement of 3 x 4, factor a “region of leaf tissue”, factor b “dark time”. The methodology was based on: first in the selection and preparation of the mother plants. Second, which is the First phase: Induction of somatic embryogenesis. Third, which is the second phase: multiplication and development of calluses. Fourth, which is the quantification of Auxins and Cytokinins: The results were presented in descriptive and inferential statistics with Analysis of Variance (ANVA), Duncan's multiple range test ( $\alpha= 0.01$ ). The results found the difference between treatments, factors and interaction between factor levels. Achieving in averages; 48.82% callogenesis, 8 pro-embryoids, 7 embryoids and 6 regenerated plants, these results expressing us show that the longer the dark time (05 days, 10 days, 15 days and 20 days), the greater callogenesis (%), pro-embryoid, embryoids and regenerated plants, generating a linear response and a very high correlation relationship, in the basal and apical foliar region no results were achieved for the regeneration of plants.

**Keywords:** somatic embryogenesis, embryoids.

## Introducción

Dodson (2015), nos indica en su investigación que:

Las orquídeas pertenecen a una de las familias muy numero en el mundo en lo que concierne a las plantas con flores teniendo así mas de 20 generos y 20 000 especies. Aproximadamente el 7% del total de las especies de plantas con flores son orquídeas. Además de ser una de las más grandes, es conocida por la inmensa variedad en las formas de sus flores. Pueden crecer en los arboles (epifitas) o en la tierra (terrestres) y son más comunes en las regiones tropicales.

Manuel (2007), dentro de su investigación podemos conocer que:

La orquídea del género *Phalaenopsis* es una orquídea epífita, originaria del sureste de Asia, India, Indonesia y parte de Australia (Rittershausen y Rittershausen, 2004/citado por Manuel, 2007), constituyendo la producción de la flor y la planta el 60% del mercado mundial (ISSN, 2007). Su reproducción natural es difícil debido a su lento crecimiento monopodial es necesario por lo tanto establecer nuevos protocolos de propagación in vitro para ser más eficiente en su multiplicación (Rodrigo, 2018)

Gil (2022), nos informa en su trabajo de tesis que la variedad:

*Phalaenopsis* representa uno de los grupos de orquídeas más apreciados por el colorido y la duración de sus flores. A diferencia de otras especies de orquídeas, la forma de reproducción es difícil, ya que su crecimiento monopoidal lento ha dificultado la multiplicación vegetativa de materiales selectos y la reproducción sexual se ha visto agravada en algunos híbridos selectos.

Harper (2004) para su investigación:

Referido por Cruz (2009), se refiere a las orquídeas del género *Phalaenopsis* que están entre las más comercializadas a nivel mundial con una estimación alrededor del 75% y entre los países productores de orquídeas se destacan Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, países Bajos y Tailandia. Estas orquídeas muestran las siguientes características: de un crecimiento monopodial, con raíces largas, hojas suculentas, no tienen un pseudobulbo, sus racimos se agrupan en las axilas de las hojas y estas suelen tener un color: rosa, lila, blanco, amarillo y pueden

conservarse de en un buen estado durante 10 a 6 semanas convirtiéndolas así en las indicadas como decoración de plantas ornamentales para casas.

Thorpe (2022), nos menciona en su trabajo de investigación que:

Aislado una cantidad apropiada de segmentos y/o plantas es necesario expresar el potencial inducido o intrínseco de la célula en la parte química y física.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica muy utilizada que consiste en separar un grupo de plantas y brindarles las condiciones básicas tanto como químicas y físicas que requieren para su desarrollo, pero de manera artificial en un laboratorio todo esto con el objetivo que las células de las plantas muestren su potencial inducido y intrínseco.

Stoller (2015), refiere en su investigación que:

La presencia de las hormonas vegetales en diferentes niveles de diferentes estados de desarrollo en el ciclo de la planta, están disponibles en suficientes cantidades en todo el ciclo de la vida de la planta para maximizar la expresión genética. Por eso las hormonas deben ser sintetizadas constantemente y reguladas para mantener y prolongar un sano crecimiento de las puntas de las raíces es crítico para el óptimo balance hormonal necesario para su máxima expresión genética.

Según lo analizado en el contexto nacional, regional y local se definió como **problema principal**; ¿Cuál será el periodo de la fase oscura y región del segmento foliar que permitan regenerar plantas completas de *Phaleanopsis amabilis* L.?

La **hipótesis de investigación** es; Con la determinación del balance hormonal en la región espacial del tejido foliar de orquídeas, se podrá fomentar estructuralmente clones idénticos de manera masificada de *Phaleanopsis amabilis* L. bajo condiciones de laboratorio.

Se planteó como **objetivo general**; Determinar el balance embriogénico de segmentos foliares en *Phaleanopsis amabilis* L., entre los **objetivos específicos** se plantearon; Determinar la región espacial del tejido foliar más activo a la generación de embrioides somáticos; Determinar los periodos de incubación en fase oscura y luminosa de segmentos de tejidos foliar, Determinar la concentración hormonal endógena de auxinas y cito quininas sobre diferentes segmentos de tejidos foliar.

Con esta investigación se busca determinar determinar periodos de fase oscura para la generación de callos embriogénicos y estructuras pro-embriogénicas, capaces de poder regenerar plantas completas. Paralelamente el estudio permitirá determinar la región (segmento) más activa del tejido foliar de *Phaleanopsis amabilis* L. los resultados esperados serán inéditos y tendrán una originalidad para ser publicados en revistas especializadas. A corto, los nuevos conocimientos obtenidos por el proyecto podrán ser replicados y utilizados en estudios avanzados de fisiología vegetal.

# 1 CAPÍTULO I

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Generalidades de *Phalaenopsis*

#### 1.1.1. Origen y distribución.

Rosas (2018), menciona en su investigación:

La palabra *Phalaenopsis* del griego *phalaina*, “mariposa” y *opsis*, “parecido”, debido a las inflorescencias de algunas especies, que recuerdan a mariposas en vuelo

Harper (2004), se refiere en trabajo que:

El género *Phalaenopsis* abarca unas 70 especies con numerosos híbridos cultivados de flores de diversos colores y tamaños, en la actualidad se encuentran un sinnúmero de híbridos de las especies de origen que lo podemos observar en tiendas, supermercados, en diferentes florerías ya que es una de las orquídeas más conocidas y cotizadas. Su origen se remota desde el sur de China hasta el Noreste de Australia abarcando también Sumatra, Indonesia, Filipinas, Borneo. Por lo general su desarrollo se da en altitudes bajas, de manera epífita es decir crecen sobre otro vegetal de pocas hojas y con suministro de agua sin embargo también pueden crecer de manera litofítica es decir se desarrollan sobre rocas que están cubiertas de musgos en los bosques.

#### 1.1.2. Clasificación botánica.

Blume (2018), menciona en su estudio la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	:	Vegetal
División	:	Spermatophytes
Sub – División	:	Angiospermas
Clase	:	Monocotiledoneas
Orden	:	Microspermales
Familia	:	Orchidaceae
Sub familia	:	Vandoideae

Tribu	:	Vandaeae
Sub tribu	:	Sarcanthinae
Género	:	Phalaenopsis
Especie	:	amabilis

Gracias a que esta orquídea es muy conocida se dieron paso a la creación de muchos híbridos artificialmente como, por ejemplo: el Phalaenopsis que fue el primer híbrido creado en 1875 por John Seden en Inglaterra y fue en el mismo país, pero en el año 1886 que cruzaron dos especies una fue la *Phalaenopsis amabilis* L. la otra es la equestris Phalaenopsis Rchb donde al final se sembró la planta y de allí solo floreció una de las semillas y para que esto suceda tuvo que pasar una década. Otros 13 híbridos de primaria fueron hechos en 1900 por flores y John Seden el fin de las creaciones de híbridos en ese entonces era básicamente para ser exhibidas en salones como plantas exóticas.

### 1.1.3. Morfología general.

Harper (2004) indicó dentro de su investigación que:

Es una planta básicamente epífita porque crecen y viven sobre ramas de árboles y troncos porque son usadas como anclaje donde las raíces largas que poseen se aferran y se pegan fuerte de las cortezas de los árboles para así resistir a los vientos fuertes de la naturaleza, no son parásitas, pues no se alimentan del árbol, que solamente les sirve de soporte. Los tallos cortos provistos de 2-6 hojas grandes, coriáceas, carnosas y con grandes raíces con las que se adhieren a ramas, troncos, etc. La planta sólo produce unas pocas hojas que son grandes y carnosas, pero no muy largas. Tiene raíces aéreas muy fuertes. Las flores aparecen en tallos largos y arqueados y en un número de hasta 30. Oscilan entre 2,5 y 13 cm y pueden aparecer en cualquier época del año, con una duración de hasta tres semanas. Los colores son variables, rosa, rojo violáceo, etc., las brácteas son de 5 mm, triangulares.

<sup>19</sup> Las **hojas**: Son de color verde oscuro con manchas azules grisáceas donde los basales se desprenden al mismo tiempo quedando 4 a 5 hojas en la planta.

El **rizoma**: Se forma de manera erecta y los extremos forman 2 hojas alternas, suculentas y elípticas todos los años.

Las **raíces:** Tienen contexturas gruesas y cubiertas de un tejido esponjoso (velamen) que cumple la función de absorber nutrientes y agua ya que por dentro se encuentra la raíz principal que contiene clorofila que es de color verde.

Las **flores:** Esta formada de tres sépalos o también llamado pétalos que cada uno de ellos tienen un inferior distinto que da origen al llamado labelo y en medio del petalo lo divide una columna llamada fusión de los estambres y pistilos. Los sepalos florecen de 2 a 3 veces al año durante 6 a 10 semanas ya dependiendo de su manejo.

#### 1.1.4. Importancia económica.

Jia-Hua y Jen-Tsung (2008), en su trabajo de investigación referente a:

La orquídea *Phaleanopsis* en los últimos años ha ido creciendo su popularidad, por sus bellas flores y la factibilidad de producción del cultivo en condiciones artificiales y su largo periodo de vida como planta ornamental.

Griesbach (2002) cit por Rosas (2018), recalca que en su estudio:

Por su alto valor económico en países como Alemania, China Países Bajos, Estados Unidos entre otra muestra una producción de grandes proporciones de *Phaleanopsis* en maceta. En el 2016 la conocida identidad de control de fauna y forestal silvestre llamado el Pedregal que se encuentra ubicado en la región Junín incauto material que estuvo valorado en 30, 000 que es un aproximado de 9000 dolares americano hasta 24 000 dolares. Multiplicación de *Phaleanopsis*.

Tirado (2005) y Rosas (2018), coinciden en sus trabajo de investigación que:

La *Phaleanopsis* por su lento desarrollo en condiciones naturales, siendo dependiente de su relación simbiótica con un hongo micorrísico, impuso su producción en gran escala, la demanda exige buscar nuevas alternativas y entre ellas la técnica de cultivo in vitro ha permitido su facilidad de multiplicación de plantas para el comercio. El éxito dependerá del tipo de explante a utilizar, como también desarrollando formas de propagación clonal in vitro, entre ellas la formación de embriones somáticos a partir de calos y la formación de cuerpos similares a protocormos a partir de segmentos foliares u otros Cultivo de tejidos vegetales.

Eduelp (2015), precisa en su investigación que:

Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se desarrollan microorganismos o células o tejidos vegetales y/o animales. El desarrollo de este solo ocurre en presencia de los nutrientes requeridos (que dependen del microorganismo o tipo de células o tejido en particular).

Perea y Tirado (2011), para su trabajo de tesis determinaron que:

La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal “in vitro” y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento.

Roca y Mroginski (1991), para su estudio de investigación emplearon:

La técnica del cultivo *In vitro* no solo ayuda a entender los eventos de diferenciación celular si no también al aprovechamiento de explotar de manera eficiente a las plantas. Mencionan que las plantas cultivadas a través de esta técnica los descendientes que se obtienen se llama clones que serán idénticas genéticamente a la madre, una planta propagada por semillas no se considera clonal porque cada una de estas semillas posee su propia base genética que es la combinación de genes que es el resultado de sus dos progenitores.

Mroginski y otros (2006), dentro de su investigación nos informan que:

No existe un medio universal para todos los propósitos ni para todas las especies que se trabajan in vitro, sin embargo, se puede utilizar el medio básico o de Murashige y Skoog (M&S). Actualmente se encuentran más de 80 medios comerciales que se venden listos para micro propagación y la literatura menciona alrededor de 2000 formulaciones diferentes.

Para establecer cultivos mediante la técnica in vitro se debe considerar ciertos estímulos como: condiciones ambientales, normas de higiene, factores favorables para poder así obtener buenas respuestas del procedimiento.

#### **1.1.5. Explante.**

Roca y Mroginski (1991), dentro de su trabajo se identificó que:



Un explante es lo que se necesita en primer lugar para establecer el procedimiento y se debe elegir el apropiado dependiendo la variedad de especie utilizada.

#### **1.1.6. Segmentos foliares.**

Ecured (2018), en su estudio de su investigación menciona que:

Órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento separado de su tejido vivo, para tener éxito en el cultivo de tejidos depende de la especie con la que se esté trabajando y de los objetivos que se persigan, dependiendo de su ubicación en la planta, del tipo de tejido que contiene, de su edad cronológica y fisiológica, de su contenido endógeno de hormonas, entre otros, se comportará de una manera o de otra, como también conservar sus características específicas en el cultivo

#### **1.1.7. Asepsia.**

Roca y Mroginski (1991), en su trabajo nos permiten conocer que:

Siempre debemos de tener cuidado con la proliferación de hongos y bacterias al realizar medios de cultivos ya que estos siempre se presentan normalmente al momento de incubación de cultivos destruyendo así tales cultivos por ello se debe tener en cuenta tener condiciones buenas al momento de su manipulación.

Maglietti; Mroginski; Fontana (2006), pudieron lograr con su trabajo:

esterilizar de manera superficial las hojas maduras del género *Arachis* (*correntina*, *villosa*, *burkatii*) usando un 70 % de etanol durante 30 s para luego ser bañadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% añadiendo 1 gota de interpolación 20 durante 12 min.

#### **1.1.8. Medios de cultivo.**

Roca y Mroginski (1991), por medio de su investigación se puede decir que:

Actualmente existen innumerables formulaciones, conteniendo entre 15 y 35 compuestos químicos que se suministran a base de: carbono; nutrientes minerales; vitaminas; agente gelificante (en el caso de medios semisólidos); sustancias reguladoras de crecimiento; otros compuestos; generalmente se hace referencia al conjunto de componentes (C+N+M), como el medio basal (MB).

### **1.1.9. Periodos de incubación**

Altafin (2015), en su estudio determino que:

Para el desarrollo de plántulas se debe mantener en un ambiente climatizado, con su control de temperatura y control del fotoperiodo que puede ser de 16/8 o 12/12 de luz / oscuridad.

Donde esta climatización generara una uniformidad de las plantas en su interior desarrollo, facilitando para la observación de cualquier problema se note, manteniendo las buenas condiciones de la instalación son fundamentales para conseguir uniformidad en la producción y garantizar la obtención de excelentes plántulas para el productor.

### **1.1.10. Condiciones ambientales de incubación**

Roca & Mroginski (1991). Dentro de su estudio nos dice que:

Es recomendable que los cultivos incubados se encuentren en ambientes controlados principalmente de temperatura y luz ya que no se tiene mucha información sobre estos dos factores y la que existe son contradictorias.

## **1.2. Embriogénesis somática.**

Delgado & Rojas (1999), Krikorian (1991) en el contenido de su investigación nos dan a entender que:

Hay muchas metodologías para realizar una micropropagación como: el cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares; la organogénesis directa; la organogénesis indirecta; la embriogénesis somática; los órganos de perennidad; el micro injerto y el cultivo de embriones, semillas y esporas. Los métodos mencionados presentan ventajas y desventajas en los puntos de vista de fidelidad y multiplicación genética del material desarrollado.

Radice (2004) y Edulp (2015), en sus estudios de tesis mencionan que:

La embriogénesis somática es la capacidad que poseen ciertas células vegetales de formar embriones por un proceso semejante a la embriogénesis cigótica. Esto no sucede únicamente en cultivos in vitro, ya que es relativamente frecuente en algunas familias de plantas, fenómeno conocido como apomixis. Como también al igual que

los cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia que la embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que la nueva planta supuestamente tendrá un genotipo idéntico al de la célula que le dio origen.

Radice (2004), gracias a su investigación se puede saber que:

Durante la embriogénesis los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios denominados globular, de corazón y de torpedo que son similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica.

Steward (1958), Reinert (1959) y Delgado & Rojas (1999), podemos conocer según su investigación que:

La embriogénesis somática fue estudiada por primera vez en tallos de zanahorias de raíces guardadas (Steward et al., 1958) y (Reinert 1959) siendo esta la demostración de la totipotencia celular de cultivos superiores obteniendo plantas integrales y muy buenas mediante embriones somáticos (Delgado & Rojas 1999).

Tisserat (1979), dentro de su investigación dio a conocer:

sobre el desarrollo de embriones somáticos de 32 familias, 81 géneros y 132 especies. En la actualidad esta cantidad creció de una manera increíble donde no solo las células esporofíticas han sido demostrando su aptitud en formar embriones somáticos si no también las células generativas de las microesporas de anteras así lo demostraron en *Datura innoxia* y (Nitsch, 1969) en *Nicotiana tabacum*, (Delgado & Rojas, 1999).

Gómez, (1998), Delgado & Rojas (1999), en su trabajo de investigación sobre:

Los embriones somáticos o también llamadas sexuales o adventicia se define como el crecimiento de embriones que son a raíz de células en donde no son el resultado de la unión de gametos mientras ocurre la fecundación, en pocas palabras origina una estructura bipolar (Gómez, 1998) también pueden diferenciarse de la micropropagación de ápices caulinares y de la regeneración de órganos mediante la organogénesis resultando así el proceso de órgano y ápice (Delgado & Rojas, 1999).

Mostramos las tres cualidades del embrión somático según Sannasgal, Escalant y teissant en 1989 y son las siguientes:

- Puede actuar a su manera ante los tejidos del generador que se encuentran protegidos por lo general por una piel.
- Esta formada por <sup>1</sup> una estructura bipolar, con un apice radical cotiledonales y apicular.
- Tiene bandas procambiales entre los vértices.

### 1.2.1. Tipos de embriogénesis somática.

Delgado y Rojas (1999), menciona 2 guías importantes para el desarrollo de la embriogénesis sexual a través de la técnica de in vitro y son las siguientes:

#### 1.2.1.1. Embriogénesis somática directa.

Este modelo se basa en que los embriones adventicios provienen principalmente de los tejidos sin que los callos aun se formen.

#### 1.2.1.2. Embriogénesis somática indirecta.

Sharp (1980), mediante su trabajo de tesis nos da a conocer que:

Esto sucede cuando el callo está perfilado y formado antes que ocurra el desarrollo de embriones somáticos. En los ambos tipos de embriogénesis sexual la secuencia en la que se desarrollan es igual a la de una formación de embrión cigótico mejor dicho la acorazonada, estadios globulares, torpedo y la formación de plantas integrales buenas. (Sharp et al., 1980) mencionan que la embriogénesis somática directa sucede a raíz de las células pre-embriónicas definidas que están comprendidas en la formación embriónica y se necesita tener una sola incitación para su expresión solo un estímulo para su expresión; mientras la embriogénesis de manera indirecta resulta células diferenciadas o también llamada células embriónicas inducidas.

<sup>1</sup> Chen y Chang (2006), mencionan que:

obtuvo embriogénesis asexual directa y una generación completa de plantas *Phalaenopsis amabilis* y obteniendo embriones a los 45 días de realizado el cultivo. Por otro sentido, a lo que se refiere el origen unicelular o pluricelular de embriones somáticos está relacionado de forma directa con el comportamiento de las células.

**1** Delgado & Rojas 1999), (Hacius 1978), Raghavan (1976) y Tisserat (1979) definen:

a la embriogenesis que se da a raíz de una célula donde no establece conexiones vasculares con los tejidos de la madre y por ende (Raghavan, 1976) y (Tisserat et al., 1979) se forman en función a células embriogenéticas principalmente embriogenesis directa vía suspensiones celulares o callos dando así varios embriones somáticos como resultado.

Vasil & Hildebrandt (1966), en su estudio recalcan que:

Los embriones somáticos no solo se forman a raíz de agregados embriogenéticos o nódulos callosos (Vasil & Hildebrandt, 1966), también si no de células simples periféricas (Jones, 1974), de las segmentaciones celulares simples (Linz & Conover, 1991) de bastantes procesos indicado (Handro et al., 1973; Lu & Vasil, 1981). La procedencia pluricelular al parecer produce embriones asexuales que están mezclados con el tejido materno es decir el origen unicelular produce embriones somáticos ligados al tejido materno por sus estructuras parecidas a los embriones cigóticos (Delgado y Rojas, 1999).

### **1.2.2. Fases de la embriogénesis somática.**

Delgado & Rojas (1999), dentro de su investigación de tesis ellos:

Se reconoce 3 fases: inducción de callos embriogenéticos, inducción y maduración de los embriones somáticos y por último el desarrollo del embrión somático en la planta esto se establece según.

#### **1.2.2.1. Inducción del callo embriogénico.**

Evans (1981) y Ammirato (1983), Chée y Cantliffe, (1988), en sus investigación concuerdan que:

Esta inducción incluye de la selección hasta la desinfección del tejido vivo separado así mismo abarca su inoculación en el medio del cultivo. En los primeros medios de cultivo se puede notar la presencia de auxinas un 60% en todas las especies experimentadas por (Evans et al., 1981) y (Ammirato, 1983), principalmente el 2D y 4D en menores cantidades que las ANA y AIA (Chée & Cantliffe, 1988).

Un sin numero de angiospermas herbáceas respondieron de manera favorable a los procesos de callo embriogénico mientras las especies leñosas indicaron recalcitrantes (Sommer et al., 1975).

### **1.2.2.2. Inducción y maduración de los embriones somáticos.**

<sup>1</sup> Delgado y Rojas, (1999), <sup>1</sup> Chée y Cantliffe (1989), Delgado, (1995), en sus trabajos se puede entender que:

En este medio a diferencia del primero esta carece de auxinas y algunas gibberelinas y/o citoquinina en cantidades altas, en esta fase sucede la formación de embriones adventicias en gran proporción para que el producto se convierta finalmente en una planta sin embargo su empleo en muchos sistemas fue muy dificultoso (Delgado y Rojas, 1999). Dentro de ello podemos observar el crecimiento de los embriones asexuales distinguiendo cambios morfológicos como: torpedo, acorazonado y globular; es factible observar otras formas como: cotiledonar, torpedo tardío y expandido como sucede en la embriogenesis adventicias del cultivo de camote (Chée y Cantliffe, 1989; Delgado, 1995). Tiene mayor significancia la embriogenesis repetitiva o secundaria ya que se forma de una a mas embriones somáticos (Delgado y Rojas, 1999).

### **1.2.2.3. Desarrollo de embriones somáticos en plantas.**

Delgado y Rojas (1999), en su estudio nos dice que:

<sup>1</sup> En esta etapa el embrión somático logra el estadio de torpedo donde la planta se vuelve integra para ser llevada campo definitivo con las condiciones adecuadas.

Chen y Chang, 2006) realizo un trabajo de investigación:

donde empleo un metodo de inducción de embriogenesis asexual de forma directa en hojas inmaduras enteras *phalaenopsis amabilis* a travez de un metodo de cultivo (Murashige y Skoog, 1962) con las siguientes proporciones: myo-inositol al (100), niacin (0.5), pyridoxine HCL (0.5), thiamine HCL (0.1), glycine (2.0), peptone (1000), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (170), sucrosa (20000), Gelrite (2200), fitohormonas con distintas dosis de Acido naphthalenacetico (ANA) y thidiazurón (1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl) tanto como urea (TDZ), obteniendo los siguientes resultados: que el tratamiento 4 con la aplicación de 0,00 mg/l ANA; 3,0 mg/l TDZ dando resultados favorables con

un 19,4 % de embríos luego de los 45 de su siembra In vitro como por último se logró regenerar con éxito a las plantas después de los 160 días.

### **1.3. Hormonas reguladoras de crecimiento**

Hurtado y Merino (1994), en su trabajo de tesis nos señalan:

Para que una planta se desarrolle de una manera adecuada es importante la interacción de los factores externos como: temperatura, luz, nutrientes y los internos que son: hormonas de crecimiento originarios de diferentes nutrientes que se le brinda a la planta en cantidades necesarias según su requerimiento nutricional que estimulan modifican o inhiben en cualquiera u otro modo los procesos fisiológicos de determinada planta que por una parte son producidas por ellas mismas o les transfieren de otras y esta influye en el proceso ya mencionado.

Gonzales y Raciman (2003), en su estudio nos informa que:

Las hormonas vegetales están conformadas por 5 grupos de compuestos que contienen citoquinina, auxinas, giberilina y ácido abscísico, cada una de estos componentes ya mencionados presentan una estructura con activos brindando bajas concentraciones para la planta donde exhiben las propiedades de desarrollo y secciones cortadas que presentan en ciertas ocasiones.

Delgado y Rojas, (1999). Para su investigación nos enseña:

La aplicación exógena viene influyendo de forma severa en los controladores de crecimiento por ende afecta también a los tejidos y órganos de manera genotípica y explante. Las hormonas vegetales para el desarrollo son los compuestos más importantes que incluye a un cultivo determinado proporcionándole las dosis hormonales adecuadas que requiere dicho cultivo.

Edulp (2015), en su investigación nos explican que:

Los reguladores de crecimiento se dividen en naturales: hormonas y sintéticas: reguladores de crecimiento (Inhibidores de crecimiento, cito quininas, retardantes, giberelinas).

#### **1.3.1. Auxinas.**

Ludwig-Müller y Cohen (2002) cit por Jordán (2006), determino que:

Son grupos de hormonas vegetales de procedencia naturales que regula los distintos aspectos del crecimiento y desarrollo del cultivo. La que predomina en las plantas son el ácido indolacético (IAA) que se encuentra presente de manera activa en los bioensayos y concentraciones nanomolares. Otras formas naturales presente en las auxinas son el: ácido indol butírico (IBA), ácido fenilacético (PAA), el ácido indol propiónico y el el ácido 4-cloro-indolacético (4-CIAA) según (IPA; Ludwig-Müller y Cohen 2002/ cit por Jordán, 2006).

Hurtado y Merino (1994), nos dice en su investigación que:

Estas esquematizan objetivamente el vertice de las ramas mas jóvenes, el tallo, hojas jóvenes y yemas por lo general en el meristemo (Taiz & Zeiger, 2004). Poseen una capacidad de generar alargamiento celular y al mismo tiempo promueve la división celular en los tejidos provocando el desarrollo de callos en raíces y tallos (Hurtado & Merino, 1994).

Haissig (1974), Delgado y Rojas (1999), nos explica en su investigación sobre que:

Esta hormona por lo general son los principales reguladores de desarrollo que a menudo van aumentando de manera constante el desarrollo de primordios radiculares excepto en tejidos que por su naturaleza presentan una predisposición de arraigo (Haissig, 1974). Por otra parte, se involucran en la activación de células del cambium inhibiendo la absorción de hojas y frutos como también de las yemas laterales, etc, (Salisbury 2000). Cuando esta hormona se utiliza en los tejidos se vuelve variable con frecuencia se usa el ácido naftalenacético también conocido por las siglas ANA en cantidades de 0.1-10 mg/l (Delgado y Rojas, 1999).

### **1.3.2. Cito quininas.**

Kakimoto (2003), nos explica en su investigación que:

Son hormonas principales que participan en el proceso de crecimiento y desarrollo de los cultivos que van relacionados con la acción de varios genes. Cumple funciones tales como la estimulación en el ciclo celular (Jordán, 2006) también se encuentra en el simplasto y apoplasto de tal manera que asume la existencia de transportadores principales a este nivel. Se ha confirmado en muchos trabajos que las hormonas primero son percibidas por proteínas quinasas-histidina y que la transducción es una



señal que ocasionando la fosforilación en una cantidad útil para ser transportada al grupo de fosforilo dando respuestas mas cortas (Kakimoto 2003).

Taiz y Zeiger (2004), en su estudio mencionan que:

Las citoquininas presentan otros efectos en el proceso fisiológico de la planta incluyedo también en la movilización de nutrientes, dominacia apical, senescencia foliar, germinación de semillas, crecimiento para controlar el ingreso de luz, etc (Taiz y Zeiger, 2004). En su totalidad estas moléculas se encuentran presentes en todas las moléculas libres pueden ser en bacterias ya que fueron halladas anteriormente en una gran variedad de angiospermas como (musgos y coníferas) (Taiz y Zeiger, 2004).

Delgado y Rojas, (1999), determino que:

Las proporciones usadas <sup>26</sup> en los cultivos de tejido se establecen en un rango de 0.1-3.0 mg/l, lo menciona (Delgado y Rojas, 1999).

Ernst (1994), en su investigacion se determino que:

El efecto del Thidiazurón en la propagación *in vitro* de *Doritaenopsis* planteados se obtuvieron multiples brotes con niveles muy altos de TDZ desarrollando los protocormos y la raíz en cambio al aplicar las dosis de 0.23-1.14 mg/l de TZD se obtuvo rangos muy bajos en lo que concierne los protocormos (Ernst, 1994).

### **1.3.3. Interacción auxina-citoquinina.**

Skoog y Miller (1957), en su trabajo se definio:

La interacción de las auxinas y citoquinina se regulan mediante la conjugación y síntesis donde permanece biológicamente activa en las confugaciones de glucosidos. Casi siempre cuando las auxinas se encuentran en altas cantidades la citoquinina bajan e inicia la división celular interviniendo en el desarrollo celular (Skoog y Miller, 1957).

Chen y Chang (2006), en su trabajo de estudio se establecio que:

Para este procedimiento de formación de embriones y enduccion de callos se uso una interacción de TDZ Y ANA en diferentes cantidades Para e proceso de formación de (Chen y Chang 2006).

<sup>1</sup> George y Sherrington (1984), según su investigación para entender mejor se puede notar

En la figura 1 se muestra las interacciones entre la citoquinina -auxina en inducciones morfogénico utilizando la técnica de cultivos de tejido *In vitro* según (George y Sherrington 1984).

#### 1.4. Antecedentes de la investigación

Claudia (2016), en su investigación titulada: <sup>13</sup> *Inducción e Histología de Embriones Somáticos Primarios y Secundarios de Phalaenopsis Híbrido Classic Spotted Pink (Orquidaceae)*, menciona:

Que con los objetivos inducir la formación de embriones somáticos *in vitro* en el híbrido *Phalaenopsis Classic Spotted Pink*, utilizando diferentes medios nutritivos, y evaluar la morfología interna de estos embriones mediante análisis histológico e histoquímica. Hojas jóvenes de plantas cultivadas *in vitro* se utilizaron como explantes para la inducción de embriones somáticos en diferentes medios nutritivos: New Dogashima Medium, contenido de ANA (0.537 mM) y BAP (4.440  $\mu$ M) además de phytigel y con pH 5.8 (NDM) y el Murashige Skoog con la mitad de la concentración de sales, además de ANA (0.537  $\mu$ M) y TDZ (13.621  $\mu$ M), gelificado gelrite y pH 5.2 ( $\frac{1}{2}$  MS). Se obtuvieron embriones somáticos primarios a los 90 días de cultivo en el medio  $\frac{1}{2}$  MS y a estos se le transfirió al mismo medio ( $\frac{1}{2}$  MS) para la obtención de embriones secundarios. Los embriones somáticos primarios y secundarios fueron subcultivados para MS con la mitad de la concentración de sales, sin reguladores de crecimiento y sometidos a fotoperiodo de 16 horas, lo que estimuló la producción de clorofila tanto en los embriones primarios como en los secundarios, promoviendo el desarrollo de los protocormos y más tarde en las plantas. Los análisis histológicos demostraron que los embriones somáticos fueron formados directamente en las capas epidérmicas de los explantes, sin pasar por la fase de callo, vía embriogénesis somática directa. Los métodos histoquímicas hicieron posible destacar la deposición de almidón y lípidos en las células embriogénicas como resultado de mecanismos fisiológicos, que permiten el desarrollo de los embriones primarios y secundarios en las plantas. Por lo tanto, el medio  $\frac{1}{2}$  MS contenido de ANA (0.537  $\mu$ M) y TDZ (13.621  $\mu$ M), con gelrite y pH

<sup>13</sup> 5.2 permitió obtener embriones primarios y secundarios con capacidad para regenerar plantas con caracteres morfológicos similares a los de la planta matriz.

Cruz (2009), en su tesis titulada: <sup>16</sup> Inducción de la Embriogénesis Somática Directa en *Phalaenopsis Amabilis* (L.) Bl., a partir de Segmentos Foliare, nos dice:

Con el propósito de desarrollar una metodología adecuada para la inducción de la embriogénesis somática directa en *Phalaenopsis amabilis*, a partir de segmentos foliares, se emplearon explantes de hojas inmaduras de 15 mm, obtenidas de frascos que fueron sembradas de cápsulas dehiscentes. Se evaluaron los segmentos foliares a la inducción de callos, utilizando 12 tratamientos con diferentes concentraciones de auxina-citoquinina, ácido naftalenacético (0,00; 0,10 y 1,00 mg/l) y thidiazurón (0, 0,10, 1, 3) añadiendo compuestos minerales de: 10 mg/l inositol, 0,50 mg/l piridoxine, 0,10 mg/l thiamine, 2,0 mg/l glycine, 170 mg/l fosfático sódico, 2 g/l de peptonas, 20 g/l sucrosa y 3,75 de agar. Donde fueron cultivados durante un periodo de 30 a 45 días en condiciones favorables de luz y oscuridad. Mostrando porcentajes favorables de un 100% de los ensayos a los 30 días de haber sido realizado la siembra, en los tratamientos (1,2,5,6) obtuvieron resultados satisfactorios en lo que concierne el primer estadio, pero durante el proceso de la investigación se pudo identificar la presencia de muchos callos embrionarios que tenían una consistencia no apropiada.

## CAPÍTULO II

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1. Localización del experimento

La presente investigación se desarrollo en las intalaciones de la UNSM-T principalmente en el laboratorio de Tejidos Vegetales.

##### a) Ubicación política

En el Distrito : de Morales

Provincia de : San Martín

Región de : San Martín

##### b) Geográfica (Coordenadas UTM, altitud)

Latitud Sur : 06° 29' 13,2"

Longitud Oeste : 76° 22' 48,4"

Altitud : 350 m.s.n.m.m.

#### 2.2. Materiales

##### a) Material vegetativo

- Cápsula de la orquídea *Phaleanopsis amabilis* L., del laboratorio de Tejidos de Cultivos Vegetales (LTCV).

##### b) Materiales y equipos de laboratorio

- Tubos de ensayo de 25 x 150 mm
- Pipetas DIN/B de 25, 10, 5 y 1 ml
- Vaso de precipitado kimax de 500 y 1000 ml
- Mechero para alcohol
- Pinzas de acero inox stainless p punta roma de 143,0 y 200,0 mm de longitud.
- Espátula de bronce de 293,0 mm de longitud
- Autoclave vertical sercal de 40 l de capacidad
- Estereomicroscopio nikon SMZ645 (0,8X - 5X)
- Potenciómetro schot.

- Cámara de flujo laminar horizontal
  - Termómetro de máxima-mínima Stortz MMT-15/17.
  - Cámara digital fotográfica
- c) **Reactivos**
- Carbón activado
  - Agua de coco
  - Sucrosa
  - Agar agar
  - Lejía comercial al 5,25% de NaOCl
  - Pastillas buffer pH= 4,0; pH= 7,0
  - Alcohol etílico de 96°
  - Hipoclorito de sodio
  - Detergente
  - Tiamina
  - Supertrave

21

## 2.3. Métodos

### 2.3.1. Diseño experimental.

Según Sánchez et. al. (2006), se tiene que realizar un diseño experimental DCA con un arreglo factorial de 3x4 donde: el Factor (a: region del tejido foliar (Basal, Intermedio, Apical)) y el factor (b: tiempo de oscuridad a los 5,10,15, 20 días) para este trabajo se utilizo el metodo de inducción somatica directa de *Phalaenopsis amabilis*.

#### Factores de estudio

##### Región del Tejido Foliar – Factor (a)

**a<sub>1</sub>** = Basal

**a<sub>2</sub>** = Intermedia

**a<sub>3</sub>** = Apical

##### Tiempo de oscuridad – Factor (b)

**b<sub>1</sub>** = 5 días

**b<sub>2</sub>** = 10 días

$b_3 = 15$  días

$b_4 = 20$  días

**Tratamientos (combinación de factores)**

**Tabla 1**

*Combinación de los Factores a x b.*

Tratamiento	Clave	Factor (a)	Factor (b)
		Región del Tejido Foliar	Tiempo de Oscuridad
T <sub>1</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Basal	5
T <sub>2</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Basal	10
T <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	Basal	15
T <sub>4</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>4</sub>	Basal	20
T <sub>5</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	Intermedio	5
T <sub>6</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	Intermedio	10
T <sub>7</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	Intermedio	15
T <sub>8</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>4</sub>	Intermedio	20
T <sub>9</sub>	a <sub>3</sub> b <sub>1</sub>	Apical	5
T <sub>10</sub>	a <sub>3</sub> b <sub>2</sub>	Apical	10
T <sub>11</sub>	a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	Apical	15
T <sub>12</sub>	a <sub>3</sub> b <sub>4</sub>	Apical	20

**2.3.2. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.**

Para procesar los datos obtenidos de la investigación se utilizó el programa estadístico Infostat que se presentaron en figuras y tablas para entender mejor, ya que el experimento se realizó en el laboratorio, se consideró para las pruebas estadísticas el 0.01 de Nivel de significancia.

Para contrastar la hipótesis se hizo el **Análisis de Varianza (ANVA)**; siendo una técnica que se puede utilizar para decidir si las medias de dos o más poblaciones son iguales. La prueba se basa en una muestra única, obtenida a partir de cada población. El análisis de varianza puede servir para determinar si las diferencias entre las medias muestrales revelan las verdaderas diferencias entre los valores medios de cada una de las poblaciones, o si las

diferencias entre los valores medios de la muestra son más indicativas de una variabilidad de muestreo, Si el valor estadístico de prueba (análisis de varianza) nos impulsa a aceptar la hipótesis nula, se concluiría que las diferencias observadas entre las medias de las muestras se deben a la variación casual en el muestreo (y por tanto, que los valores medios de población son iguales). Si se rechaza la hipótesis nula, se concluiría que las diferencias entre los valores medios de la muestra son demasiado grandes como para deberse únicamente a la casualidad (y por ello, no todas las medias de población son iguales).

Para la separación de medias se utilizó la **Prueba de Duncan**, el Test de Duncan es sirve para comparaciones múltiples, permite comparar las medias de los niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Todos los tests de comparaciones múltiples son tests que tratan de perfilar, tratan de especificar, tratan de concretar, una hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los Test ANOVA, para saber el número de medias implicadas en la comparación se ordenan las medias muestrales de menor a mayor y así al hacer una comparación entre dos medias sabremos además de las dos medias comparadas cuantas medias quedan dentro. Este número de medias implicadas en cualquier comparación de medias es el parámetro  $p$  de este umbral.

Para ver si los datos se ajustaron al modelo se utilizó **Coefficiente de Determinación ( $R^2$ )**; La bondad de la predicción depende de la relación entre las variables. Si dos variables no covarían, no podremos hacer predicciones válidas, y si la intensidad de la covariación es moderada, las predicciones no serán demasiado buenas. En consecuencia, hay que disponer de alguna medida de la capacidad de la ecuación de Regresión para obtener predicciones buenas (en el sentido de que sean lo menos erróneas posible). Esta medida es el Coeficiente de Determinación, que es el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson, y da la proporción de variación de la variable Y que es explicada por la variable X (variable predictora o explicativa). Si la proporción es igual a 0, significa que la variable predictora no tiene NULA capacidad predictiva de la variable a predecir (Y). Cuanto mayor sea la proporción, mejor será la predicción. Si llegara a ser igual a 1 la variable predictora explicaría TODA la variación de Y, y las predicciones NO tendrían error.

El **Coefficiente de Variabilidad** se utilizó para comparar conjuntos de datos pertenecientes a poblaciones distintas. Por lo tanto, el coeficiente de variación nos permite

tener una medida de dispersión que elimine las posibles distorsiones de las medias de dos o más poblaciones

### **2.3.3. Conducción del experimento.**

#### **2.3.3.1. Selección y preparación de las plantas madres.**

##### **a) Obtención de capsula.**

Para la obtención de cápsula de la orquídea *Phalaenopsis amabilis* L. se constató una vez pasado meses en la formación de la misma después de la polinización para luego coleccionar y poner en un papel de color blanco para su posterior siembra previo a la colección se tomó nota datos como el día de la colecta, la especie, lugar entre otros.



**Figura 1.** Cápsulas de *Phalaenopsis amabilis* L.

##### **b) Lavado y preparación del material vegetal.**

Una vez separada la cápsula de la planta se colocó en un recipiente con agua y jabón para ser lavado con una escobilla de dientes suaves hasta dejar limpio la parte exterior, para introducir el primer paso del material vegetal a condiciones in vitro.

##### **c) Desinfección de la capsula de orquídea.**

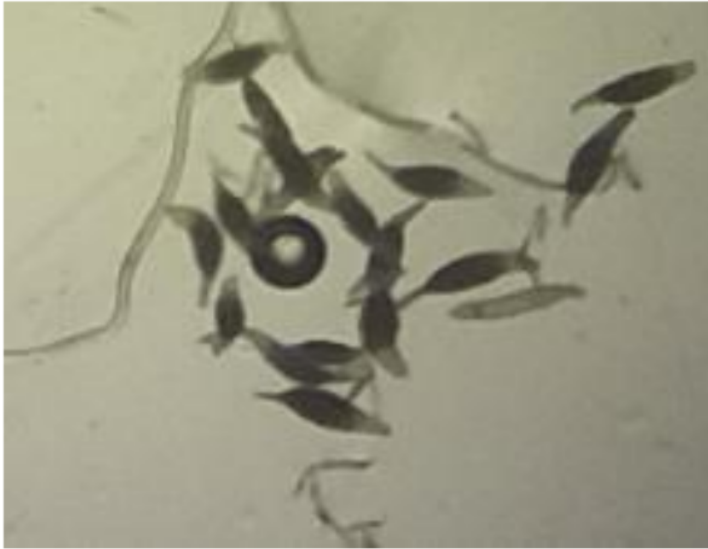
En un recipiente de vidrio se colocó una solución de NaOCL al 1% en 100 ml de agua destilada con el fin de eliminar cualquier agente contaminante.

##### **d) Viabilidad de la semilla.**

Una vez desinfectado la cápsula por completo se pasó hacer un pequeño corte de la parte basal de la cápsula y extraer semillas para ser colocados sobre una lámina de porta



objetos con gotas de agua destilada, posterior siendo llevado al estereoscopio y ser observados los embriones.

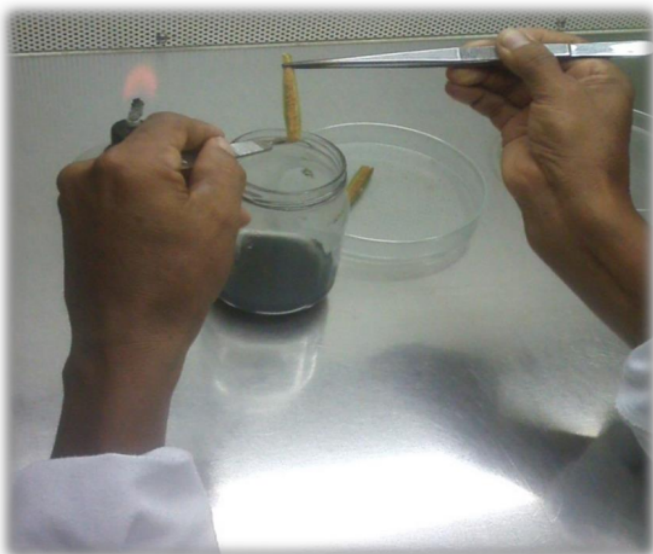


**Figura 2.** Semillas Viables.

***e) Extracción de las semillas***

Una vez desinfectado y observado a través de un estereoscopio, y confirmado su viabilidad se pasó al área de siembra del cultivo in vitro para utilizar el equipo de flujo laminar y seguir con el objetivo propuesto.

Cuando ya se instaló en el área de cultivo in vitro, con todos los materiales necesarios para realizar la siembra en los medio de cultivo basal, se pasó a sujetar con una pequeña pinza la cápsula y ser partido en 2 partes, inmediato se sujetó con la pinza pequeña la mitad de la cápsula conteniendo las semillas de la orquídea, con la ayuda de la otra mano se sujetó una pequeño bisturí y se raspo de arriba abajo las semillas para que sea caigan al vacío en el medio de cultivo preparado con anticipación para la siembra continuando así con el resto de las semillas y el medio de cultivo hasta culminar la actividad.



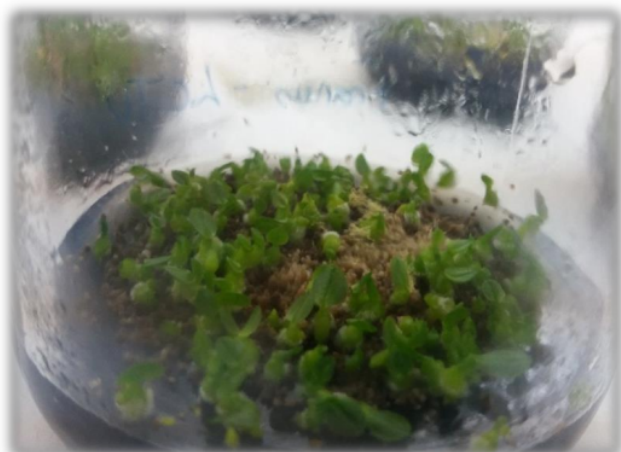
**Figura 3.** Extracción de Semillas.

**f) Transferencia de protocormos hasta obtener plántulas para la investigación**

Después de realizar la siembra de las semillas de *Phaleanopsis amabilis* L. se esperó que cumpla 90 días y que este en óptimo desarrollo para ser trasladado al medio de cultivo realizado por (Murashige y Skoog, 1962) a una concentración media con 0.4 ml/l tamina, 0.5 de ácido nicotínico, 20 g/l Sucrosa y 15 g/l de agar-agar con la finalidad de mantener fresco los embriones germinados.

Una vez cumplido los 90 días más, se pasó a transferir los protocormos con diferentes tamaños de hojas a un nuevo medio de cultivo recomendado por (Murashige y Skoog, 1962) a media concentración, suplementado con 0,4 ml/l de Tiamina - HCl, 0,5 ml/l de Ácido Nicotínico, 20,0 g/l de Sucrosa, 15 g/l de Agar-agar, 100 ml endosperma líquido de coco (Agua de Coco), enrazar con agua destilada esteril (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) hasta obtener los 1000 ml.

Se seleccionó a las plántulas de un mejor aspecto, color y tamaño de las hojas una vez cumplida los 270 días, después de su germinación para ser utilizadas las hojas jóvenes de *Phaleanopsis amabilis* L.



**Figura 4.** Plantulas de *Phaleanopsis amabilis* L.

### 2.3.3.2. Primera fase: **Inducción de la embriogénesis somática**

#### a) **Preparación de medio de cultivo**

Para la inducción de la embriogénesis somática se preparó un medio de cultivo formulado por (Murashige y Skoog, 1962) un volumen de 2 L. a media concentración, con la adición de 20,00 mg/l Myo-inositol, 1,00 mg/l Pyridoxine, 0,20 mg/l Thiamine, 4,0 mg/l Glycine, 340,00 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4,0 g/l Peptona, 40,00 g/l de sucrosa, 6,75 g/l de Agar – Agar, calibrando con un equipo de pH para todos los tratamientos sea uniforme.

Una vez listo en medio de cultivo se pasó a ser dispensados a unos tubos de ensayo de 25 por 150 mm con un volumen de 15 ml por cada tubo de ensayo siendo cerrados con una tapa plástica, para ser inmediatamente autoclavadas a una presión de 15 lb por 20 minutos hasta alcanzar una temperatura de 121 °C para eliminar cualquier agente contaminante que altere la muestra vegetal.

Después se pasó a la cámara de flujo de laminar para ser tapado con un algodón y la tapa roja el tubo de ensayo, dejándolo a una inclinación de 30° y se continuo con la colocación del medio en una refrigeradora a una temperatura de 20 °C para mantener; siendo sugerido la preparación de este medio por (Chen y Chang, 2006).



*Figura 5.* Stock Preparados.



*Figura 6.* Agar-Agar y Azúcar.



15

*Figura 7.* Preparación de medio de Cultivo.



**Figura 8.** Medio de Cultivo para Autoclave.



**Figura 9.** Medio de Cultivo Auto Clavado.

***b) Extracción del material vegetal***

En el área de siembra de cultivo in vitro se instaló en una cámara de flujo laminar con las plantas donantes para ser extraídas las hojas inmaduras y con la ayuda de un bisturí de numero (14, 11, 10), una pinza de mango largo, un matraz etc extrayendo las hojas jóvenes de la parte terminal como un 1.5 cm de longitud de una placa Petri desinfectando con agua destilada para evitar que parte cortada se estrese por el corte realizado.



**Figura 10.** Extracción del Material Vegetal.

**c) Siembra de segmentos foliares**

En tubos de ensayo de 25 por 150 ml contenidos de medio de cultivo para la prueba de inducción de callos, se sembró segmentos foliares (Basal, intermedio y apical) de 12 por 2 mm de *Phaleanopsis amabilis* L, que se encontraban en placas Petri con agua destilada estéril.

Permaneciendo en este medio por un tiempo hasta empezar los indicios de la formación de embriones del explante.



**Figura 11.** Segmentos Foliares (Basal, Intermedio y Apical.)

**d) Incubación de segmentos foliares**

A una temperatura de  $24^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , H.R: 46% y 24 horas de oscuridad fueron incubados los segmentos foliares.





**Figura 12.** Incubación de Segmentos Foliare

### 2.3.3.3. Segundo Fase: Multiplicación y desarrollo de callos

Cumplido con la etapa para la formación de callos de acuerdo a los tratamientos propuestos, se cambió a otro medio de cultivo propuesto por (Murashige y Skoog 1962), a media concentración con la adición de 10,00 mg/l Myo-inositol, 0,50 mg/l Pyridoxine, 0,10 mg/l Thiamine, 2,0 mg/l Glycine, 170,00 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g/l Peptona, 20,00 g/l de sucrosa, 3,75 g/l de Agar – Agar, sin carbón activado, calibrando el pH a 5,3; a un volumen de 1 l de solución.

Inmediatamente ser fraccionados en tubos de ensayo de 25 por 150 mm con la adición a un volumen de 12 ml por cada tubo de ensayo, siguiendo con autoclavar a una presión de 15 lb por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y enfriando a temperatura ambiente pero envuelto con King wrap para prevenir la contaminación por algunos agentes microbianos.

#### a) Transferencia de segmentos con callos

Diferenciando los callos de los segmentos con los pro embriones se cambió a aun medio de cultivo cumplido 45 días para seguir desarrollando.

#### b) Incubación de segmentos con callos

A un tiempo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad los segmentos fueron incubados con una temperatura promedio de 24 ± 2 °C, H.R: 46%, intensidad luminosa 700 lux.

### 2.3.3.4. Tercera fase: Desarrollo de embriones

Para la formación de embriones se colocó en medio de cultivo a media concentración recomendado por (Murashige y Skoog, 1962), incluyendo 10,00 mg/l Myo-inositol, 0,50 mg/l Pyridoxine, 0,10 mg/l Thiamine, 2,0 mg/l Glycine, 170,00 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g/l

Peptona, 20,00 g/l de sucrosa, 20,00 g/l de maltosa, 3,75 g/l de Agar – Agar, 2,00 g/l carbón activado, calibrando el pH a 5,3.

Inmediatamente ser fraccionados en tubos de ensayo de 25 por 150 mm con la adición a un volumen de 12 ml por cada tubo de ensayo, siguiendo con autoclavar a una presión de 15 lb por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y enfriando a temperatura ambiente pero envuelto con King wrap para prevenir la contaminación por algunos agentes microbianos y almacenado en refrigeración a una temperatura de 24 °C.

**a) *Transferencia de segmentos con pro embriones***

Para su formación de embriones de acuerdo a la distribución de los tratamientos se cambiaron a un medio pasado los 90 días.

**b) *Incubación de segmentos con pro embriones***

A un tiempo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad los segmentos fueron incubados con una temperatura promedio de  $24 \pm 2$  °C, H.R: 46%, intensidad luminosa 700 lux.

**2.3.3.5. *Cuarta fase: transformación de embriones***

En un medio basal (MB) recomendado por (Murashige y Skoog, 1962), se incluyó, 0,40 mg/l Tiamina, 0,50 mg/l Acido nicotínico, 20,00 g/l de azúcar, 3,75 g/l de Agar – Agar, 2,00 g/l carbón activado, calibrando el pH a 5,3. Pasaron los segmentos con embriones para su formación de las futuras plántulas después de haber estado en los diferentes medios de desarrollo embrionario.

Después siendo dispensados 50 ml de medio basal en frascos de 15 onzas, inmediatamente siendo tapado con papel aluminio y cubierto con papel bond reciclado, terminado con esa parte se pasó a ser auto clavado a una presión de 15 lb por 15 minutos a una temperatura de 121 °C, después dejando enfriar a temperatura ambiente y posterior almacenamiento en refrigeradora a una temperatura de 24°C.

**a) *Transferencia de explantes***

Permanecido en medio de cultivo con carbón activado por 90 días, tiempo para el desarrollo de embriones de los segmentos foliares, se cambió a otro medio para facilitar la regeneración de futuras plantas.

**b) *Incubación de segmentos con pro embriones***

A un tiempo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad los segmentos fueron incubados con una temperatura promedio de  $24 \pm 2$  °C, H.R: 46%, intensidad luminosa 700 lux.



### 2.3.3.6. Cuantificación de Auxinas y Citocininas

#### a) Extracción

Se cuantifico el contenido de auxinas y citocininas en hojas de *Phaleanopsis amabilis* L., crecidas sobre condiciones *in vitro*, con las condiciones de extracción descritas por McDougall y Hillman (1978). Se homogenizo en un mortero, 5 g de tejido fresco de cada región (basal, intermedia y apical), en 15 mL de metanol mezclado con Subacetato de plomo a una concentración final de 0.1%, durante 10 min, y luego se filtró a través de ocho capas de gasa. El filtrado se evaporará al vacío y se le adicionarán 10 mL de NaHCO<sub>3</sub> a 2%. La solución obtenida se extrajo dos veces con 15 mL de éter dietílico, con eliminación de la fase etérea en cada ocasión, y la fase acuosa recuperada se acidificará con HCl 2N. Finalmente, la fracción acuosa acidificada enriquecida de auxinas y citocininas serán extraídas dos veces más con 25 mL de éter dietílico. El éter se eliminó al vacío y el residuo se re-suspenderá en 1 mL de fase móvil.

#### b) Cromatografía líquida (HPLC)

El contenido de auxina y citocinina de cada región (basal, intermedia y apical) se determinó en un cromatógrafo líquido, provisto con una columna de fase reversa Hypersil ODS, con tamaño de partícula 3 μm, 4.6 mm de diámetro interno y 60 mm de longitud (Nordström et al., 1991). La determinación de auxinas y citocininas se realizó mediante un detector de fluorescencia, a una longitud de onda de excitación de 280 nm y 340 nm de emisión. La cuantificación se realizó por comparación con un estándar externo de concentración conocida de cada auxina y citocinina, con un factor de recuperación de 85% a través de ensayos de enriquecimiento.

### 2.3.4. Parámetros evaluados

#### a) Porcentaje de callogénesis (%)

Se evaluó el porcentaje de callos obtenidos por cada unidad experimental, considerando 12 repeticiones (tubos de ensayo de 25 x 150 mm), realizando evaluaciones consecutivas después de 30 días transcurridos (5, 10, 15 y 20 días) para cada tratamiento, para obtener el porcentaje de desarrolló mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Callogénesis} = \frac{\text{Segmento de hoja inducida} \times 100}{\text{Segmentos de hojas totales}}$$

#### b) Número de pro-embrioides (N°)

Se realizó a los 45 días de haberse instalado el ensayo.

*c) Número de embrioides por explante (N°)*

Se realizó a los 90 días de haberse instalado el ensayo.

*d) Número de plántulas regeneradas (N°)*

Se evaluó el número total de plantas regeneradas por muestra inducida/tratamiento transcurrido a los 160 días de haberse instalado el ensayo.

## CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Porcentaje de callogénesis (%)

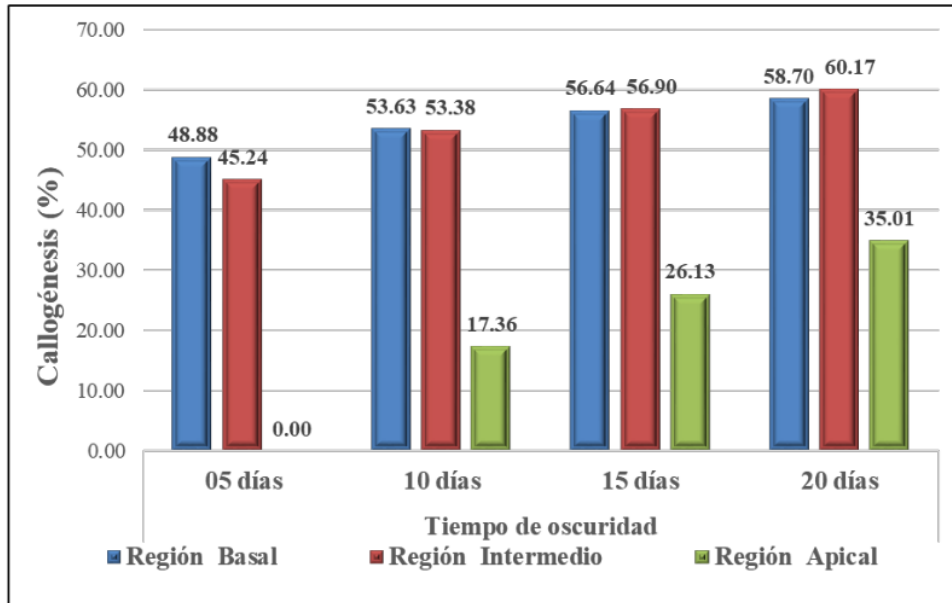


Figura 13. Callogénesis (%), Análisis Descriptivo de los Factores a y b.

En el análisis descriptivo (Figura 14), de la callogénesis (%), de la combinación de los factores a y b, se puede observar que mientras se incrementa el tiempo de oscuridad (05 días, 10 días, 15 días y 20 días), mayor se expresa la callogénesis (%) en la región del tejido foliar (región basal, región intermedia y región apical).

La tabla 2, se muestra el Análisis de Varianza para callogénesis (%), datos transformados ( $\text{Sen}^{-1}\sqrt{x}$ ), se tiene evidencia estadística del 99%, para afirmar que existe diferencias significativas para los tratamientos, dándonos a conocer que al menos uno de los tratamientos tuvo un comportamiento estadísticamente diferente a los demás, así mismo existe las diferencias significativas para los niveles del factor a (región del tejido foliar) y los niveles del factor b (tiempo de oscuridad), así mismo se observa que existe una interacción en la callogénesis (%), siendo el resultado de la combinación de los factores a x b, todo esto a una  $P < 0,01$ . Los efectos de esta combinación factores a x b, sobre la callogénesis (%), se explican en el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que expresa un valor

de 99,86%, encontrándose dentro del rango aceptable según Calzada (1982), validando nuestro modelo utilizado ya que los datos se ajustaron en este análisis, así mismo el Coeficiente de Variabilidad (CV), con un valor de 1,69%, nos indica la baja variabilidad y la alta precisión en la recolección de datos

**Tabla 2**

Análisis de Varianza para callogenesis (%), Datos Transformados ( $Sen^{-1}\sqrt{x}$ )

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	48415.50	11	4401.41	8511.96	<0.0001*
Región del tejido foliar (Factor a)	38246.46	2	19123.23	36982.72	<0.0001*
Tiempo de oscuridad (Factor b)	7867.85	3	2622.62	5071.92	<0.0001*
Factor a*Factor b	2301.19	6	383.53	741.72	<0.0001*
Error	68.26	132	0.52		
Total	48483.76	143			

Promedio = 42,67 %      C.V. = 1,69 %      R<sup>2</sup> = 99,86 %

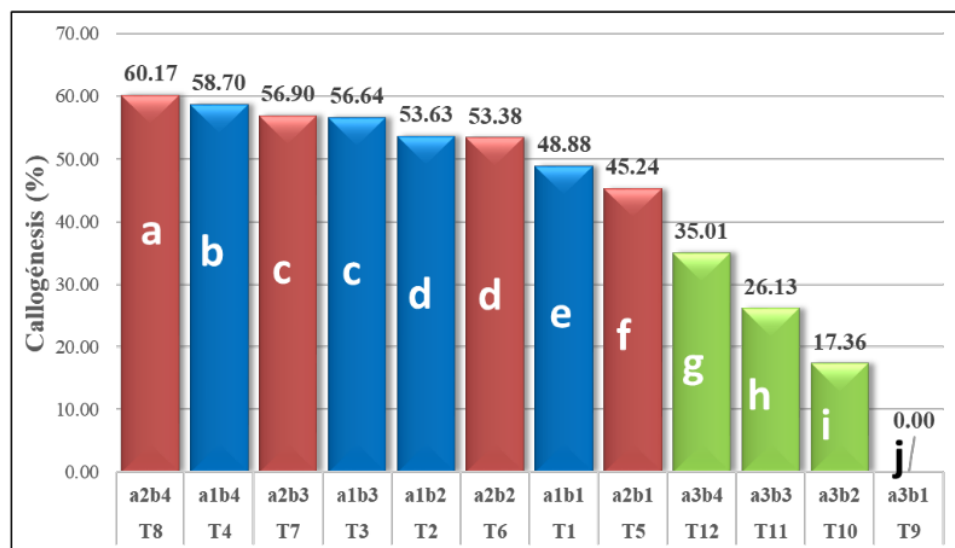
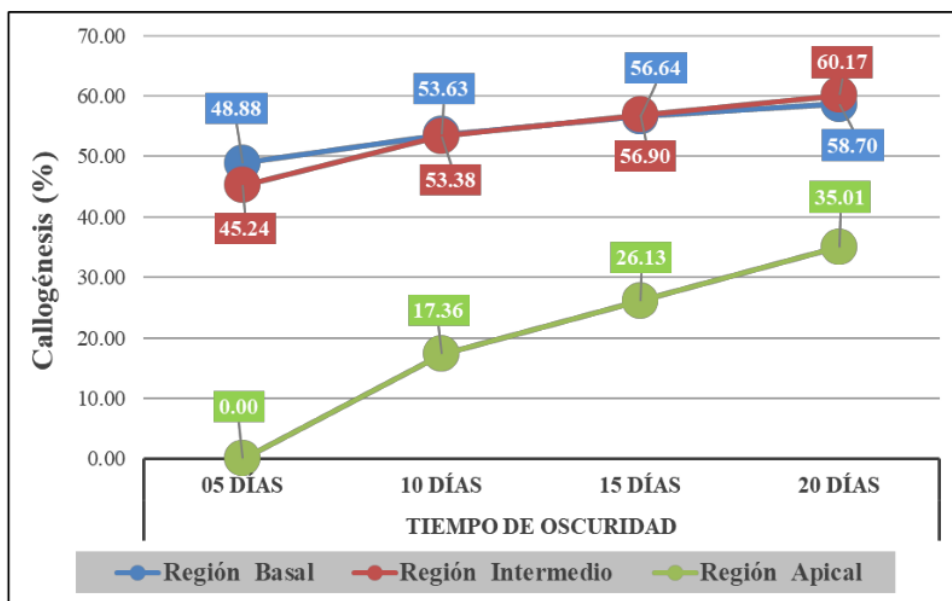


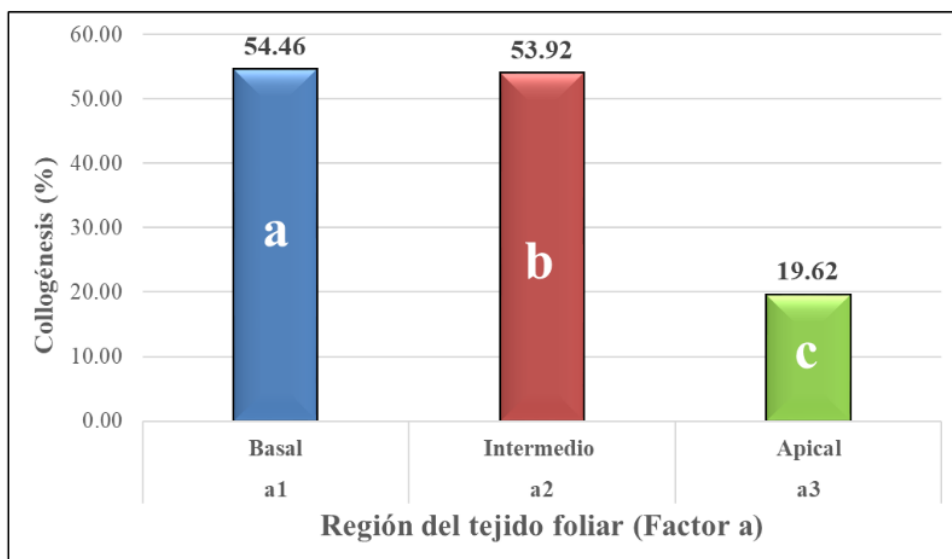
Figura 13. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para Callogenesis (%) por Tratamiento.



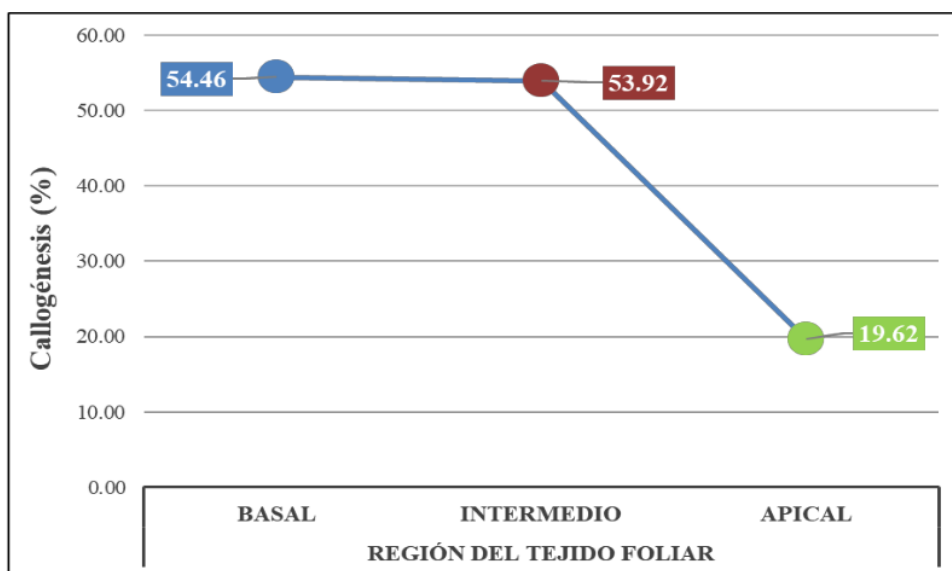
**Figura 14.** Callogénesis (%), de la Interacción del Factor a x b.

En la figura 15, contiene el Test de Duncan ( $p < 0,01$ ) para callogénesis (%) por Tratamiento, expresando los siguientes resultados; el  $T_8$  ( $a_2b_4$ ), con promedio de 60.17%, es el que reportó mayor callogénesis siendo estadísticamente superior a los demás tratamientos, seguidamente de  $T_4$  ( $a_1b_4$ ), con promedio de 58.70%, en otro grupo se encuentran los tratamientos  $T_7$  ( $a_2b_3$ ) y  $T_3$  ( $a_1b_3$ ), con promedios de 56.90% y 56.64% respectivamente, en otro grupo e inferior a los mencionados se encuentran los tratamientos  $T_2$  ( $a_1b_2$ ) y  $T_6$  ( $a_2b_2$ ), con promedios de 53.63% y 53.38% respectivamente, siendo los demás tratamientos restantes diferentes estadísticamente entre sí, e inferiores a los tratamientos mencionados anteriormente, el  $T_9$  ( $a_3b_1$ ), no reporta callogénesis, estos resultados son iguales a los obtenidos por (Chen & chang, 2006) quien también logro un 93.8% de inducción de los callos mediante la técnica de medio de cultivo añadiendo a la vez suplementos vitamínicos como ANA y TDZ a partir de hojas enteras a los 20 días del cultivo de *Phalaenopsis amabilis*.

La figura 16 sobre callogénesis (%), de la interacción de los factores a x b, se observa que existe una interacción en la región del tejido foliar, específicamente en la región basal y región intermedio, en el tiempo de oscuridad de 10, 15 y 20 días.



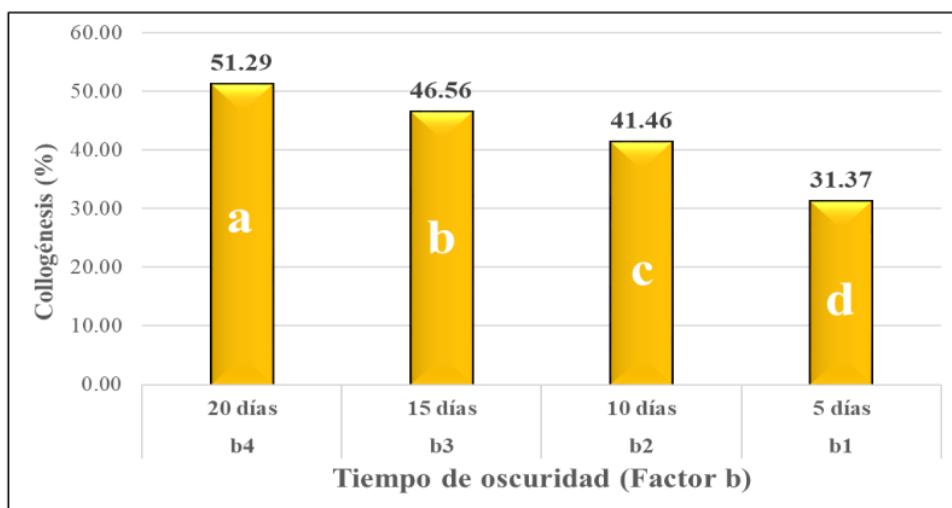
**Figura 15.** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Callogénesis (%), Factor "a".



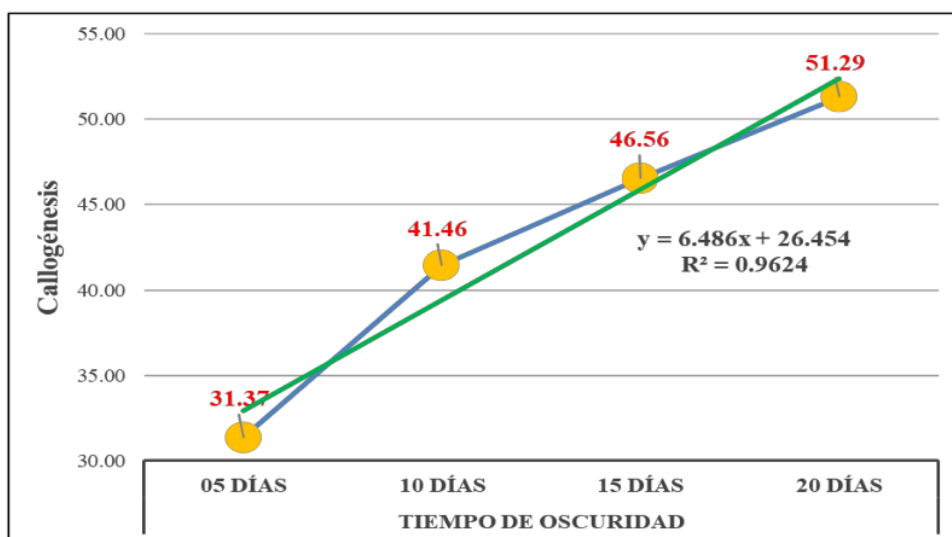
**Figura 16.** Callogénesis (%), en el Factor "a".

Las figuras 17 y 18, nos muestran la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Callogénesis (%), Factor "a", se observa que existe diferencias significativas entre los niveles, ya que la región basal con promedio de 54.46% de callogénesis es estadísticamente diferente a la región

intermedio, con promedios de 53.92% de callogénesis y diferente estadísticamente a región apical con promedio de 19.62% de callogénesis.



**Figura 17.** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Callogénesis (%), Factor "b".



**Figura 18.** Callogénesis (%) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor "b".

Las figuras 19 y 20, arrojan la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) de callogénesis (%), dispersión, regresión y correlación del Factor "b", nos expresa la diferencia estadística entre todos sus niveles, siendo que a 20 días de oscuridad obtuvo 51.29% de callogénesis,

seguidamente de 15 días de oscuridad con 46.56% de callogénesis, por debajo se encuentra 10 días de oscuridad con 41.46% de callogénesis, por último, se encuentra 5 días de oscuridad con 31.37% de callogénesis. Se destaca que el incremento de las dosis del tiempo de oscuridad (Factor b) ha generado una respuesta lineal sobre la callogénesis (%) (variable respuesta) descrita por la ecuación  $Y = 6.486 x + 26.454$  (figura 20) y una alta relación de correlación (r) de 96.24% ( $\sqrt{R^2} = \sqrt{0.9624}$ ).

### 3.2. Número de Pro-Embrioides

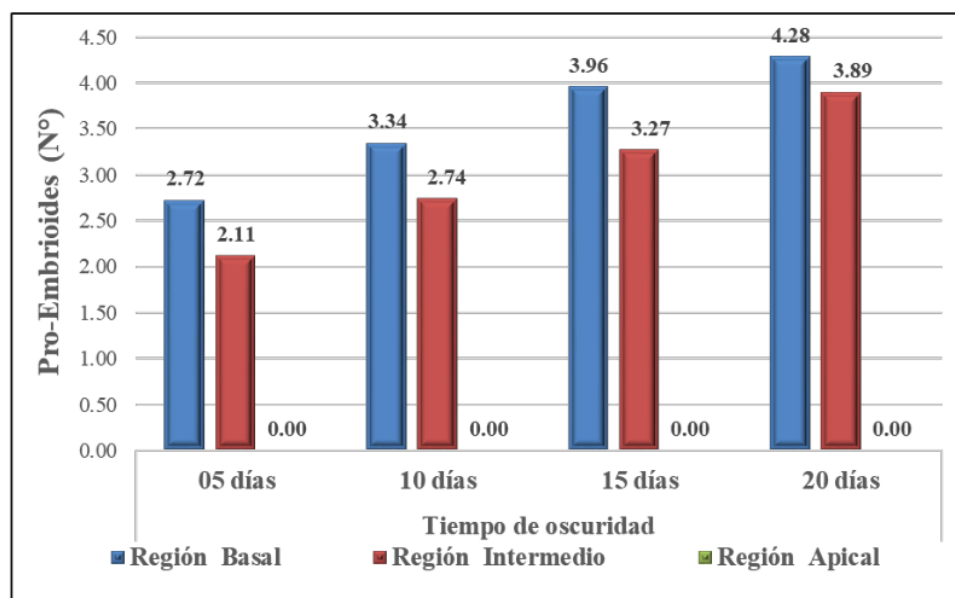


Figura 19. Pro-Embrioides (N°), Análisis Descriptivo de los Factores a y b.

Se observa el análisis descriptivo (figura 21), de Pro-Embrioides (N°), siendo la combinación de los factores a y b, donde a mayor incremento del tiempo de oscuridad (05 días, 10 días, 15 días y 20 días), mayor generación de Pro-Embrioides (N°) en la región del tejido foliar (región basal, región intermedia), sin embargo, no se observa pro-embrioides en la región apical.

La tabla 3, se muestra el Análisis de Varianza de Pro-Embrioides, datos transformados ( $\sqrt{x}$ ), con evidencia estadística del 99%, afirmando la existencia de diferencias significativas para tratamientos, demostrándonos que al menos uno de los tratamientos tuvo un comportamiento estadísticamente diferente a los demás, así mismo



existe las diferencias significativas para los niveles del factor a (región del tejido foliar) y los niveles del factor b (tiempo de oscuridad), así mismo se observa que existe una interacción en la Pro-Embrioides, siendo el resultado de la combinación de los factores a x b, todo esto a una  $P < 0,01$ . Los efectos de esta combinación factores a x b, sobre la pro-embrioides ( $N^\circ$ ), se explican en el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que expresa un valor de 99,71%, encontrándose dentro del rango aceptable según Calzada (1982), demostrando que los datos se ajustaron al modelo utilizado para el análisis, así mismo el Coeficiente de Variabilidad (CV), con un valor de 4,24%, nos indica la baja variabilidad y la alta precisión en la recolección de datos

**Tabla 3**

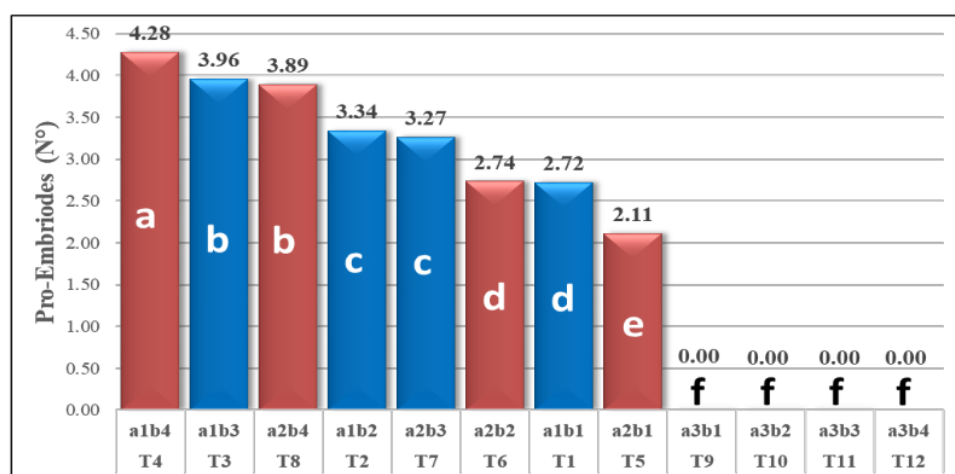
*Análisis de Varianza para Pro-Embrioides ( $N^\circ$ ), Datos Transformados ( $\sqrt{x}$ ).*

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	391.63	11	35.60	4135.72	<0.0001*
Región del tejido foliar (Factor a)	353.95	2	176.98	20558.04	<0.0001*
Tiempo de oscuridad (Factor b)	24.92	3	8.31	964.91	<0.0001*
Factor a*Factor b	12.76	6	2.13	247.01	<0.0001*
Error	1.14	132	0.01		
Total	48483.76	143			

Promedio = 2,19 Pro-embrioides

C.V. = 4,24 %

$R^2 = 99,71 \%$



**Figura 20.** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para Pro-Embrioides ( $N^\circ$ ) por Tratamiento.

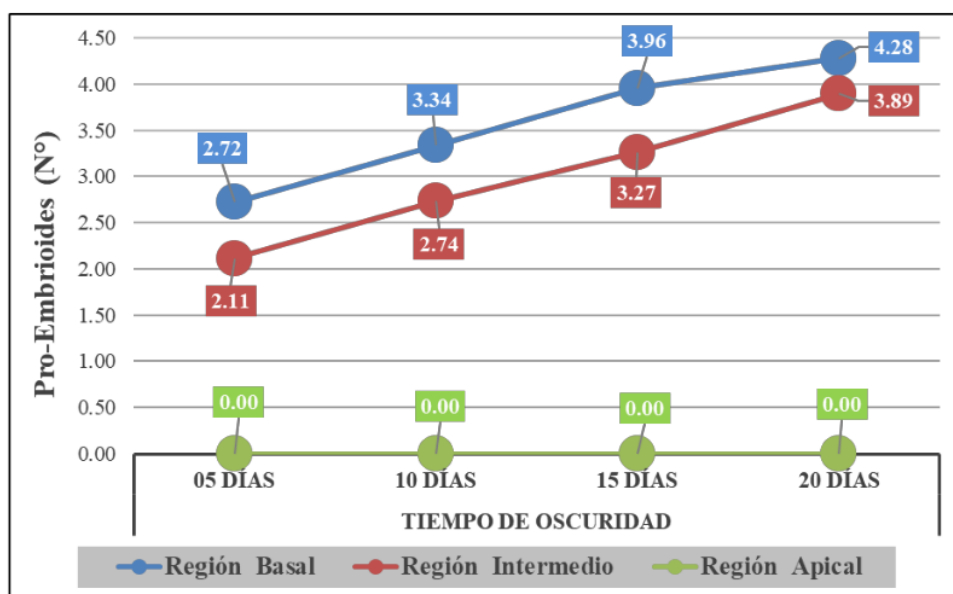


Figura 21. Pro-Embrioides (Nº), de la Interacción del Factor a x b.

En la figura 22, contiene el Test de Duncan ( $p < 0,01$ ) para Pro-Embrioides por Tratamiento, expresando los siguientes resultados; T<sub>4</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>4</sub>), con promedio de 4.28 números de pro-embrioides, es el que reportó mayor números de pro-embrioides siendo estadísticamente superior a los demás tratamientos, seguido de los tratamientos T<sub>3</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>3</sub>) y T<sub>8</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>4</sub>) con promedios de 3.96 y 3.89 números de pro-embrioides respectivamente, en otro grupo y estadísticamente diferente a los ya mencionados son los tratamientos T<sub>2</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>) y T<sub>7</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>3</sub>), con promedios de 3.34 y 3.27 números de pro-embrioides respectivamente, diferentes a estos tratamientos y estadísticamente inferior se encuentran los tratamientos T<sub>6</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>) y T<sub>1</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>), con promedios de 2.74 y 2.72 números de pro-embrioides respectivamente, seguidamente del T<sub>5</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>1</sub>), con promedio de 2.11, los tratamientos T<sub>9</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>1</sub>), T<sub>10</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>2</sub>), T<sub>11</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>) y T<sub>12</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>4</sub>), no reportaron números de Pro-Embrioides, resultados que se discuten con (Taiz & Zeiger, 2004) y (Hurtado y Merino, 1994), mencionan que los reguladores de crecimientos son los compuestos orgánicos provenientes de diferentes nutrientes que se aplica a las plantas para su crecimiento según su requerimiento nutricional.

La figura 23 sobre Pro-Embrioides (Nº), de la interacción de los factores a x b, se observa que no existe una interacción entre los niveles de la región del tejido foliar (región

basal, región intermedia y región apical) y los niveles del tiempo de oscuridad de (10, 15 y 20 días), contradiciendo al análisis de varianza (tabla 3).

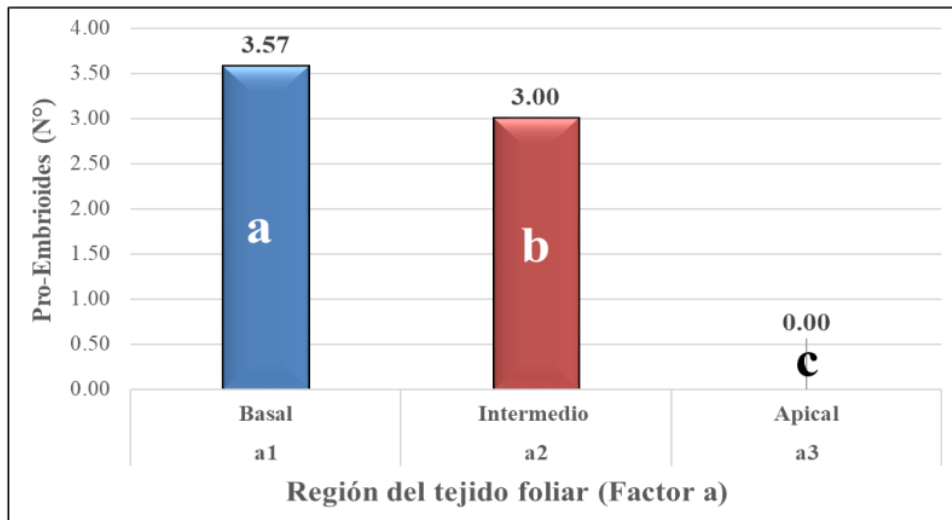


Figura 22. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Pro-Embrioides (Nº), Factor "a".

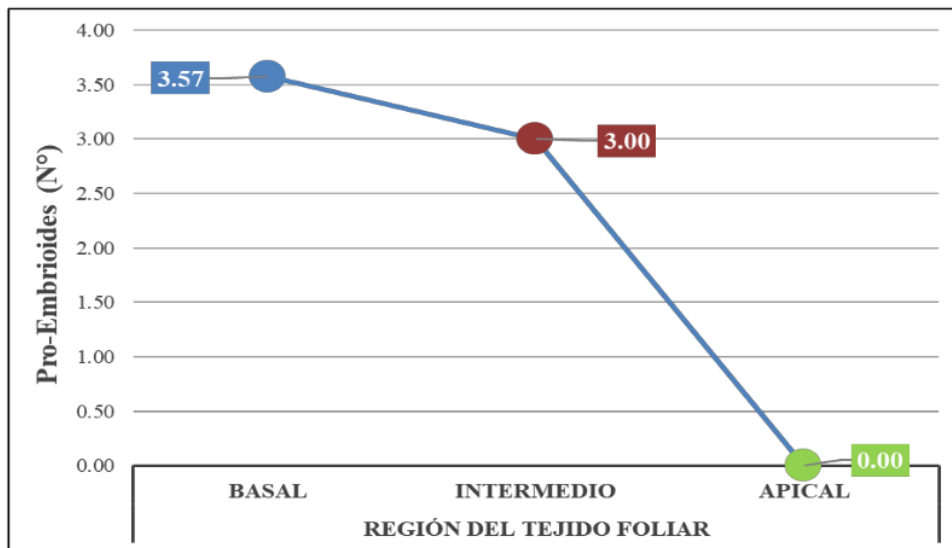
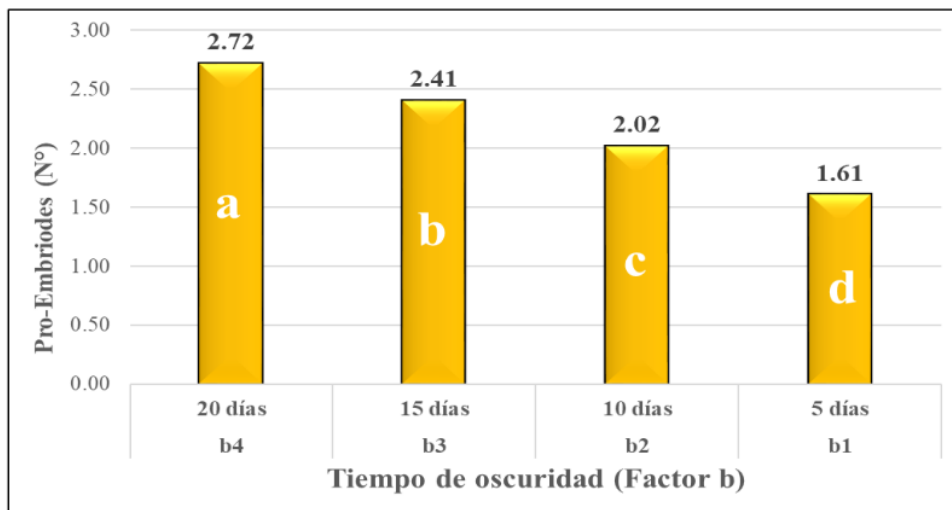


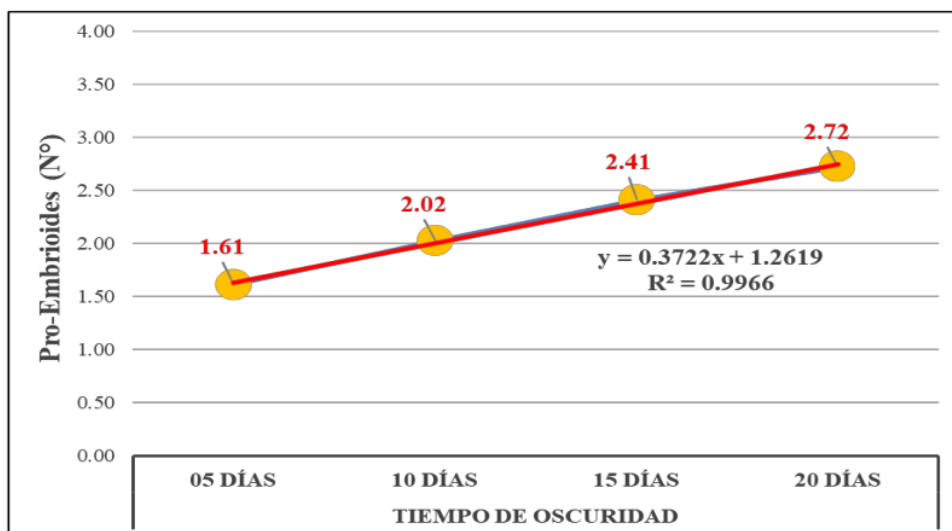
Figura 23. Pro-Embrioides (Nº), en el Factor "a".

Las figuras 24 y 25, nos muestran la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Pro-Embrioides (Nº), Factor "a", existiendo las diferencias estadísticas entre sus niveles, se observa que la

región basal con promedio de 3.57 número de pro-embrioides es estadísticamente diferente y superior a la región intermedio con promedio de 3.00 número de pro-embrioides y diferente estadísticamente a región apical que no reportó pro-embrioides.



**Figura 24.** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Pro-Embrioides (Nº), Factor “b”.



**Figura 25.** Pro-Embrioides (Nº) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor “b”.

Las figuras 26 y 27, se refleja la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) de Pro-Embrioides, dispersión, regresión y correlación del Factor “b”, nos muestra la diferencia estadística entre todos sus niveles, siendo que a 20 días de oscuridad obtuvo 2.72 número de pro-embrioides,

seguidamente a 15 días de oscuridad con 2.41 número de pro-embrioides, por debajo se encuentra 10 días de oscuridad con 2.02 número de pro-embrioides, por último, se encuentra 5 días de oscuridad con 1.61 número de pro-embrioides. Se resalta que el incremento de las dosis del tiempo de oscuridad (Factor b) ha generado una respuesta lineal sobre la Pro-Embrioides (N°) (variable respuesta) descrita por la ecuación  $Y = 0.3722 x + 1.2619$  (figura 27) y una alta relación de correlación (r) de 99.66% ( $\sqrt{R^2} = \sqrt{0.99966}$ ).

### 3.3. Número de Embrioides (N°)

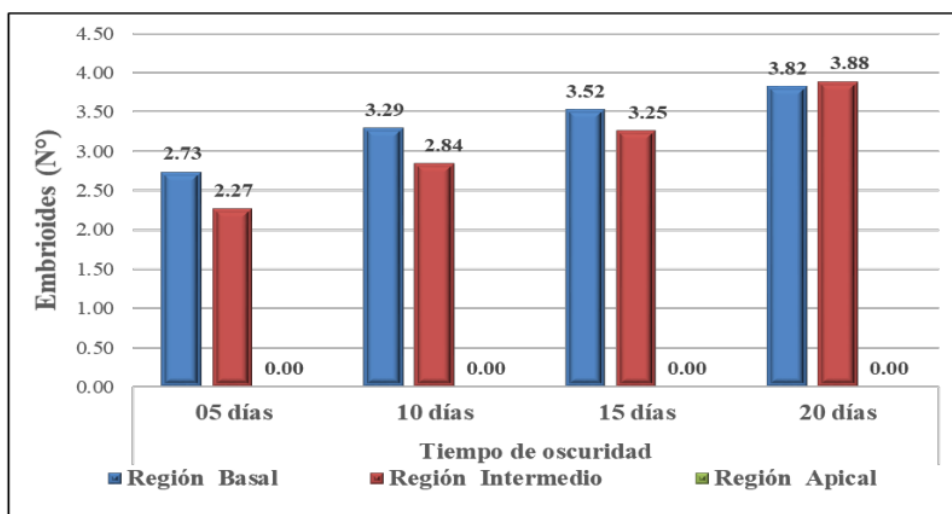


Figura 26. Embrioides (N°), Análisis Descriptivo de los Factores a y b.

En la figura 28, del análisis descriptivo, del número de embrioides (N°), en la combinación de los factores a y b, se observa que cuando se incrementa el tiempo de oscuridad (05 días, 10 días, 15 días y 20 días), existe mayor embrioides (N°) en la región del tejido foliar (región basal, región intermedia), no existiendo embrioides en la región apical.

El Análisis de Varianza para embrioides (N°), datos transformados ( $\sqrt{x}$ ), con evidencia estadística del 99%, se afirma diferencias significativas para tratamientos, así mismo existe las diferencias significativas para los niveles del factor a (región del tejido foliar) y los niveles del factor b (tiempo de oscuridad), por último se observa la interacción en embrioides (N°), siendo el resultado de la combinación de los factores a x b, esto a una  $P < 0.01$ . Los efectos de la combinación de factores a x b, sobre embrioides (N°), fue

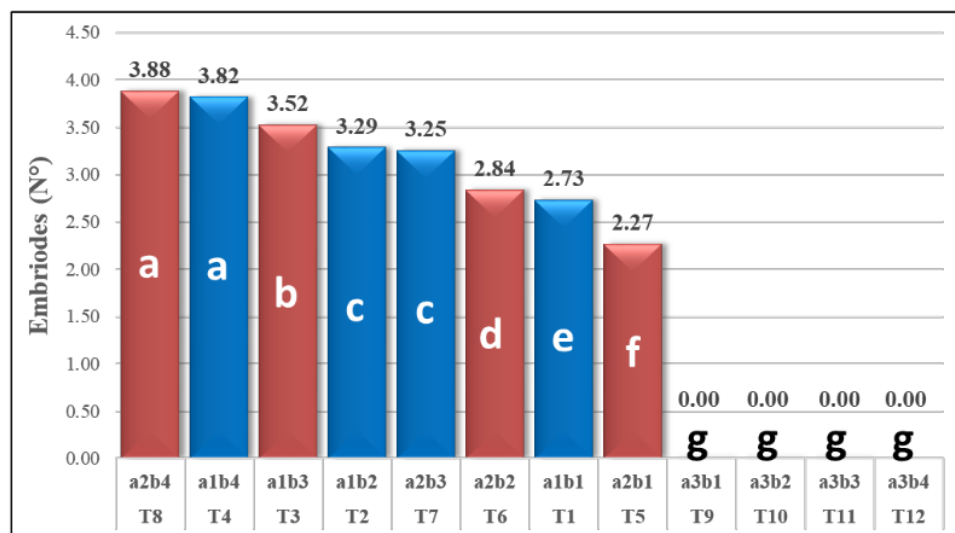
explicado por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), expresando 99,60%, estando dentro del rango aceptable según Calzada (1982), lo cual valida el modelo utilizado, ajustándose los datos en el análisis, el Coeficiente de Variabilidad (CV), con un valor de 4,89%, indica la baja variabilidad y la alta precisión en la recolección de datos.

**Tabla 4**

*Análisis de Varianza para Embrioides ( $N^\circ$ ), Datos Transformados ( $\sqrt{x}$ ).*

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	353.87	11	32.17	2939.64	<0.0001*
Región del tejido foliar (Factor a)	329.68	2	164.84	15063.10	<0.0001*
Tiempo de oscuridad (Factor b)	15.39	3	5.13	468.90	<0.0001*
Factor a*Factor b	8.79	6	1.46	133.86	<0.0001*
Error	1.44	132	0.01		
Total	355.31	143			

**Promedio** = 2,13 Embrioides      **C.V.** = 4,89 %      **R<sup>2</sup>** = 99,60 %



**Figura 27.** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para Embrioides ( $N^\circ$ ) por Tratamiento.

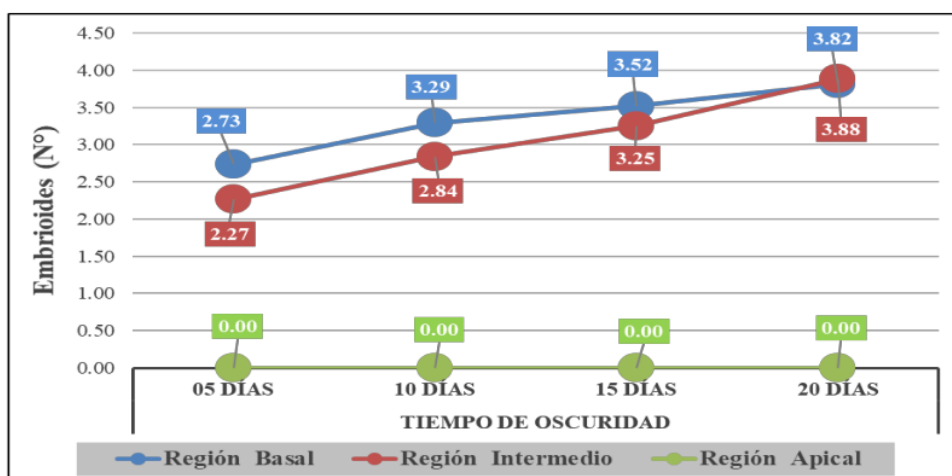


Figura 28. Embrioides (N°), de la Interacción del Factor a x b.

La figura 29, contiene el Test de Duncan ( $p < 0,01$ ) para Embrioides por tratamiento, expresando los siguientes resultados; los tratamientos T<sub>8</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>4</sub>) y T<sub>4</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>4</sub>), con promedios de 3.88 y 3.82 números de embrioides respectivamente, son los que reportaron mayores números de embrioides, siendo estadísticamente superiores a los demás tratamientos, seguido por T<sub>3</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>3</sub>), con promedio de 3.52 número de embrioides, seguido por los tratamientos T<sub>2</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>) y T<sub>7</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>3</sub>), con promedios de 3.29 y 3.25 números de embrioides respectivamente, diferente a estos tratamientos y estadísticamente inferior se encuentra T<sub>6</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>), con promedio de 2.84 número de embrioides, seguido de T<sub>1</sub> (a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>), con promedio de 2.73 números de embrioides, seguidamente del T<sub>5</sub> (a<sub>2</sub>b<sub>1</sub>), con promedio de 2.27 de número de embrioides, los tratamientos T<sub>9</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>1</sub>), T<sub>10</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>2</sub>), T<sub>11</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>) y T<sub>12</sub> (a<sub>3</sub>b<sub>4</sub>), no reportaron números Embrioides, resultados que se discuten con (Taiz & Zeiger, 2004) y (Hurtado y Merino, 1994) indican que los reguladores de desarrollo de una planta proviene de distintos nutrientes que son aplicadas de acuerdo a lo requiera la planta es decir depende su fenología para el buen crecimiento de dicho cultivo.

La figura 30 de embrioides (N°), de la interacción de los factores a x b, se observa una interacción entre los niveles de la región del tejido foliar, específicamente en la región basal y región intermedio, en el tiempo de oscuridad de 20 días.

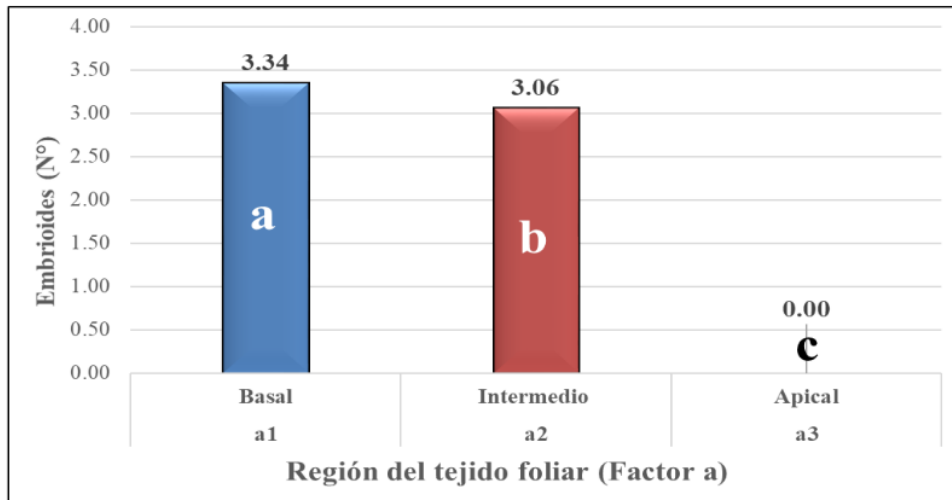


Figura 29. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Embrioides (N°), Factor "a".

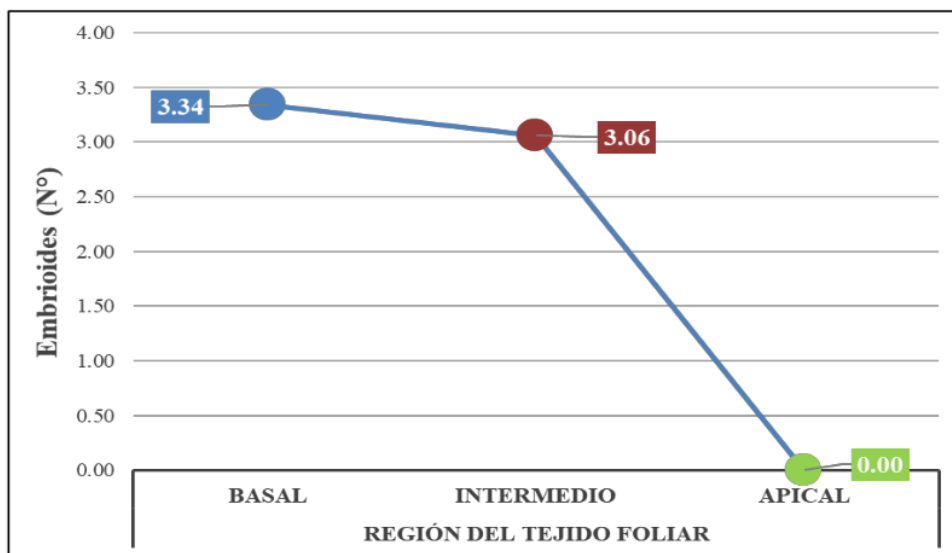
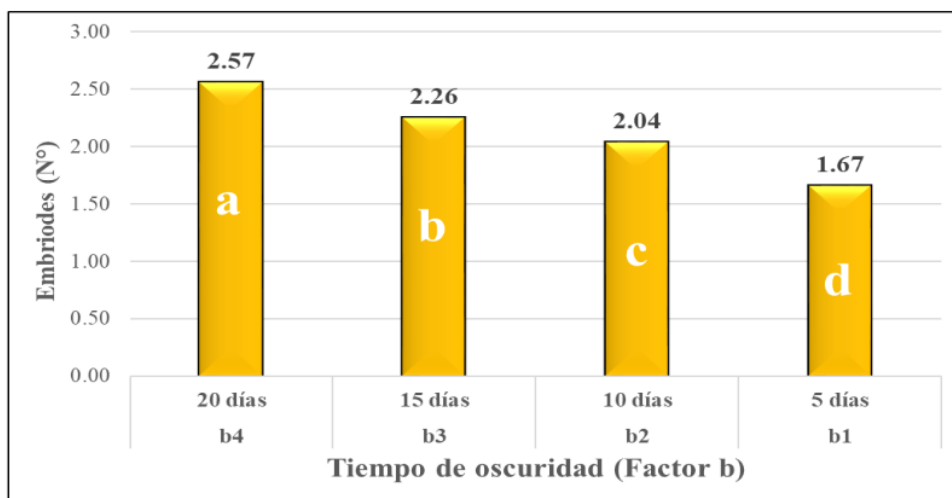


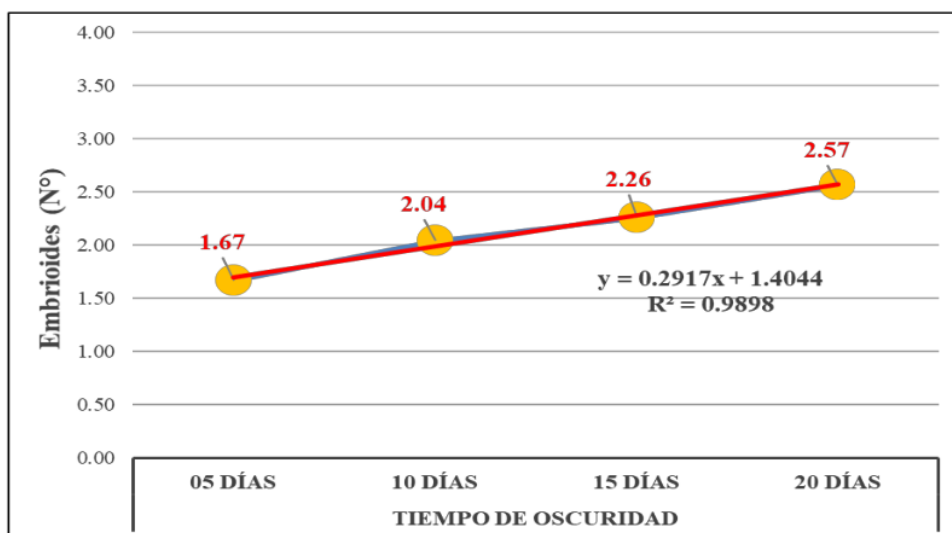
Figura 30. Embrioides (N°), en el Factor "a".

Las figuras 31 y 32, se refleja la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Embrioides (N°), Factor "a", existiendo las diferencias estadísticas entre sus niveles, la región basal con promedio de 3.34 número de embrioides es estadísticamente diferente y superior a la región intermedio con promedio de 3.06 número de embrioides y diferente estadísticamente a región apical que no reportó embrioides.





**Figura 31.** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Embrioides (Nº), Factor “b”.



**Figura 32.** Embrioides (Nº) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor “b”.

Las figuras 33 y 34, se observa la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) de Embrioides, dispersión, regresión y correlación del Factor “b”, expresándonos diferencia estadística entre sus niveles, siendo que a 20 días de oscuridad obtuvo 2.57 número de embrioides, seguidamente a 15 días de oscuridad con 2.26 número de embrioides, por debajo se encuentra 10 días de oscuridad con 2.04 número de embrioides, por último, se encuentra 5 días de oscuridad con 1.67 número embrioides. Se resalta que el incremento de las dosis del

tiempo de oscuridad (Factor b) ha generado una respuesta lineal sobre la embrioides ( $N^\circ$ ) (variable respuesta) descrita por la ecuación  $Y = 0.2917x + 1.4044$  (figura 34) y una alta relación de correlación ( $r$ ) de 98.98% ( $\sqrt{R^2} = \sqrt{0.9898}$ ).

### 3.4. Plantas regeneradas ( $N^\circ$ )

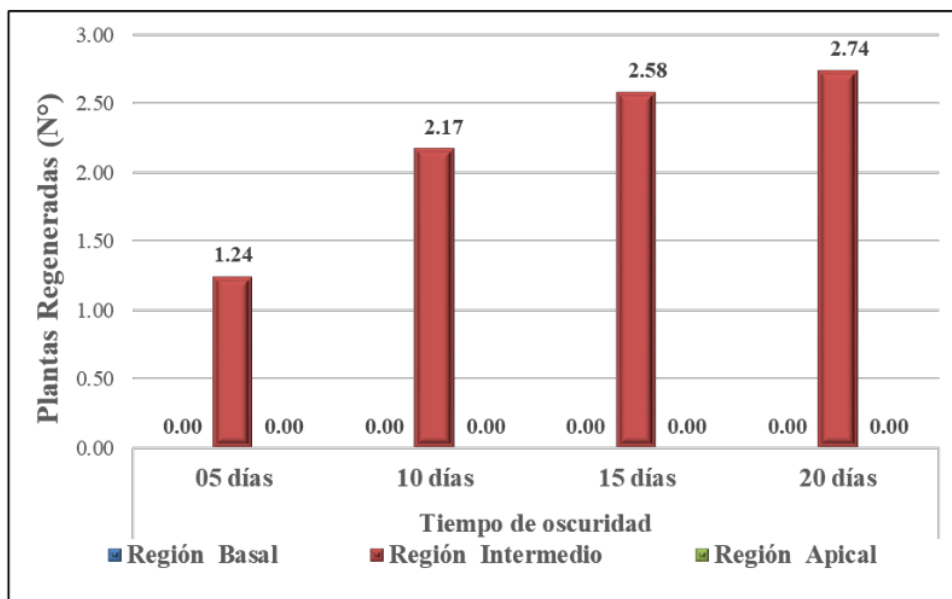


Figura 33. Plantas Regeneradas ( $N^\circ$ ), Análisis Descriptivo de los Factores a y b.

La figura 35, del análisis descriptivo, de plantas regeneradas ( $N^\circ$ ), en la combinación de los factores a y b, observamos cuando se incrementa el tiempo de oscuridad (05 días, 10 días, 15 días y 20 días), también incremente plantas regeneradas ( $N^\circ$ ) en la región del tejido foliar intermedia, no existiendo plantas regeneradas en las regiones del tejido foliar basal y apical.

La tabla 5, se encuentra el Análisis de Varianza para plantas regeneradas ( $N^\circ$ ), datos transformados ( $\sqrt{x}$ ), con evidencia estadística del 99%, afirmamos diferencias significativas para tratamientos, así mismo existe las diferencias significativas para los niveles del factor a (región del tejido foliar) y los niveles del factor b (tiempo de oscuridad), por último existe la interacción en las plantas regeneradas ( $N^\circ$ ), siendo el resultado de la combinación de los factores a x b, esto a una  $P < 0,01$ . Los efectos de la combinación de factores a x b, sobre embrioides ( $N^\circ$ ), fue explicado por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), expresando

99,34%, estando <sup>1</sup> dentro del rango aceptable según Calzada (1982), lo cual valida el modelo utilizado, ajustándose los datos al análisis, <sup>2</sup> el Coeficiente de Variabilidad (CV), con un valor de 12,68%, indica la baja variabilidad y la alta precisión en la recolección de datos.

**Tabla 5**

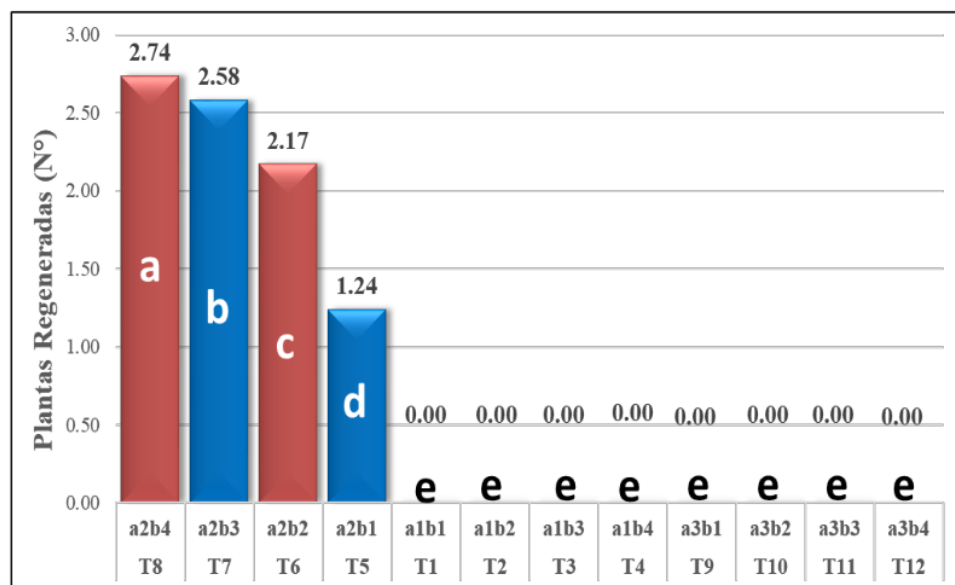
*Análisis de Varianza para Plantas (N°), Datos Transformados ( $\sqrt{x}$ ).*

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	168.94	11	15.36	1814.29	<0.0001*
Región del tejido foliar (Factor a)	152.60	2	76.30	9013.59	<0.0001*
Tiempo de oscuridad (Factor b)	5.45	3	1.82	214.44	<0.0001*
Factor a*Factor b	10.89	6	1.82	214.44	<0.0001*
Error	1.12	132	0.01		
Total	355.31	143			

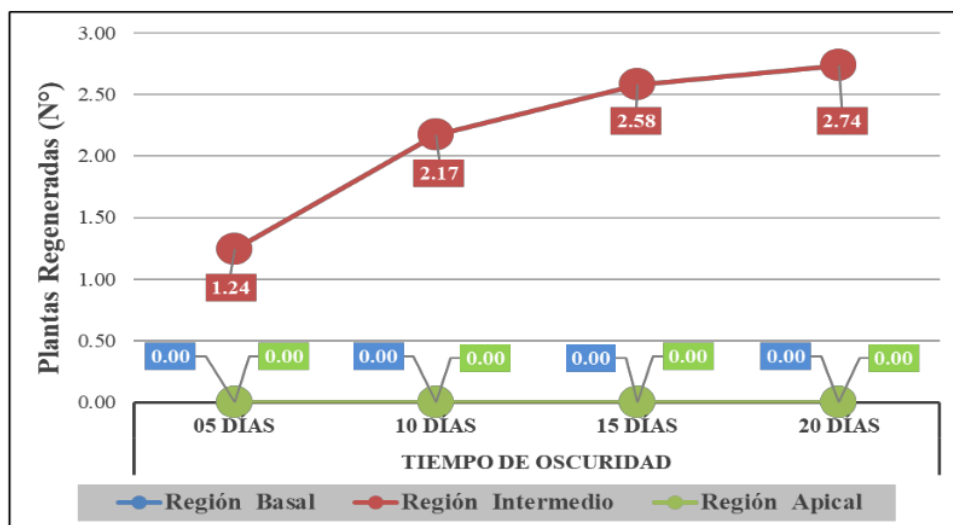
**Promedio** = 0,73 Plantas regeneradas

**C.V.** = 12,68 %

**R<sup>2</sup>** = 99,34 %



**Figura 34.** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Plantas (N°) por Tratamiento.



**Figura 35.** Plantas Regeneradas (Nº), de la Interacción del Factor a x b.

La figura 36, contiene el Test de Duncan ( $p < 0,01$ ) para plantas regeneradas por tratamiento, reflejando los siguientes resultados; el  $T_8$  ( $a_2b_4$ ), con promedio de 2.74 número de plantas regeneradas, es estadísticamente superior y diferente  $T_7$  ( $a_2b_3$ ), con promedio de 2.58 número de plantas regeneradas, siendo este tratamiento superior a  $T_6$  ( $a_2b_2$ ), con promedio de 2.17 número de plantas regeneradas, por último, se encuentra el  $T_5$  ( $a_2b_1$ ), con promedio de 1.24 número de plantas regeneradas, los tratamientos  $T_1$  ( $a_1b_1$ ),  $T_2$  ( $a_1b_2$ ),  $T_3$  ( $a_1b_3$ ),  $T_4$  ( $a_1b_4$ ),  $T_9$  ( $a_3b_1$ ),  $T_{10}$  ( $a_3b_2$ ),  $T_{11}$  ( $a_3b_3$ ) y  $T_{12}$  ( $a_3b_4$ ), no reportaron números plantas regeneradas, resultados que se discuten con (Taiz & Zeiger, 2004) y (Hurtado y Merino, 1994), respecto a que mencionan que los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas, los cuales son producidos en una parte de ella y transferidos a otras, en la cual influyen un proceso específico.

La figura 37 sobre plantas regeneradas (Nº), de la interacción de los factores a x b, se observa que no existe interacción entre los niveles de la región del tejido foliar (región basal, región intermedia y región apical) y los niveles del tiempo de oscuridad de (10, 15 y 20 días), contradiciendo al análisis de varianza (tabla 5).

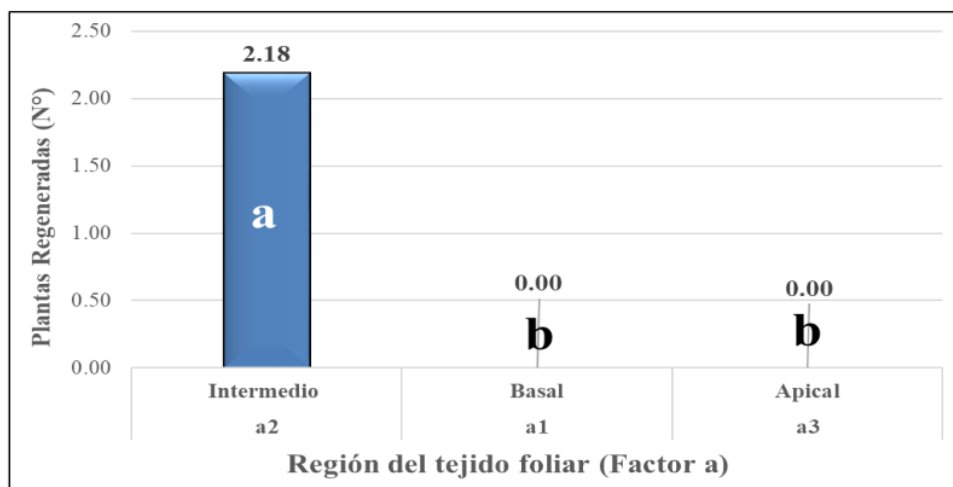


Figura 36. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Plantas (Nº), Factor a (Tejido Foliar).



Figura 37. Plantas (Nº), en el Factor "a".

Las figuras 38 y 39, muestran prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para plantas regeneradas (Nº), Factor "a", existiendo las diferencias estadísticas entre sus niveles, la región intermedia con promedio de 2.18 número de plantas regeneradas fue la única región que logró regenerar plantas, la región basal y apical que no reportaron plantas regeneradas.

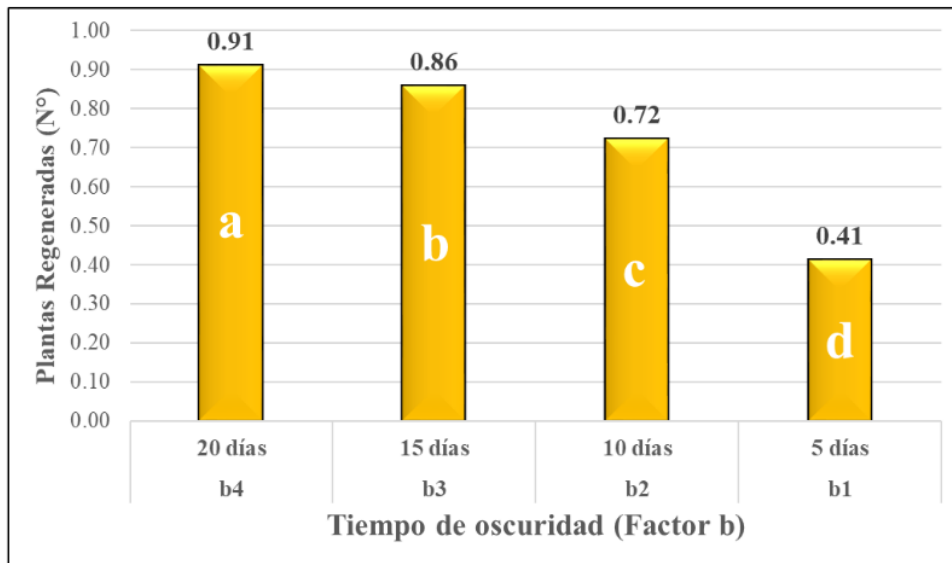


Figura 38. Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) Plantas (Nº), Factor b.

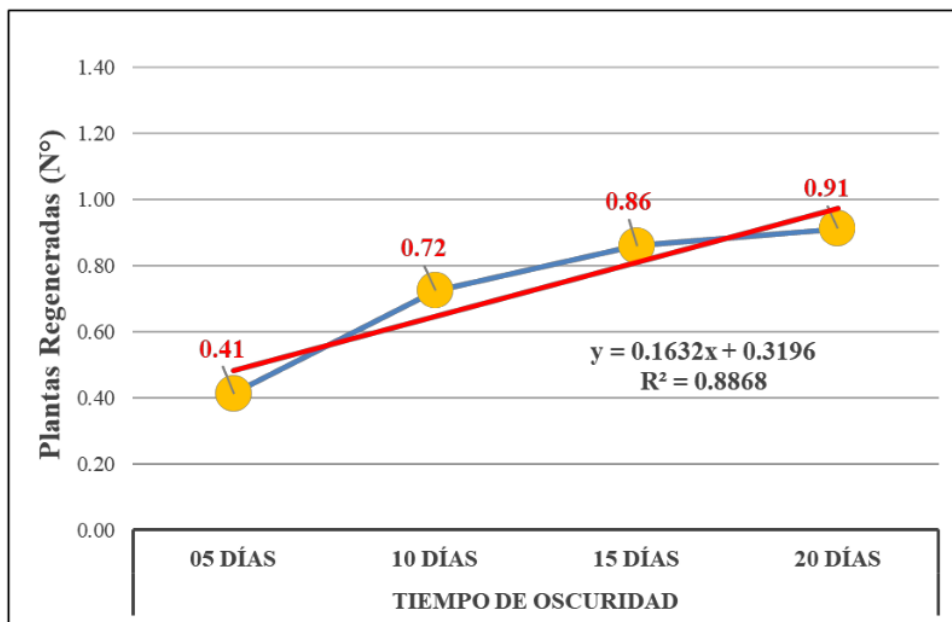


Figura 39. Plantas (Nº) Dispersión, Regresión y Correlación del Factor b.

Las figuras 40 y 41, se observa la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) de plantas regeneradas, dispersión, regresión y correlación del Factor “b”, expresándonos diferencia estadística entre

sus niveles, siendo que a 20 días de oscuridad obtuvo 0.91 número de plantas regeneradas, seguidamente a 15 días de oscuridad con 0.86 número de plantas regeneradas, por debajo se encuentra 10 días de oscuridad con 0.72 número de plantas regeneradas, por último, se encuentra 5 días de oscuridad con 0.41 número de plantas regeneradas. Se resalta que el incremento de las dosis del tiempo de oscuridad (Factor b) ha generado una respuesta lineal sobre la regeneración de plantas (N°) (variable respuesta) descrita por la ecuación  $Y = 0.1632 x + 0.3196$  (figura 41) y una alta relación de correlación (r) de 88.68% ( $\sqrt{R^2} = \sqrt{0.8868}$ ).

## CONCLUSIONES

De los resultados que se obtuvo según el objetivo que se planteo se an podido llegar a estas conclusiones:

- Se logró determinar que patra la inducción del proceso <sup>1</sup>de la embriogénesis somática de manera directa de *Phalaenopsis amabilis*, a raíz de segmento foliar intermedio, Se obtuvo 48.82% de callogénesis, siendo influenciado por la interacción de los factores a x b, expresendonos que a mayor tiempo de oscuridad (05 días, 10 días, 15 días y 20 días), mayor callogénesis (%), las regiones de tejidos foliares (basal, intermedia y apical), también reflejaron su influencia, siendo más bajo la región apical con 15.31 % de callogénesis, Los números de pro-embriarios de *Phalaenopsis amabilis*, fue de 8 pro-embrioides en promedio, siendo influenciado también por la interacción de factores a x b, demostrándonos que a mayor tiempo de oscuridad mayor número de pro-embrioides, donde los tratamientos con región basal reportaron un sub total de 13 pro-embrioides en promedio, tratamientos con región intermedia reportaron un sub total de 9 pro-embrioides en promedio, no se vio reflejando resultados en los tratamientos con región apical.
- Así mismo se obtuvo de <sup>1</sup>los estadios embrionarios de *Phalaenopsis amabilis* se consiguió un total de 7 embrioides en promedio, donde los tratamientos exentos de <sup>1</sup>región de segmento foliar basal lograron un sub-total de 11 embrioides en promedio, tratamientos con región intermedio de logró un sub total de <sup>1</sup>10 embrioides en promedio, no hubo resultados en los tratamientos con región apical, <sup>1</sup>Durante los procesos de la embriogénesis somática de manera directa en *Phalaenopsis amabilis*, sólo se logro resultados de plantas regeneradas en tratamientos con región foliar intermedio, siendo que, a los 20 días, se regeneró 8 plantas, a los 15 días 7 plantas, a los 10 días 5 plantas y a los 5 días solo 2 plantas.



## RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- La Utilización del proceso <sup>1</sup> de inducción de embriogenesis somatica de manera directa en regiones foliares ya que tuvimos resultados favorables gracias a la investigación realizada.
  
- Se deben hacer estudios referentes a la optimización de como se puede dar la multiplicación clonal del genero *Phalaenopsis amabilis* u otras especies en más de 20 días de oscuridad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altafin, (2015). *Semeadura in vitro de orquídeas para propagação massal*.
- Ammirato, P.V. (1983). *Embryogenesis en: Handbook of Plant Cell Culture*. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato Y. Yamada (eds). Vol. I. Macmillan Publishing Co. New Cork. 83-123 pp.
- Blume Ludwig, Carl, (2018). *Como autoridad en la descripción y clasificación científica de los vegetales*, [http://es.wikipedia.org/wiki/Phalaenopsis\\_amabilis](http://es.wikipedia.org/wiki/Phalaenopsis_amabilis).
- Celestino, C., Hernández, I., Careros, E., López-Vela, D., Toribio, M. (2005). *La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal*. Invest. Agrar: Sist Recur For. 14 (3): 345-357.
- Chen, J. T., y Chang, W. C. (2006). *Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of Phalaenopsis amabilis – Biologia Plantarum* 50 (2): 169 - 173.
- Chée, R.P. y Cantliffe, D.J. (1988). *Somatic Embryony Patterns and Plant Regeneration in Ipomoea batatas Poir*. In Vitro Cell Dev. Biol 24: 955-958 pp.
- Claudia et al, (2016). *Inducción e Histología de Embriones Somáticos Primarios y Secundarios de Phalaenopsis Híbrido Classic Spotted Pink (Orquidaceae)*.
- Cruz, (2009). *Inducción de la Embriogénesis Somática Directa en Phalaenopsis amabilis (L.) Bl., a partir de segmentos foliares*.
- Delgado, G. y Rojas C. (1999). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Fundamentos y Aplicaciones. Universidad Pedro Ruíz Gallo. Lambayeque-Perú. 166-191, 221-254 p.
- Dodson C. H. y A. Robyns. (2016). *Flora of Panama*. Hippocrateaceae. Ann. Miss. Bot. Garden 52(1): 81-98.
- Eduip, (2015). *Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*, Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires-Argentina. 1ra edición.
- Escalant, J. V. y Teisson, C. (1989). *Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species Musa acuminata and Musa balbisiana*. Plant Cell Report 7: 665-668.

- Evans, D.A., Sharp, W.R. y Flick, C.E. (1981). *Growth and Behaviour of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis* en: Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. T.A. Thorpe (e.d). Academic Press. New York. 45-113 pp.
- Gil, J. Y. (1987). *The propagation of Phalaenopsis*. Part II. Malay Orchid Rev. (Singapur) 21: 45-46
- Gow, Wee-Peng., Cheng, Jen-Tsun., Chang, Wei-Chin. (2008). "Influence growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis orchids*". Acta Physiol Plant 30: 507-512.
- Guha, S. y Maheshwari, S.C. (1964). *In Vitro Production of Embryos from Anthers of Datura*. Nature 204:497.
- Gómez, R. (1998). *Generalidades sobre la embriogénesis somática*. Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva in Vitro de Especies vegetales Instituto Biotecnología de las Plantas. Santa Clara – Cuba. 134 p.
- Gonzales y Raciman. (2003). "Fitorreguladores de Crecimiento". Consultado el 21 de marzo del 2008. Disponible en: <http://persowanadoo.es/pedrogruen/hormonasvegetalesyreguladores.htm>
- Griesbach, R.J. (2002). *Development of Phalaenopsis Orchids for the Mass-Market*. Tendencias en nuevos cultivos y nuevos usos. 458-465.
- Hacius, B. (1978). *Question of Unicellular Origin of Non-Zygotic Embryos in Callus Cultures*. Phytomorphology 28:74-81 pp.
- Haissig, E. B. (1974). *Origin of adventitious roots*. New Zealand Journal of Forestry Science (Nueva Zelanda) 4 (2): 299-310.
- Handro, W., Roa, P.S. y Harada, H. (1973). *A histological Study of the Depelopment of Buds, roots, and Embryos in Organ Cultures of Petunia inflata* R. Fries. Ann. Bot. 37:817-821 pp.
- Harper, T. (2004). "Phalaenopsis Culture: Advice for Growing 20 Species." Orchids Magazine, Volume 73, No. 2 (February 2004). Delray Beach, FL: American Orchid Society, 2004.

- Hurtado y Merino. (1994). *"Cultivo de Tejidos Vegetales"*. 3ra Edición. Ed. Trillas S.A. México, pp. 45- 160.
- Jones, L.H. (1974). *Long-term Survival of Embryoids of Carrot (Daucus carota L.)*. Plant Sci. Lett. 2:221-224 pp.
- KAKIMOTO T. (2003a). *Biosynthesis of cytokinins*. J Plant Research 116: 233-239.
- KAKIMOTO T. (2003b). *Perception and signal transduction of cytokinins*. Annual Review of Plant Biology 54: 605-207.
- Ludwig-Müller J y J.D Cohen. (2002). *Identification and quantification of three active auxins in different tissues of Tropaeolum majus*. Physiologia Plantarum 115: 320–329.
- Linz, R.E y Conover, R.A. (1991). *In Vitro Polyembryony in Carica papaya L. ovules*. Z. Pflanzenphysiol. 104:185-188 pp.
- Lu, C. y Vasil, I.K. (1981). *Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Tissues of Panicum maximum Jacq.* Theor. Appl. Genet. 59:275-280 pp.
- Maglietti, A. y Hebe Y. (2006). *Resumen A-028. Organogénesis in vitro a partir de explantes de hoja de Arachis burkartii*. 1-4 pp.
- McDougall J, J R Hillman (1978). *Purification of IAA from shoot tissues of Phaseolus vulgaris and its analysis by GC-MS*. J. Exp. Bot. 29:375-386.
- Mroginski, E.; Rey, H.Y. y Mroginski, L. (2006). *Resumen A-036. Obtención de Plantas a Partir del Cultivo in vitro de Explantes Foliare de Arachis correntina (Leguminosae)*. 1-4 pp
- Murashige, T y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol Plant 15:473-497.
- Nitsch, J.P. (1969). *Experimental Androgenesis in Nicotiana*. Phytomorphology 19: 389-404 pp.
- Nordström et al., (1991). *Biology of Adventitious Root Formation*
- Perea, M. & Tirado, A. (2011). *Cultivo de tejidos in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

- Radice, S. (2004). *Morfogénesis in vitro*. En: *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Editores: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing. Agr. Luis Mroginski. Parte II, Capítulo I. pp 26-33.
- Raghavan, V. (1976). *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press. New York. 12: 23-50 pp.
- Reinert, J. (1958). *Morphogenese und Ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten*. *Naturwissenschaften* 45: 344-345 pp.
- Reinert, J. (1959). *Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventive Embryonen an Gewebekulturen aus Karotten*. *Planta* 58:318-333 pp.
- Roca, W y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 499 - 553 -554 p.
- Rosas, (2018). *Efecto del aguamiel-pulque y auxinas-citocininas en la inducción in vitro de PLBs en Phalaenopsis sp.*
- Sannasgala K. (1989). *In vitro somatic embryogenesis in Musa spp.* Thesis Ph.D. K.U. Leuven, Belgium. 172p.
- Salisbury, F. y Ross, W. (2000). *Fisiología de las plantas*. Ed. Paraninfo. Madrid, España. 988 p.
- Sharp, W. R., Sondahl, M. R. Caldas, L. S. y Maraffa, S. B. (1980). *The Physiology of in Vitro Asexual Embryogenesis*. *Hortic. Rev.* 2: 268-310 pp.
- Skoog, F. y Miller, C. (1957). *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-130.
- Stoller, (2015). *Guía stoller de sanidad vegetal*, Maximizando la expresión Genética de la planta.
- Steward, F.C.; Mapes, M.O. y Smith, J. (1958). *Growth and Organized Development of Cultured Calls*. I. Growth and Division of Freely Suspended Cells. *Amer. J. Bot.* 45:705-708 pp.

- Sommer, H.E., Brown, C.L. y Kormanik, P.P. (1975). *Differentiation of Plantlets in Long-Leaf pine (Pinus palustris Mill.) Tissue Cultured In Vitro*. Bot. Gaz. 136:196-200 pp.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2004). *Fisiología Vegetal*. 3er edición. Plant physiology Pág. 517-519.
- Tisserat, B., Esan, E. y Murashigue, T. (1979). *Somatic Embryogenesis in Angiosperms*. Hort. Rev. 1: 1-78 pp.
- Tirado, JM., Naranjo, JE., Atehortua, L. (2005). *Propagación in vitro de Phalaenopsis (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de Inmersión temporal "RITA"*. Revista Colombiana de Biotecnología. 7 (1): 25-31.
- Tisserat, B., Esan, E. y Murashigue, T. (1979). *Somatic Embryogenesis in Angiosperms*. Hort. Rev. 1: 1-78 pp.
- Thorpe, (1981). *Plant tissue culture*. Methods and applications in agriculture. Acad. Press. Nueva York. Pag. 1 – 379.
- Veitch, H.J. (1886). *The hybridization of orchids*. J. Royal Hort. Soc. 7:22–49.

# Determinación del balance embriogénica de segmentos foliares de *Phaleanopsis amabilis* L.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

21 %

INDICE DE SIMILITUD

21 %

FUENTES DE INTERNET

3 %

PUBLICACIONES

6 %

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	6 %
2	<a href="http://repositorio.unsm.edu.pe">repositorio.unsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	5 %
3	<a href="http://www.scielo.org.mx">www.scielo.org.mx</a> Fuente de Internet	1 %
4	<a href="http://repositorio.utn.edu.ec">repositorio.utn.edu.ec</a> Fuente de Internet	1 %
5	Submitted to Universidad Andina del Cusco Trabajo del estudiante	1 %
6	<a href="http://algodeplantas-hola1sonrisita.blogspot.com">algodeplantas-hola1sonrisita.blogspot.com</a> Fuente de Internet	1 %
7	<a href="http://repositorio.unsa.edu.pe">repositorio.unsa.edu.pe</a> Fuente de Internet	1 %
8	<a href="http://biblioteca.usac.edu.gt">biblioteca.usac.edu.gt</a> Fuente de Internet	1 %
9	<a href="http://www.slideshare.net">www.slideshare.net</a> Fuente de Internet	

<1 %

10

[ri.uaemex.mx](http://ri.uaemex.mx)

Fuente de Internet

<1 %

11

Submitted to Escuela Politecnica Nacional

Trabajo del estudiante

<1 %

12

[revistas.untrm.edu.pe](http://revistas.untrm.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

13

[pesquisa.bvsalud.org](http://pesquisa.bvsalud.org)

Fuente de Internet

<1 %

14

[redi.unjbg.edu.pe](http://redi.unjbg.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

15

[repositorio.undac.edu.pe](http://repositorio.undac.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

16

[tesis.unsm.edu.pe](http://tesis.unsm.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

17

[aprenderly.com](http://aprenderly.com)

Fuente de Internet

<1 %

18

[doaj.org](http://doaj.org)

Fuente de Internet

<1 %

19

[es.wikipedia.org](http://es.wikipedia.org)

Fuente de Internet

<1 %

20

[busquedas.elperuano.pe](http://busquedas.elperuano.pe)

Fuente de Internet

<1 %



21	<a href="https://dspace.unitru.edu.pe">dspace.unitru.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
22	<a href="https://repositorio.ucv.edu.pe">repositorio.ucv.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
23	<a href="https://vdocument.in">vdocument.in</a> Fuente de Internet	<1 %
24	N. M. Cusquillo Quispillo, J. E. Usca Méndez, I. P. Salgado Tello, A. M. Castillo Reinoso. "Making Nutritional Blocks Based on Scirpus rigidus (Totorilla) Flour for the Feeding and Fattening of Guinea Pigs", ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M., 2021 Publicación	<1 %
25	<a href="https://dspace.unl.edu.ec">dspace.unl.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
26	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1 %
27	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1 %
28	Forestry Sciences, 1987. Publicación	<1 %
29	Submitted to Universidad Nacional de San Martín Trabajo del estudiante	<1 %

30

1library.co

Fuente de Internet

<1 %

---

31

es.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

---

32

repositorio.umsa.bo

Fuente de Internet

<1 %

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 10 words

Excluir bibliografía

Activo