

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA - BIOQUÍMICA



**INDUCCIÓN A CALLOGÉNESIS PARA LA MICROPROPAGACIÓN
DE *PHALAENOPSIS* (ORCHIDACEAE)**

TESIS DE GRADO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

Postulante: Univ. Karen Vincenty Gutierrez

Tutores: M. Sc. Jorge Quezada Portugal

Dr. Enrique Terrazas Siles †

La Paz – Bolivia

2019

DEDICATORIA

Dedicado a Dios que me da fortaleza para continuar, a mis hijos Santiago y Mikaela que son mi motivación e inspiración, a mi madre por ser la persona que más admiro y no existen palabras suficientes para expresarle todo mi agradecimiento y mi admiración por su sacrificio y esfuerzo, a mi padre por brindarme su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo por darme su apoyo y comprensión para poder culminar con la realización de la tesis.

A la Unidad de Biotecnología Vegetal (U.B.V) perteneciente al instituto de Biología Molecular y Biotecnología (I.B.M.V.) por haberme abierto sus puertas.

Al Ing. Jorge Quezada Portugal por haberme brindado su guía y compartido sus conocimientos ayudándome en todo el proceso que significo la terminación de la presente tesis.

A María Cristina López por sus consejos y toda la ayuda brindada.

A mis compañeros de mi generación Gaby, Lorena, Paola, Beatriz, Juan Carlos, Saúl quienes hicieron de la Unidad de Biotecnología Vegetal un grato lugar de trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	4
1.1.1. Objetivo General	4
1.1.2. Objetivos Específicos	5
1.2. HIPÓTESIS NULA.....	5
1.3. CARACTERÍSTICAS DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.3.1. Tipo de investigación.....	6
1.3.2. Técnicas de Investigación	6
1.3.3. Diseño experimental y Análisis estadístico.....	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. <i>PHALAENOPSIS</i>	7
2.1.1. Etimología	8
2.1.2. Habitat	8
2.1.3. Cultivo.....	9
2.2. CLASIFICACIÓN DE ORQUÍDEAS	100
2.2.1. Género <i>Cymbidium</i>	100
2.2.2. Género <i>Cattleya</i>	111
2.2.3. Género <i>Phalaenopsis</i>	122
2.3. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>PHALAENOPSIS</i>	12
2.4. TEMPERATURAS Y VENTILACIÓN DE <i>PHALAENOPSIS</i>	144
2.5. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.....	144
2.6. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	14
2.7. MICROPROPAGACIÓN	15
2.8. CALLOGÉNESIS	17
2.9. REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	199
2.9.1. Acido 2,4 Diclorofenoxiacetico (2,4-D).....	209
2.9.2. Bencil Amino Purina (BAP).....	21

2.10. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	22
3. METODOLOGÍA.....	25
3.1. LOCALIZACIÓN.....	25
3.2. MATERIALES.....	25
3.2.1. Material Vegetal.....	26
3.2.2. Elementos de Laboratorio.....	26
3.3. AMBIENTES DEL EXPERIMENTO.....	27
3.4. NÚMERO DE MUESTRAS.....	27
3.5. CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	27
3.6. PROCEDIMIENTO.....	28
3.6.1. Tratamiento De Desinfección.....	28
3.6.2. Inicio de la Inducción a Callogénesis.....	29
3.6.2.1. Fases.....	30
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. FORMACIÓN DE CALLOS EN PRESENCIA DELUZ.....	34
4.1.1. Formación de callos.....	34
4.1.2. Inicio de formación de callos.....	38
4.1.3. Peso fresco de callos.....	42
4.1.4. Número de callo.....	46
4.1.5. Supervivencia.....	49
4.2. FORMACIÓN DE CALLOS EN OSCURIDAD.....	56
4.2.1. Formación.....	56
4.2.2. Inicio de formación.....	60
4.2.3. Peso fresco de los callos.....	62
4.2.4. Número de callos.....	64
4.2.5. Supervivencia.....	65
4.3. COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE LUZ Y OSCURIDAD.....	70
5. CONCLUSIONES.....	73
6. RECOMENDACIONES.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

ANEXOS.....	85
ANEXO 1: ELEMENTOS DE LABORATORIO.....	85
ANEXO 2: MEDIO BASAL MURASHIGE & SKOOG, 1962 (MS).....	86
ANEXO 3: MSTAT –C.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica	122
Tabla 2. Explantes	27
Tabla 3. Combinaciones hormonales para la evaluación	28
Tabla 4. Tratamiento de desinfección.	28
Tabla 5. Descripción de fases	30
Tabla 6. Repeticiones experimentales	32
Tabla 7. Análisis de Varianza – Formación de Callos	35
Tabla 8. Formación de callos en explantes	35
Tabla 9. Formación de callos en la interacción 2,4-D con explantes.....	37
Tabla 10. Análisis de Varianza – Inicio de formación de callos	38
Tabla 11. Efecto del 2,4-D en los explantes al inicio de formación de callos	39
Tabla 12. Efecto de la combinación BAP y 2,4-D en los explantes al inicio de formación de callos	40
Tabla 13. Análisis de Varianza – Peso de callos.....	42
Tabla 14. Efecto 2,4-D en el peso de los callos	44
Tabla 15. Efecto 2,4-D en el peso de los callos respecto a explantes.....	45
Tabla 16. Análisis de Varianza – Cantidad.....	46
Tabla 17. Efecto 2,4-D en el número de callos.....	47
Tabla 18. Efecto 2,4-D en la cantidad de callos respecto a explantes	49
Tabla 19. Análisis de Varianza – Supervivencia.....	50
Tabla 20. Supervivencia en 2,4-D de acuerdo al factor de Duncan.....	52
Tabla 21. Concentración de BAP en la supervivencia de los explantes	54
Tabla 22. Análisis de Varianza – Formación	57
Tabla 23. Efecto 2,4-D en los explantes para la formación de callos – oscuridad	57
Tabla 24. Análisis de Varianza – Inicio de formación	60
Tabla 25. Inicio de la formación de callo para la concentración de 2,4-D de acuerdo al análisis de Duncan	60
Tabla 26. Efecto 2,4-D al inicio de formación – oscuridad.....	61
Tabla 27. Análisis de Varianza – Peso.....	62

Tabla 28. Concentración de 2,4-D en relación al peso de los callos	63
Tabla 29. Análisis de Varianza – Cantidad.....	64
Tabla 30. Efecto 2,4-D en la cantidad de callos respecto a explantes.....	65
Tabla 31. Análisis de varianza – Supervivencia	66
Tabla 32. Concentración de BAP en relación a la supervivencia	66
Tabla 33. Concentración de 2,4-D en relación a la supervivencia.....	67
Tabla 34. Concentración de BAP en la supervivencia de los explantes	68
Tabla 35. Cuadro comparativo de resultados sobresalientes entre condiciones de luz y oscuridad.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Orquídea del genero <i>Phalaenopsis</i>	1
Figura 2. Crecimiento monopoidal de la parte caulinar de <i>Phalaenopsis</i>	7
Figura 3. Raíces que cumplen la función de sostén	8
Figura 4. Flores del genero <i>Cymbidium</i>	11
Figura 5. Orquídea del genero <i>Cattleya</i>	11
Figura 6. Inflorescencia de <i>Phalaenopsis</i>	13
Figura 7. Métodos de micropropagación.....	17
Figura 8. Morfogénesis indirecta.....	18
Figura 9. Localización de la investigación	25
Figura 10. Yemas florales de <i>Phalaenopsis</i>	26
Figura 11. Condición luminica (luz-oscuridad).....	27
Figura 12. <i>Phalaenopsis in vitro</i>	29
Figura 13. Esquema del desarrollo experimental	33
Figura 14. Formación de callos en los explantes	36
Figura 15. Efecto de los explantes en el peso de los callos	43
Figura 16. Efecto de las diferentes concentraciones de 2,4-D sobre el peso de las hojas	46
Figura 17. Número de callos respecto a explantes	48
Figura 18. Efecto BAP en la supervivencia de los explantes.....	50
Figura 19. Supervivencia de los explantes.....	51
Figura 20. Efecto 2,4-D en la supervivencia de los explantes	53
Figura 21. Brote en el explante hoja	55
Figura 22. Efecto del 2,4-D en la formación de callos	59
Figura 23. Peso de los explantes	64
Figura 24. Supervivencia en explantes	67

INDUCCIÓN A CALLOGÉNESIS PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE *PHALAEOPSIS* (ORCHIDACEAE)

RESUMEN

La orquídea *Phalaenopsis* es una de las orquídeas más apreciada por sus atractivas características, esto ha despertado un interés comercial y la ha convertido en una especie económicamente importante. Por lo que se tornó necesario realizar protocolos de micropropagación *in vitro* para satisfacer la demanda que tiene a nivel mundial.

El cultivo *in vitro* por medio de callos constituye un método eficiente de propagación en especies vegetales.

En este estudio se utilizaron yemas de tallo floral de *Phalaenopsis* (variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*) de aproximadamente 3 meses de edad, los cuales fueron introducidos a condiciones *in vitro* con el fin de obtener hojas y tallos, una vez obtenidos estos explantes, fueron inducidos a callogénesis, para lo cual se usó el medio Murashige & Skoog (1962) con diferentes concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,1, 1, 5, 10 [mg/l]) y Bencil aminopurina (BAP) (0,1 y 1 [mg/l]), dando como resultado 8 combinaciones de estos reguladores de crecimiento, haciendo un total de 16 tratamientos ya que fueron incubados en condiciones tanto de luz como de oscuridad.

Las variables que se evaluaron fueron: explantes (hoja y tallo), formación de callos, inicio de formación, peso, cantidad de callos y supervivencia de los explantes, en ambas condiciones.

Los resultados mostraron que de las cuatro concentraciones utilizadas de 2,4-D, las concentraciones de 5 [mg/l] seguida de la concentración de 10 [mg/l] de 2,4-D, fueron las más eficaces en hojas para la inducción a callogénesis, en los tallos la concentración de 0,5 [mg/l] de 2,4-D resultó ser la más óptima para la inducción a callogénesis, debido a que esas concentraciones se dio un mayor porcentaje de callos, un mejor tiempo de inicio de formación, un mayor peso y cantidad de callos tanto en luz como oscuridad. Pero estas variables refiriéndonos a los explantes, dieron mejores resultados en las hojas, a pesar de que los tallos sobrevivieron en un 100%.

El 2,4-D resultó imprescindible para la inducción a callogénesis en ambas condiciones lumínicas, el BAP en condiciones de luz jugó un papel importante para que se dé un inicio de formación más temprana en ambos explantes.

Se determinó que la condición lumínica es un factor importante en hojas, ya que en presencia de luz se obtuvieron notoriamente mejores resultados, pudiendo obtenerse incluso la generación de brotes adventicios, en los tallos la condición lumínica no fue un factor determinante ya que en ambas condiciones los resultados tuvieron poca variación.

ABSTRACT

The *Phalaenopsis* orchid is one of the most appreciated orchids for its attractive features, This has aroused a commercial interest and has made it an economically important species. Therefore, it was necessary to carry out *in vitro* micropropagation protocols to meet the world wide demand.

In vitro culture by means of callused constitutes an efficient method of propagation of plant species.

In this study, *Phalaenopsis* flower stem buds (hybrid variety *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*) of approximately 3 months of age were used, wich were introduced to *in vitro* conditions in order to obtain leaves and stems, once these explants were obtained, they were induced to callogenesis for which de Murashige and Skoog (1962) médium was used wich different concentration of acid 2,4 diclorofenoxiacetico (2,4-D) (0,1, 1, 5, 10 [mg/l]) and Bencil aminopurina (BAP) (0,1 y 1 [mg/l]), resulting in 8 combinations of these growth regulators making a total 16 treatments since they were incubated in both light and dark conditions.

The variables that were evaluated were explants (leaf and stem), callus formation, start of formation, weight, number of callused, and survival of the explants in both conditions.

The results showed that of the four concentrations used of 2,4-D, the concentration of 5 [mg] followed by the concentration of 10 [mg] of 2,4-D, were the most effective in leaves for induction of callogenesis, in the stems the concentration of 0,5 [mg] of

2,4-D proved to be the most optimal for induction of callogenesis, because at these concentrations there was a higher percentage of calluses, a better formation start time, a greater weight and number of calluses in both light and dark, But these variables referring to explants gave better results in the leaves although the stems survived 100%.

2,4-D was essential for induction of callogenesis in both light conditions, the BAP in light conditions played an important role for an early mad formation on both explants.

It was determined that the light condition is an important factor in sheets since in the presence of light, better results were obtained, being able to obtain even the generation of adventitious buds, in the stems the light condition was not a determining factor since in both conditions the results had little variation.

1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas han fascinado al mundo durante siglos y son consideradas como flores místicas; algunos pueblos primitivos también las utilizaron con fines medicinales.

Debido a su belleza y al elevado costo que alcanzan estas especies, en la actualidad, son motivo de cultivo por particulares e industriales como flor cortada y como planta ornamental, por lo que tiene importancia económica a nivel mundial.

*Phalaenopsis*¹ (ver figura 1) es un género de orquídeas epifitas originarias del Sureste de Asia, India, Indonesia y parte de Australia (De Feira, 2007). Estas representan uno de los grupos de orquídeas más apreciados por el colorido y la duración de sus flores. A diferencia de otras 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 por la presencia de altos niveles de esterilidad.



Figura 1. Orquídea del género *Phalaenopsis*.

Fuente:(Sannicolo, 2014)

Por ello, según Jiménez y Guevara (1996), para esta especie, varias formas de multiplicación clonal *in vitro*² (micropropagación) han sido desarrolladas, dentro de

¹*Phalaenopsis*: refiérase a un género de la familia orchidaceae.

²*In vitro*: en latín dentro del vidrio, experimento realizado en tubo de ensayo o un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

las cuales las más exitosas han sido a través del uso de segmentos del eje floral, y de segmentos de hojas (Tanaka y Sakanishi, 1977; Arditti y Ernst, 1993). También se ha desarrollado la formación de embriones somáticos a partir de callos (Ishii y Takamura, 1998) y callos (Chen *et al.* 2000; Islam y Ichihashi, 1999) para su posterior regeneración en plántulas.

Por lo cual, el cultivo *in vitro* se perfila como una respuesta alternativa para el problema de las especies en peligro de extinción y en el mantenimiento de híbridos de alto valor.

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de tejidos o células cultivadas en forma aséptica, en un recipiente en que se pueden controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición.

Se ha generalizado el uso de técnicas de cultivos de tejidos vegetales con la ayuda de diversas sustancias químicas como los reguladores de crecimiento o fitohormonas con capacidad de inducir el crecimiento y diferenciación de células vegetales, este ha sido el punto de partida para crear una importante herramienta biotecnológica.

Las hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos naturales producidos en las plantas y son las que definen en buena medida su desarrollo. Se sintetizan en una parte u órgano de la planta a concentraciones muy bajas y actúan en un sitio o se traslocan a otro en donde regulan eventos fisiológicos definidos (INTAGRI 2015).

La micropropagación de las orquídeas se puede dividir en dos grupos importantes, basados principalmente en el objetivo de trabajo y la fuente del explante: micropropagación sexual y micropropagación asexual (Kuan y González, 1993). La micropropagación sexual consiste básicamente en la propagación por medio de semilla, con lo cual se asegura la variabilidad del material genético. La

micropropagación asexual de las orquídeas, se realiza partiendo de diferentes tipos de explantes según sea el crecimiento de la orquídea (meristemo apical, meristemo lateral o yema, yema en dormancia, nudo de tallo, yema floral, tallo floral joven, sección de hoja nueva, sección de raíz, pétalo de flor y otros). La ventaja que presenta este sistema es que las plántulas son idénticas a sus progenitores (clones).

Callogénesis es el proceso por el que se forma un callo, que corresponde a una masa de células indiferenciadas que al seguir un determinado proceso forma la plántula. Se puede definir el callo en cultivo *in vitro* como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido, (UNAD, 2009)

En muchas especies de plantas, la regeneración a partir de callo, (callo embriológico) por ser altamente totipotente, ha sido reconocida como una de las técnicas esenciales para la micropropagación y aplicaciones biotecnológicas. En orquídeas, informes exitosos en la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos han sido limitados. Sajise y Sagawa (1991) informó por primera vez de la formación de callo embriogénico en *Phalaenopsis* sin una descripción detallada del método para la inducción de callo.

Algunos géneros de la familia de las orquídeas son objeto de cultivos importantes; se trata, no obstante, de cultivos muy especializados. Su cultivo es posible en todas partes y está especialmente desarrollado desde la mitad del siglo pasado porque muchos híbridos interespecíficos e intergenéricos fueron creados y comercializados con éxito por sus obtentores. La explotación comercial para flor cortada y el cultivo en maceta, incide a unos cincuenta géneros cuyo cultivo involucra a muchos países.

Según PRODUCTOS ABC-GARDEN³, entre los principales países productores de orquídeas cabe destacar a Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Países Bajos y Tailandia. El aumento de la demanda en los países industrializados ofrece una oportunidad para el desarrollo de mercados de exportación en otros países en vías de desarrollo, tanto del sureste de Asia como de Sudamérica.

El presente estudio plantea el desarrollo de una metodología eficiente de regeneración vegetativa *in vitro* de *Phalaenopsis* a través de la inducción de calogénesis con el fin de sentar bases para la producción de gran cantidad de plantines de la especie en estudio.

Se espera que la inducción a calogénesis en el futuro sea una técnica que se aplique en cultivos de especies de orquídeas con potencial económico o en peligro de extinción de nuestro país.

1.1. OBJETIVOS

A continuación, se describe el objetivo general, los objetivos específicos y la hipótesis de la investigación.

1.1.1. Objetivo General

Desarrollar el proceso de inducción⁴ a calogénesis *in vitro* de *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip* a partir de diferentes explantes, condiciones de luz y la variación de Reguladores de Crecimiento (auxina y citocinina), como una base para la regeneración de vitroplantas⁵.

³ABC GARDEN: Distribuidora de Insumos agropecuarios y espacios verdes: <http://www.abcgarden.com.ar/productos.html>

⁴Proceso de inducción: proceso por el cual las células de algunos tejidos cambian de comportamiento en su forma; mecanismo responsable de la coordinación observada en la construcción de los órganos.

⁵Vitroplantas: Plantín desarrollado por técnicas de cultivo de tejidos vegetales que todavía se encuentra en condiciones *in vitro*.

1.1.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar el explante (hoja o tallo) en el que se presente un mejor proceso de regeneración *in vitro* de *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*.
- ✓ Determinar la concentración óptima del Regulador de Crecimiento ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) para la inducción de callos en *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*.
- ✓ Determinar la concentración óptima del Regulador de Crecimiento Bencil aminopurina (BAP) para la inducción de callos en *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*.
- ✓ Determinar la condición lumínica óptima (oscuridad o luz) para la inducción calogénica *in vitro* de *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*.

1.2. HIPÓTESIS NULA

H_0 :

- ✓ No existen diferencias significativas en la selección de explantes (hojas y tallos) para la generación de calogénesis *in vitro* de *phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*.
- ✓ No existen diferencias estadísticas entre las concentraciones utilizadas del regulador de crecimiento 2,4-D para la inducción a calogénesis de *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*.
- ✓ No existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas del regulador de crecimiento BAP para la inducción a calogénesis de *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip*.

- ✓ La generación del proceso de callogénesis no está influenciada por la presencia o ausencia de luz.

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. Tipo de investigación

En el presente experimento se utilizó el método inductivo, debido a que el desarrollo de la investigación se realizó a partir de muestras particularizadas de los explantes en tallos y hojas, para observar la formación de callogénesis *in vitro* y posteriormente generalizarlas. Así mismo, el material utilizado para la presente investigación se describe en el anexo 1.

1.3.2. Técnicas de Investigación

La investigación se realizó en laboratorio, donde se procedió a la introducción y multiplicación *in vitro* de la orquídea *Phalaenopsis* para la posterior inducción de los explantes hasta la generación de callogénesis. Los resultados obtenidos en el experimento se presentaron por escrito.

Asimismo, la investigación documental fue sustentada por revistas científicas, artículos, libros y sitios web.

1.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Para ambas pruebas (Luz y Oscuridad) se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo trifactorial: BAP, 2,4-D y explantes.

Para la evaluación de los datos obtenidos a través de los diseños experimentales se aplicó el software estadístico Mstat-C, en cada evaluación las medidas de los diferentes tratamientos fueron comparados mediante el Análisis de varianza (ANOVA) con arreglo trifactorial.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 PHALAENOPSIS

Las *Phalaenopsis* pertenecen a la familia más extensa del reino de las plantas; las orquídeas (*Orchidaceae*). Muestran una forma de crecimiento monopodial (sin vástagos laterales) donde el tallo principal continúa creciendo a lo largo del año y únicamente produce un ramillete de flores por cada axila foliar (figura 2). Las hojas de las *Phalaenopsis* son carnosas. En estado silvestre, las *Phalaenopsis* pueden encontrarse por toda la región tropical de Asia. Se desarrollan bajo temperaturas diurnas que alcanzan los 28-35°C, temperaturas nocturnas de 20-24°C y con un grado de humedad relativa considerable. Las *Phalaenopsis* prefieren los entornos umbríos. Son capaces de absorber nutrientes a través de las raíces y de las hojas y, además como se observa en la figura 3, sus raíces también sirven para sujetar la planta (IMAC & Anthura, 2012).



Figura 2. Crecimiento monopodial de la parte caular de *Phalaenopsis*

Fuente: (IMAC & Anthura, 2012)



Figura 3. Raíces de *Phalaenopsis* que cumplen la función de sostén
Fuente: (IMAC & Anthura, 2012)

2.1.1. Etimología

Etimológicamente el nombre *Phalaenopsis* proviene del griego *phalaina* que significa “mariposa” y *opsis* que significa “parecido”, de acuerdo a la forma de la inflorescencia de algunas especies, que son parecidos a mariposas en vuelo (EcuRed, 2013).

2.1.2. Hábitat

Lo fundamental al cultivar cualquier orquídea es conocer sus hábitats naturales, incluidos la elevación, los cambios estacionales en la temperatura, las cantidades de lluvia y la intensidad de la luz. Además, es importante saber si crecen en el suelo, en los árboles o en las rocas. Ecológicamente las orquídeas pueden ocupar diferentes hábitats y pueden clasificarse como terrestres, epifitas y litofíticas (Lee y Yeung, 2018).

Las orquídeas son plantas con una altísima capacidad de adaptación al medio. Sus tallos pueden ser carnosos, delgados, espesos o gruesos, en función de las características ambientales y las necesidades de la orquídea. Las raíces de las que habitan en zonas propensas a incendios han desarrollado rizomas que

permanecen enterrados y esperan a brotar cuando se dan las condiciones favorables; los pseudobulbos de las que sobreviven en regiones muy secas pueden llegar a almacenar varios litros de agua (ASOCCOA, 2013).

Los hábitats naturales de las diferentes orquídeas pueden diferir ampliamente, pero la mayoría de las orquídeas tiene un rango de temperatura en el que pueden crecer. En general crecen bien entre 20 y 30°C durante el día. Una diferencia de 10-15 °C día/noche es favorable para el crecimiento de la mayoría de ellas.

La mayor parte crecen muy bien en un rango entre 60 y 80% de humedad con buena circulación de aire. Algunas especies nativas de los bosques nublados prefieren un poco más de humedad alrededor del 90%.

Las orquídeas generalmente se pueden agrupar por la cantidad de requisitos de luz que necesitan para crecer bien, es decir orquídeas de luz baja, inferior a 1500 fc (foot-candle) como *Cymbidium Chino*, luz media 2000-4000 fc como *Phalaenopsis* y luz alta 4000-6000 fc como *Papilionanthe teres* (Lee y Yeung, 2018).

2.1.3. Cultivo

Las orquídeas no requieren de cuidados especiales, aunque debemos tener en cuenta que cada género, fuera de su hábitat natural, puede presentar algunos problemas porque para germinar necesita la colaboración de unos hongos que le proporcionen nutrientes. En cualquier caso, debemos garantizarles un periodo de adaptación a las condiciones de su nuevo hogar.

Es importante respetar los períodos naturales de reposo de la planta, en invierno no situarla en lugares de temperatura muy elevada y no regarla con exceso. En primavera, aumentar el riego después de la salida de los primeros brotes florales. Es recomendable cambiar de maceta cada 2 años. Ésta debe ser de tamaño

medio, más bien profunda y estrecha. Debe utilizarse un sustrato especial para orquídeas (ASOCOA, 2013).

La administración de riego es importante en el cultivo de orquídeas, varios factores como la temperatura, las condiciones de luz, la humedad, los medios de cultivo, el tamaño de las macetas y las condiciones de crecimiento de las plantas, pueden afectar la administración del riego. Para orquídeas epifitas, especialmente con pseudobulbos, son amantes del aire y pueden soportar una leve sequedad de sus medios de cultivo, para las orquídeas terrestres, generalmente prefieren mantener el medio de cultivo ligeramente humedecido en todo momento. Las condiciones de alta temperatura, alta intensidad de luz y baja humedad relativa aumentan la evaporación del agua y la transpiración de la planta y es necesario aumentar la frecuencia de riego. A la inversa, en condiciones de baja temperatura, baja intensidad de luz y alta humedad relativa, la frecuencia de riego debe reducirse (Lee y Yeung, 2018).

2.2. CLASIFICACIÓN DE ORQUÍDEAS

A continuación, se presenta los géneros más representativos de la familia orchidaceae principalmente a nivel comercial.

2.2.1. Género *Cymbidium*

Son las orquídeas más cultivadas de todo el mundo gracias a su fácil cultivo y al gran número de híbridos, siendo Holanda y Francia los principales países productores.

Es una orquídea con pseudobulbo (órgano situado en la base de las hojas y constituido por tejidos acuíferos y con epidermis desprovista de estomas). Cada pseudobulbo produce de ocho a diez hojas angostas y largas y vigorosas raíces (Galeon, 2013).

Las flores de *Cymbidium* (ver figura 4) pueden ser de diferentes colores como el blanco, verde, crema, marrón, rosa, rojo con la excepción del azul y negro (EcuRed, 2012).



Figura 4. Flores del género *Cymbidium*
Fuente: (EcuRed, 2012)

2.2.2. Género *Cattleya*

Género designado en honor a W. Cattley de Barnet, uno de los primeros *amateurs* que creó una colección privada de orquídeas.

Las *Cattleyas* (figura 5) son un género de orquídeas epifitas con pseudobulbos (proporcionan una defensa contra la sequía periódica), hojas oblongas gruesas con nervadura central hundida, tallos delgados, flores elegantes agrupadas en dos, tres o más con diferentes colores: malva, rosa, rojo, blanco, amarillo y bicolors.



Figura 5. Orquídea del género *Cattleya*
 Fuente: (Elicrisio, 2018)

2.2.3. Género *Phalaenopsis*

Las *Phalaenopsis* cultivadas son híbridos derivados de una veintena de especies. Son orquídeas sin pseudobulbo, tienen raíces largas y carnosas, con hojas parecidas a la *Cattleya*. Al carecer de pseudobulbos los brotes emergen del rizoma central monopodial y las hojas tienen cierta capacidad de retención de agua.

Las hojas nuevas se desarrollan en el extremo superior del rizoma, corto, a medida que las más viejas se van marchitando, de modo que la planta siempre cuenta con cuatro o seis hojas (Flor de Planta, 2016).

Las hojas son de color verde oscuro, moteado o con manchas azul grisáceo. Las flores están agrupadas en racimos, que nacen en la axila de las hojas. Pueden ser de color: blanco, rosa, malva y amarillo (las flores pueden ser rayadas o manchadas)(Galeon, 2013).

2.3. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *PHALAENOPSIS*

Tabla 1. Clasificación botánica

Phylum:	<i>Euphyta</i>
División :	<i>Angiospermae</i> , es decir plantas abastecidas de flor y/o de fruto
Clase:	Monocotiledones, que quiere decir que son plantas que tienen una sola hoja embrionaria (un cotiledón)

Orden:	<i>Gynandreae</i>
Familia:	<i>Orchidaceae</i>
Tribu:	<i>Vandae</i>
Subtribu:	<i>Sarcanthinae</i>
Género:	<i>Phalaenopsis</i> con acerca 60 Especies

Fuente: Elaboración en base a (Elicriso, 2013)

La *Phalaenopsis*, más conocida es originaria de Indias orientales, de Filipinas, de Indonesia y de Australia.

Fue descubierta muchos años antes por G. E. Rumphius que la describió y la dibujó en el "*Herbarium Amboinense*" dándole el nombre de "*Angraecum albummajus*" publicado hasta 1750 unos 50 años después de su muerte.

Es una planta EPIFITA o litofilas (también crece sobre las rocas) y su estructura es monopodial.

Las *Phalaenopsis* tienen dos a seis hojas grandes, coriáceas y carnosas de color verde muy intenso y en muchas especies brillantes, dispuestas de manera muy cercana entre ellas. Pueden ser anchas de 10 cm y largas de 50 cm. Sus hojas son fundamentales ya que son el único órgano de almacenamiento del agua, no poseen en efecto pseudobulbos. Sus raíces son grandes, numerosas y con ellas se adhieren resistentemente al sustrato.

Las flores de la *Phalaenopsis* (figura 6) son llevadas por tallos simples o ramificados, de largo variable pero siempre sutil y rígido. Estas flores normalmente son grandes con sépalos casi iguales entre ellos, muy abiertos y llanos. Los pétalos generalmente son más grandes que los sépalos con un labelo trilobulado con los lóbulos laterales curvados hacia el interior (Elicriso, 2013).



Figura 6. Inflorescencia de *Phalaenopsis*
Fuente: (Freepik, 2019)

2.4. TEMPERATURAS Y VENTILACIÓN DE *PHALAENOPSIS*

Las *Phalaenopsis* requieren calor. Lo óptimo es tener temperaturas entre 23°C a 24°C como temperatura máxima y 16°C a 17°C como temperatura mínima. También pueden tolerar temperaturas más elevadas, hasta 35°C disponiendo de esta forma la humedad y ventilación, así mismo de una buena sombra.

La *Phalaenopsis* necesita luz abundante pero no dirigida. Es indudablemente, entre las muchas especies, su necesidad de una menor cantidad de luz, oscilando alrededor de 10.000 lux antes de la floración y unos 15.000 lux durante la floración. La falta de luz es la causa del retardo de floración de esta planta (ASOCOA, 2013).

2.5. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Desde hace más de 50 años se ha demostrado el avance en el desarrollo de la biotecnología vegetal, principalmente en la propagación de especies en laboratorios e invernaderos de diferentes países, que reditúa ganancias en miles

de millones. A este sistema de propagación se le conoce como micropropagación, que tiene como base principal el cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*, una de las más importantes aplicaciones para la producción masiva de plantas de interés económico o biológico (Salgado, 2014).

2.6. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de pared celular), células, tejidos, órganos, y plantas completas.

Mediante estas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microorganismos en un medio nutritivo aséptico (esteril) en condiciones ambientales controladas. También se la conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio (hay también otros materiales) (PortalFruticola, 2018).

Para lograr un cultivo de plantas, los tejidos y órganos (incluyendo semillas) deben ser esterilizados de manera superficial (asepsia) y se cultivan en soluciones nutritivas especiales, con frecuencia en medios solidificados con agar.

A estos medios de cultivo se le incorporan combinaciones adecuadas de auxinas y citocininas, dos de las principales fitohormonas del crecimiento vegetal. Con la aplicación de éstas y el cultivo controlado con parámetros como el pH, la luz y la temperatura, es posible reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de los tejidos o de las plantas *in vitro*.

Los cultivos *in vitro* se mantienen en cuartos o cámaras de crecimiento con luz artificial, en una temperatura promedio de aproximadamente 25°C, una intensidad de 25 a 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ seg con un fotoperiodo de 12 a 16 horas de luz. Aunque de manera comercial existen diversos medios de cultivo, éstos generalmente se componen de una mezcla de sales minerales (macro y microelementos), vitaminas

y sacarosa. La composición del medio depende de la especie vegetal y del tipo de cultivo que se requiere.

La elección del explante para iniciar un cultivo *in vitro* adecuado, constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos. Se ha demostrado que la edad fisiológica del explante es un factor importante en la formación de órganos, entre más joven, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*. Los explantes más usados para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas apicales y axilares de las plantas (Salgado, 2014).

2.7. MICROPROPAGACIÓN

El fisiólogo alemán Haberlandt dejó sentadas las bases para el desarrollo de la micropropagación en 1902 al enunciar la teoría de la totipotencialidad celular, enunció que cualquier célula vegetal lleva intrínseca la potencialidad de reproducir a partir de sí un individuo idéntico al que le dio origen.

En 1922 Knudson obtuvo la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas en medios sintéticos, Morel en 1960 sentó las bases de lo que hoy se conoce como clonación al lograr sanear meristemas de *Cymbidium* (Orquidáceas) contaminados con virus logrando a partir de los mismos la proliferación de masas de protocormos, los que pueden ser divididos y vueltos a cultivar para regenerar nuevas plantas (Namur, 2012).

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) es un sistema de propagación asexual, a partir de un segmento de una planta madre, que da como resultado la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se la usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Salgado, 2014).

Entre las ventajas de la micropropagación se pueden mencionar:

- Selección de los mejores genotipos, mejor adaptados y con mayor productividad.
- Uniformidad, todas las plantas son igualmente sanas y uniformes.
- Se evita utilizar material propagativo infectado.
- Economía de tiempo y de recursos. (Revista horticultivos, 2016).

La formación de plantas a partir de tejidos vegetativos como los tallos y las hojas, puede llevarse a cabo por dos diferentes maneras, de forma indirecta en tejidos sin diferenciación celular (callos) y de forma directa en los explantes cultivados como se puede observar en la figura 7 (Salgado, 2014).

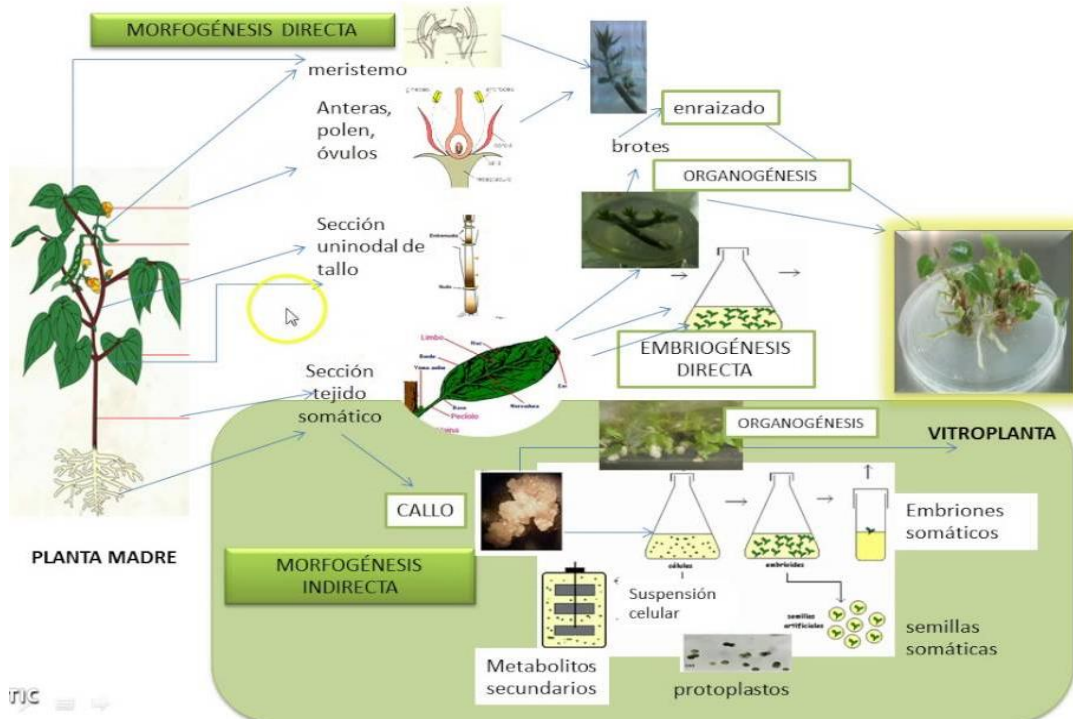


Figura 7. Métodos de micropropagación
Fuente: (NIDE ECIT, 2016)

Rotor (1949) fue el primero en cultivar secciones de los tallos de las flores de *Phalaenopsis* a través del método de micropropagación (Lee y Yeung, 2018). Cortó inflorescencias de *Phalaenopsis* en segmentos y las secciones nodales, las colocó cada una con un brote en el medio de cultivo KC (Knudson C) con la esperanza de que produciría plantas, los brotes se hincharon y aparecieron hojas después de 14-60 días, las raíces se produjeron después de que se formaron 2-3 hojas, solo 7 de 65 brotes no pudieron desarrollarse (Arditti y Krikorian, 1996).

2.8. CALLOGÉNESIS

Se le denomina tejido calloso a una masa amorfa generada por células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación. En condiciones naturales este tejido aparece como un mecanismo de cicatrización cuando se presentan heridas o en agallas inducidas por organismos fitopatógenos. La aparición natural de tejido calloso se da como consecuencia de un cambio en los niveles endógenos de fitohormonas, principalmente auxinas y citocininas.

Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular, pero por lo general son heterogéneos en su composición celular. La coloración de este tejido también varía, aun derivando de la misma especie (se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo). El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. (UNAD, 2009).

A través, de la biotecnología las plantas pueden ser producidas por medio del cultivo de callos a través de dos procesos: la organogénesis indirecta y embriogénesis indirecta (figura 8). La embriogénesis indirecta es la formación de un embrión vegetal a partir de tejidos de callo derivados de explantes, mientras que la organogénesis indirecta es la formación de órganos vegetales *in vitro* como raíces, tallos y otros, que también tienen que pasar por una etapa intermedia

llamada callo. Así, bajo ciertas condiciones nutritivas y hormonales, partes como órganos y tejidos (explantes) son capaces de diferenciar sus células y reiniciar su crecimiento por división celular, en condiciones *in vitro*. Gracias a estas técnicas de micropropagación vegetal podemos obtener una planta completa a partir de una parte de ella.

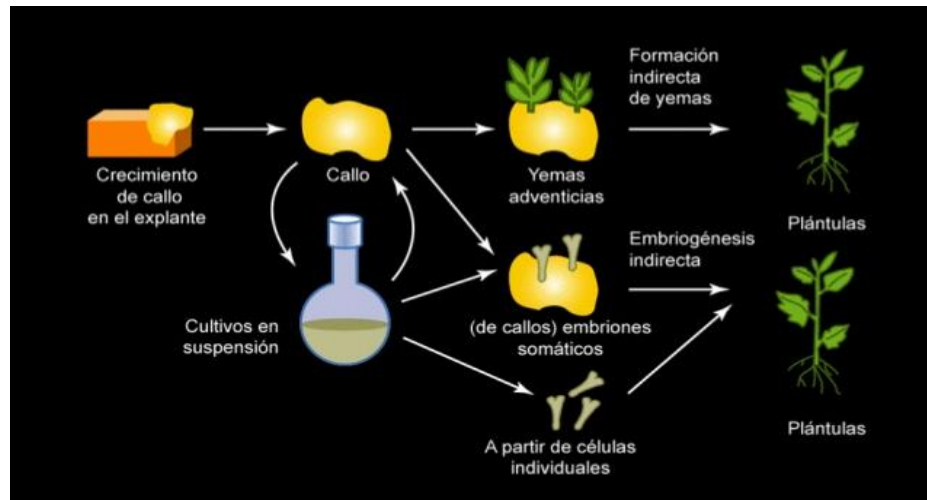


Figura 8. Morfogénesis indirecta

Fuente: (Agrobiotecnología, 2014)

Los callos se pueden multiplicar como tejido no organizado durante un periodo ilimitado a través de subcultivos periódicos en medio fresco o inducirlos a diferenciar estructuras organizadas (raíces, brotes, embriones) mediante la manipulación del medio de cultivo (Bhojwani & Dantu, 2013)

2.9. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Gottlieb Haberlandt (1854-1945), profesor de fisiología vegetal en Berlín, fue el primero en sugerir que las hormonas podrían desempeñar un papel importante en las células vegetales en medios de cultivo (Arditti y Krikorian, 1996).

Se entiende por hormonas vegetales o fitohormonas a aquellas sustancias que son sintetizadas en algún lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El termino sustancias reguladoras del crecimiento es más general y abarcan a las sustancias tanto de origen natural como las sintetizadas en

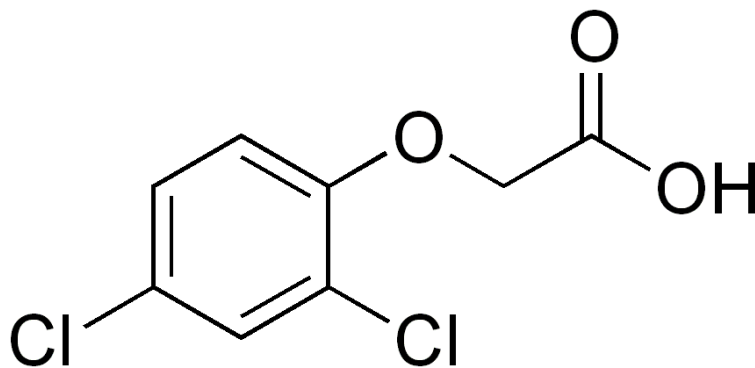
laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta.

Para lograr el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* juegan un papel primordial los reguladores de crecimiento que se deben añadir a los medios de cultivo; según los requerimientos de los diferentes medios y los objetivos que se persigan. Los reguladores de crecimiento más utilizados son las auxinas (AIA, ANA, 2,4-D) y las citocininas (KIN, BAP, Zeatina) generalmente en concentraciones que oscilan entre 0,1 – 10,0 mg/l (Bejarano, 2007).

2.9.1. Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Al ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, conocido por su nombre común como 2,4-D se le clasifica dentro del grupo de los herbicidas *fenoxi* o *fenoxiacéticos* o *clorofenólicos*. Otros compuestos pertenecientes a este grupo que han sido retirados o prohibidos por muchos países son el 2,4,5-T, el 2,4,5-TP o *Silvex*, el *MCPA* y otros herbicidas que aún se usan como el 2,4-DB, dicamba y el *MCPB* (Bejarano, 2007).

Estructura química:



Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

Fórmula química: $C_8H_6Cl_2O_3$

Al 2,4-D se le incluye dentro de los “herbicidas hormonales” porque actúa de modo parecido a la hormona natural auxina ó ácido indol-3-acético (AIA). Las plantas de

manera natural producen hormonas que son sustancias químicas que actúan de manera precisa y en cantidades muy pequeñas y su concentración es regulada por la propia planta; en el caso de la auxina es una hormona que regula el sano crecimiento y desarrollo vegetal, pero en su forma sintética y a una concentración mucho mayor provoca la muerte de la planta ya que no encuentra un mecanismo de control interno.

El 2,4-D es un herbicida sistémico debido a que se absorbe por las hojas o la raíz y se transporta por la savia a todo el cuerpo alcanzando los tejidos internos y partes no rociadas. Se acumula en las regiones de crecimiento e induce malformaciones que matan a la planta. Es considerado uno de los primeros herbicidas “selectivos” pues mata más a las plantas de hoja ancha y causa poco daño a los de hoja angosta; se ha usado para controlar malezas de hoja ancha, anuales y perennes, en su post-emergencia, en cultivos de cereales, caña de azúcar, pastizales, áreas industriales y en céspedes, jardines domésticos y campos de golf. El 2,4-D también se vende mezclado con fertilizante para el cuidado de jardines domésticos (Bejarano, 2007).

Actualmente, ha llegado a ser utilizado como regulador de crecimiento para cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ya que el 2,4-D, en pequeñas concentraciones, puede inducir la propagación de miles de plantas a partir de pequeños fragmentos de tejido vegetal (Rico y Ortega, 2017).

2.9.2. Bencil Amino Purina (Bap)

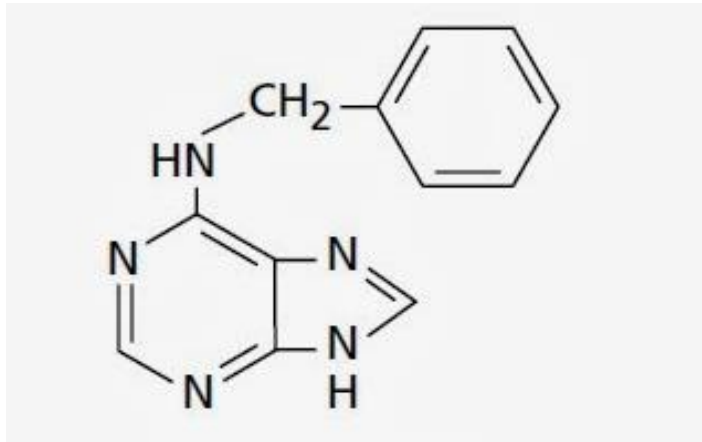
La 6-bencilaminopurina es un promotor del crecimiento de las plantas, es la primera citocinina sintética aplicada, utilizada principalmente como regulador del crecimiento de las plantas de amplio espectro. Puede usarse en agricultura, horticultura, para plantas en diferentes etapas, desde la germinación hasta la cosecha (Plant Hormones, 2009).

El nombre de citocininas se refiere a su papel en la división celular o citocinesis, las citocininas se sintetizan en la raíz y se transportan a través del xilema a otros

órganos de la planta, donde fomentan de manera general un estado más juvenil de desarrollo (Murray, 2006).

Entre los diferentes tipos de *citocininas* están la *Zeatina*, *Kinetina* y *Benziladenina* o Bencil Aminopurina (BAP).

Estructura química:



Bencil Aminopurina (BAP)

Formula química: $C_{12} H_{11} N_5$

Entre los procesos en los que las citoquininas están implicadas cabe señalar: la división celular, la proliferación de yemas axilares (ruptura de la dominancia apical), la neoformación de órganos in vitro, la senescencia foliar, el desarrollo de los cloroplastos y la floración (Azcon-Bieto y Talon, 2013).

Las citocininas en sí mismas presentan pocos efectos en las células de cultivo, pero cuando se aplican junto con la auxina, las células cultivadas comienzan a dividirse y diferenciarse. Tales efectos dependen en gran medida de la concentración de reguladores de crecimiento (Murray, 2006).

2.10. IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las orquídeas son un campo fascinante para la investigación botánica, para la colección y también para la industria de la floricultura que encuentra en este grupo un terreno propicio para su producción y comercio. A tal punto que, dentro de los

Estados Unidos de Norteamérica, se encuentran en el segundo puesto como flores vendidas con el fin de ser plantas con flor en sus macetas.

Según Jiménez (2018), las exportaciones de orquídeas crecieron en un 14,1% y su principal destino fue Estados Unidos.

Recuérdese que este grupo de plantas son las que se terminan de producir y luego se mantienen en el mismo envase o contenedor por toda la cadena de comercialización y luego en los ambientes donde se los vaya a lucir. Las *Phalaenopsis* son unas plantas de orquídeas muy apropiadas para interiores. Igualmente, sus flores cortadas son un recurso para realizar arreglos florales.

La industria de la floricultura toma en cuenta este fenómeno de las orquídeas, su exótica belleza y el deleite de tener en los hogares y en todo evento, impulsa a la industria a buscar e incorporar nuevas especies para satisfacer esta gran demanda de flores y plantas.

Varios centros de producción realizan investigación y cruzamientos para la obtención de nuevas variedades, híbridos intergenéricos y novedades vistosas. Institutos y universidades dedican fondos y equipos para estudios básicos y aplicados (Floricultura, 2013).

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados por personal especializado en medios específicos (Reguladores de crecimiento, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones controladas (asepsia, temperatura, humedad y luz). Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción.

A nivel mundial, diversas instituciones educativas y de investigación han implementado un alto número de protocolos de micropropagación de plantas de interés agrícola, forestal, medicinal y en riesgo de extinción (Salgado, 2014).

Dentro de los protocolos que se han realizado sobre el cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*, podemos mencionar que destacan algunos, como los trabajos realizados por Park., Y. *et al.* 1996, Chen *et al.*, 1998, Ishii & Takamura, 1998 y Chen & Chang, 2006.

El primer protocolo que se realizó de la orquídea *Phalaenopsis* en nuestra ciudad de La Paz fue el 2007, en la Unidad de Biotecnología Vegetal del campus universitario perteneciente a la UMSA que tiene como título Micropropagación de orquídeas del genero *Phalaenopsis* a partir de yemas florales.

Los estudios de los callos como material vegetal de partida permiten conocer, a partir de las especies estudiadas, la información que las mismas ofrecen de su composición celular específica, crecimiento, morfología, características y actividad, lo cual puede ser empleado en futuros estudios ofreciendo posibles vías y soluciones que permitan la protección, conservación, y estudio de la biodiversidad (Gonzales *et al.*, 2011).

Por lo expuesto, se consideró importante realizar este trabajo de investigación, ya que los trabajos que se han ido realizando, así como el presente, sirven como aportes investigativos y si la industria o persona que se dedique a la producción de orquídeas, las aprovecha, tendrá mejores resultados en su desarrollo.

3. METODOLOGÍA

3.1. LOCALIZACIÓN

El vivero “Al Natural”, ubicado en el barrio de Auquisamaña, Calle Tajibos Número 1, proveyó el material vegetal inicial con el que se trabajó en la presente investigación.

Posteriormente la investigación presenta como localización (referencia geográfica) a la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología dependiente de la Carrera de Biología, de la Universidad Mayor de San Andrés, Campus Universitario, calle 27 de Cota Cota, como se puede observar en la figura 9.



Figura 9. Localización de la investigación

Fuente: Elaboración en base a (Us. Dept. of State, Google, 2019)

3.2. MATERIALES

El inicio de la investigación de la inducción a callogénesis para la micropropagación de *Phalaenopsis* se define en el objeto de estudio con sus características y los elementos de laboratorio.

3.2.1. Material Vegetal

Se utilizaron yemas florales de *Phalaenopsis*, las cuales se obtuvieron a partir de plantas mantenidas en condiciones de invernadero del vivero "Al Natural", este material vegetal (yemas florales, cuya anatomía está presente en la figura 10) se obtuvo a partir de un *stock* de plantas madres de la variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps. taisuko red lip.*, importadas desde Costa Rica.

Se siguió un tratamiento de desinfección de un protocolo ya establecido (ver tabla 4) en la Unidad de Biotecnología Vegetal para la introducción *in vitro* de estas yemas florales, una vez introducidas se multiplicaron *in vitro* y se seleccionaron los explantes hojas y tallos que posteriormente fueron inducidas a callogénesis.

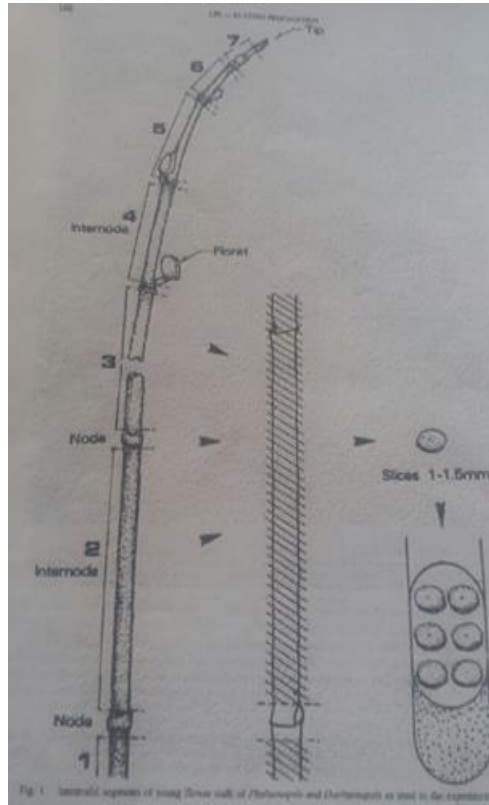


Figura 10. Yemas florales de *Phalaenopsis*
Fuente: (Chin-Chi, 1986)

3.2.2. Elementos de Laboratorio

Los elementos de laboratorio se describen en ANEXO 1.

3.3. AMBIENTES DEL EXPERIMENTO

Se definió realizar el experimento en ambientes con la variación controlada de la presencia de Luz y Oscuridad, como se puede observar en las figuras 6a y 6b respectivamente.

a) Bajo luz



b) Bajo oscuridad



Figura 11. Condición lumínica

3.4. NÚMERO DE MUESTRAS

Para la experimentación se utilizaron como explantes hojas y tallos de *Phalaenopsis* como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 2. Explantes

Explante	Cantidad en luz	Cantidad en oscuridad
Tallos	80 unidades	80 unidades
Hojas	80 unidades	80 unidades

3.5. CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO

Se aplicó diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP expresados en [mg/l]. De tal manera que con estas combinaciones de reguladores de crecimiento se pueda obtener la generación de callos, aplicando en los dos tipos de explantes: segmentos de hojas y tallos. Para ambos se utilizaron las mismas variaciones de Reguladores de Crecimiento, como muestra la tabla siguiente.

Tabla 3. Medios de cultivo con las combinaciones de Reguladores de Crecimiento definidas

Componentes	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
2,4-D mg/l	0,5	0,5	1	1	5	5	10	10
BAP mg/l	0,1	1	0,1	1	0,1	1	0,1	1

3.6. PROCEDIMIENTO

El método utilizado fue el siguiente:

3.6.1. Tratamiento de Desinfección

A partir de tallos florales, yemas de *Phalaenopsis* (figura 9) fueron aisladas y desinfectadas con el tratamiento que se describe en la tabla siguiente:

Tabla 4. Tratamiento de desinfección.

Etapas de desinfección	Tiempo
Alcohol al 70% (fuera de la cámara)	1 min
Lavado con agua estéril (fuera de la cámara)	1 min
NaOCl 3% (fuera de la cámara)	30 min
Lavado con agua estéril (dentro de la cámara)	1 min
NaOCl 2% (dentro de la cámara)	30 min
Lavado con agua estéril (en cámara)	3 lavados 1 min cada uno

Una vez desinfectadas las yemas se procedió a la introducción y posterior multiplicación *in vitro*, para esto se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) (ver Anexo 2), con agua de coco al 20%, phytigel 2 g/l y el Regulador de Crecimiento Bencil aminopurina (BAP) a una concentración de 7.5 mg/l. El pH del medio se ajustó a 5,4 y se esterilizó en una autoclave a 120°C, 105 KPa por 15 minutos, las yemas desinfectadas fueron incubadas en tubos dentro de la sala de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

En la figura 11 (a) y (b) observamos hojas y tallos obtenidas mediante cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*, aproximadamente a los 3 meses de haber sido introducidas a partir de yemas florales, estos explantes hojas y escapo floral (tallos) fueron utilizados como material de inicio para la obtención de callos.

a) Hojas de *Phalaenopsis*



b) Tallos de *Phalaenopsis*



Figura 12. *Phalaenopsis in vitro*

Fuente: Figura (b) (López, 2007)

3.6.2. Inicio de la Inducción a Callogénesis

A partir de plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* provenientes de yemas de tallo floral, se seleccionaron hojas (parte apical) y tallos, procediendo al corte de aproximadamente 1 cm y colocadas con la cara adaxial por encima de la superficie del medio, en el caso de las hojas, y cortes de aproximadamente 0,5 cm de los escapos florales (tallos), ambos explantes fueron sembrados en tubos que contenían el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de Reguladores de Crecimiento (ver cuadro 3), para inducir la formación de callos.

El pH del medio fue ajustado a 5,4 con soluciones de NaOH 1N o HCl 1N, antes del agregado de 2 g/l de *Phytigel*, seguido de esterilización en autoclave a 120 °C, 105 KPa por 15 minutos. Los procedimientos para ambiente luz y oscuridad se llevaron a cabo bajo condiciones ambientales similares proveídas por la sala de crecimiento y la manera de que los explantes estén en condiciones de oscuridad fue llevándolos a un armario (ver figura 6). Dentro de la sala de crecimiento que presentó una temperatura promedio aproximada de 23°C, los explantes cultivados bajo condiciones luz fueron incubados, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y una intensidad lumínica de 27 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ seg y los explantes cultivados bajo condiciones de oscuridad en la misma ubicación fueron colocados en un armario donde no se permitió el paso de la luz.

Se desarrolló el proceso de inducción a callogénesis *in vitro* de *Phalaenopsis* a partir de diferentes explantes (secciones de hojas y tallos) y la variación de Reguladores de Crecimiento (2,4-D y BAP), como una base para la regeneración de vitroplantas.

3.6.2.1. Fases

El desarrollo experimental presentó las siguientes fases:

Tabla 5. Descripción de fases

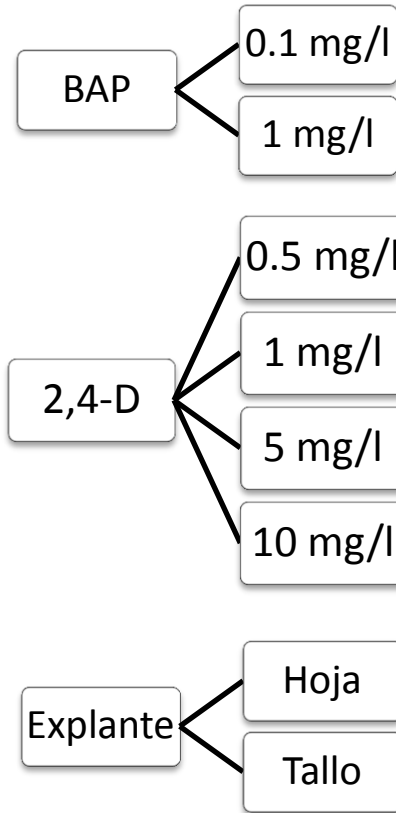
Fases	Descripción	Procesos
Fase Inicial. Selección de yemas a partir de tallos florales de <i>Phalaenopsis</i>	Selección de las plantas madre cultivadas en condiciones controladas con humedad de 70% a 90%, temperatura de 12°C a 20°C, condiciones de sombra 70%. Selección de plantas que proporcionaron yemas.	Juvenilidad: plantas madre no más de 3 años de edad. Sanidad: no estar infectadas por bacterias, hongos o virus. Estado fenológico: que culminaron la floración y con tallos florales que presentaban yemas durmientes
Segunda Fase: Iniciación de los cultivos (Establecimiento <i>in vitro</i>).	Explantes sometidos a lavado con agua potable y detergente líquido. Proceso de aislamiento de las yemas. Yemas sometidas al proceso de desinfección. Cada tratamiento incluyó la aplicación de dos desinfecciones, las cuales variaron en cuanto a la concentración del desinfectante.	Desinfección con etanol al 70 %, durante 1 minuto. Enjuague con agua estéril. Aplicación de tratamientos desinfectantes iniciales. Enjuague dentro de cámara de flujo laminar. Aplicación de tratamientos desinfectantes finales. Tres enjuagues con agua destilada estéril.
Tercera Fase: Inducción a callogénesis	De plántulas introducidas <i>in vitro</i> se seccionaron tallos y hojas para su inducción a callogénesis	Experimentación <ul style="list-style-type: none"> ➤ Luz ➤ Oscuridad ➤ Concentraciones de 2,4-D y BAP
Cuarta Fase: Análisis estadístico de la información obtenida	Registro de las observaciones y para su evaluación se aplicó el software estadístico Mstat-c ⁶	- Formación de Callogénesis - Medición de Peso de los callos - Cantidad de callos - Supervivencia de hojas y tallos
Fase final: Resultados y conclusiones.	En base a las observaciones se interpreta los resultados y se presentan conclusiones.	De acuerdo a cuadros y figuras estadísticas.

a) DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño utilizado corresponde al diseño de bloques al azar con arreglo trifactorial, donde el Factor A está dado por la concentración de BAP con dos niveles 0.1 y 1 mg/l; el factor B corresponde a la concentración de 2,4-D con cuatro niveles 0.5, 1, 5, 10 mg/l; y finalmente el factor C está dado por el tipo de explante de hojas y tallos. Este diseño se lo manejó por separado, bajo dos condiciones de luz (luz y oscuridad).

Entonces se describe de la forma siguiente:

⁶Mstat-C: Programa informático de modelos matemáticos y estadísticos (Russ, 2010)



Este diseño experimental de bloques al azar con arreglo trifactorial correspondería a una combinación de 2X4X2 haciendo un total de 16 tratamientos, en dos condiciones lumínicas, con 10 repeticiones por tratamiento, haciendo un total de 160 unidades experimentales para cada condición de luz (luz y oscuridad). Entonces, el diseño se puede representar en la tabla 6 de la siguiente manera:

Tabla 6. Diseño experimental con respectivas repeticiones

2,4-D [mg/l]	BAP [mg/l]			
	0.1		1	
	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo
0.5	10	10	10	10
1	10	10	10	10
5	10	10	10	10
10	10	10	10	10

Por tanto, el diseño responde al siguiente modelo lineal matemático:

$$X_{ijklm} = \mu_i + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + \beta\gamma_{jk} + \beta\delta_{jl} + \gamma\delta_{kl} + \beta\gamma\delta_{jkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

De donde se define las variables de la forma siguiente:

X : Valor observado. Variable dependiente que explica el comportamiento del experimento.

μ : La media esperada.

α : bloque efecto de la repetición

β : Factor BAP

γ : Factor 2,4-D

δ : Factor Explante (tallo y hoja)

$\beta\gamma$: Interacción Factores BAP y 2,4-D

$\beta\delta$: Interacción Factores BAP y Explante

$\gamma\delta$: Interacción Factores 2,4-D y Explante

$\beta\gamma\delta$: Interacción Factores BAP, 2,4 -D y Explante

ε_{ijklm} : Error experimental

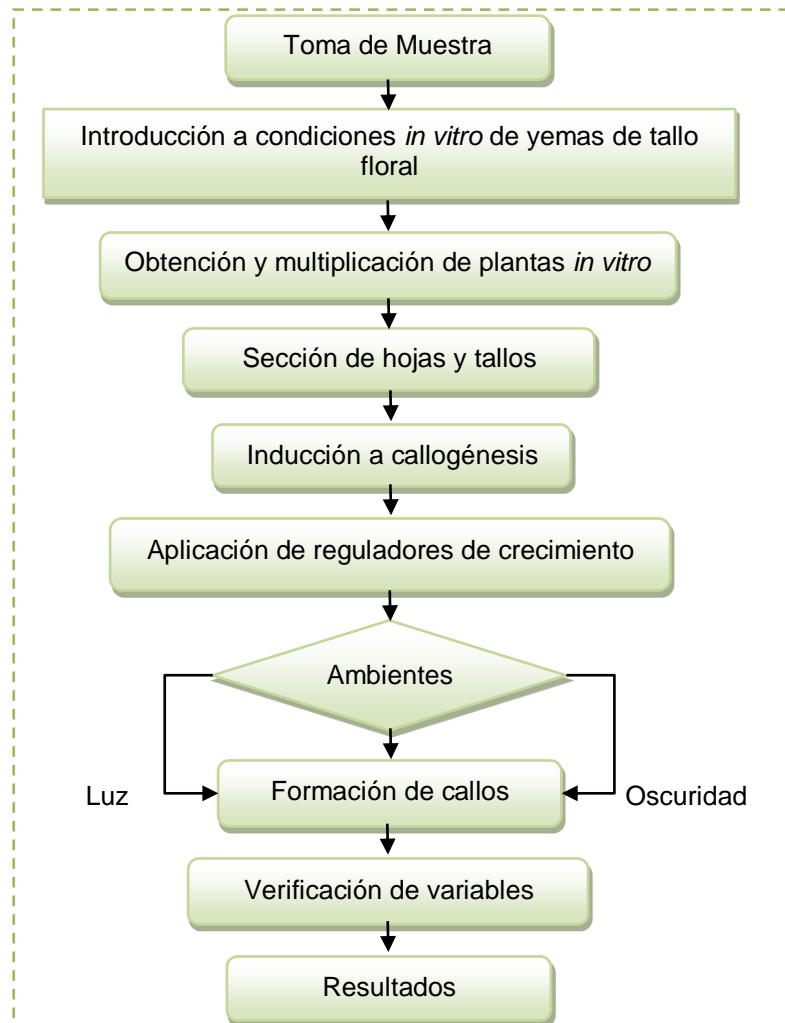
Entonces, después de haber definido el modelo, se realizó el análisis de respuesta de los resultados. Para cada variable de respuesta, la evaluación se realizó de acuerdo al análisis de varianza. Cuando los factores y las interacciones mostraron diferencias estadísticas significativas, las variables fueron evaluadas por el análisis de medias de Duncan con nivel de confianza $\alpha = 0,05$.

Las variables que se evaluaron son las siguientes:

- Formación de callos: presencia de callos en los explantes.
- Inicio de formación de callos: número de días a partir de los cuales se observó la generación de estructuras callosas en los explantes.
- Peso: peso fresco de los callos.
- Cantidad: número de callos generados
- Supervivencia: explantes que llegaron a sobrevivir

Entonces el flujo experimental se desarrolló como se observa en la siguiente figura:

Figura 13. Esquema del desarrollo experimental



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. FORMACIÓN DE CALLOS EN PRESENCIA DE LUZ

A continuación, se describe cada una de las variables evaluadas en el proceso de callogénesis en hojas y escapos florales (tallos), en presencia de luz. Así el ANEXO 3, presenta el entorno visual del software estadístico *Mstat-C* con el que se evaluó los datos obtenidos para la generación de resultados estadísticos para su análisis.

4.1.1. Formación de callos

El análisis de varianza que se observa en la tabla 7, muestra los resultados estadísticos obtenidos para la variable formación de callos, de los componentes Factor A (BAP), Factor B (2,4-D), AB (Interacción entre Factores A y B), Factor C (Explante), AC (Interacción entre Factores A y C), BC (Interacción entre Factores B y C) y ABC (Interacción entre Factores A, B y C) con sus respectivos grados de libertad, suma de cuadrados, media cuadrática y en función a la distribución de Fisher (F) calculada, la probabilidad de la diferencia.

De esta manera, a través del análisis de varianza se puede deducir que solamente se observó la presencia de diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en la interacción entre 2,4-D y el explante, Asimismo, se observó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) solo para el factor B (explante), mientras que el resto de los factores e interacciones no mostraron la presencia de diferencias estadísticas.

Asimismo, es importante informar que, para normalizar los datos, con el fin de reducir el coeficiente de variación, se realizó la transformación estadística de $\sqrt{X+1}$.

Tabla 7. Análisis de Varianza – Formación de Callos

Fuente	GL	S.C	M.C	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.101	0.011	0.6818	
Factor A (BAP)	1	0.017	0.017	1.0227	0.3137ns
Factor B (2,4-D)	3	0.080	0.027	1.6193	0.1878ns
AB	3	0.084	0.028	1.7045	0.1691ns
Factor C (Explante)	1	0.067	0.067	4.0909	0.0451*
AC	1	0.004	0.004	0.2557	ns
BC	3	0.504	0.168	10.2273	0.0000**
ABC	3	0.113	0.038	2.3011	0.0800ns
Error	135	2.219	0.016		

C.V.12.14%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

Los explantes mostraron diferencias estadísticas, en este sentido, se observó que a través del uso de hojas se logró obtener una mayor formación de callos en relación a los tallos, un 18,8% en contra del 8,7% respectivamente, como se puede observar en la tabla 8.

Tabla 8. Formación de callos en explantes

EXPLANTE	FORMACIÓN %
HOJA	18.80
TALLO	8.70

Al respecto Vallejo (2008), menciona que la regeneración de tejido callogénico depende mucho del tipo de material vegetativo usado. Por su parte Ruiz (2000), señala que otros factores importantes para la formación de callo, son el genotipo, el medio nutritivo, factores físicos de crecimiento como luz y temperatura. Por lo que, resultarían ser varias las causas, que pueden influir en la respuesta callogénica de los explantes.

En la figura 14 (a y b), observamos la formación de callos que se dio en los explantes hoja y tallo respectivamente.

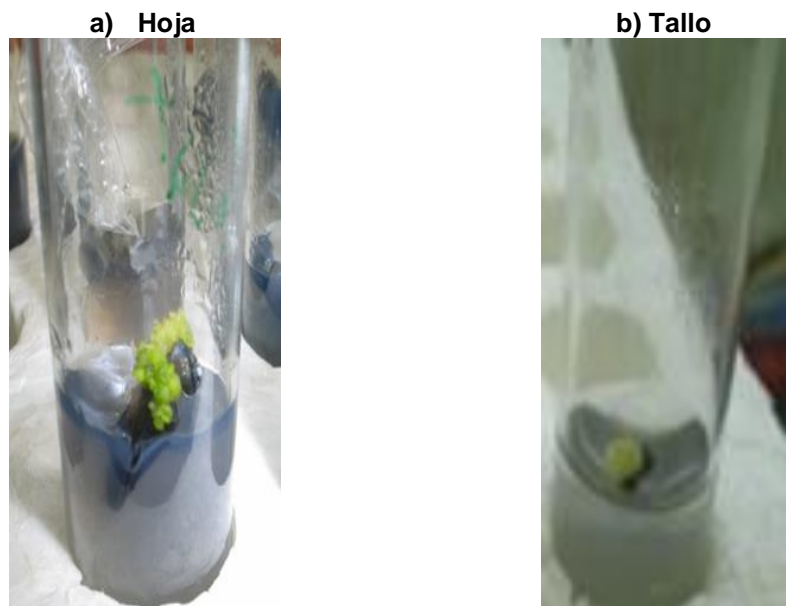


Figura 14. Formación de callos en los explantes

Como se observa en la figura 13 (a), hubo formación de callos en el explante hoja, en la zona donde se realizó el corte, también observamos el agrupamiento de callos de color verde claro, los cuales tienen una consistencia friable. En la figura 13 (b), observamos que los callos que se obtuvieron en tallos, cubrieron gran parte del explante, estos fueron de color verde claro al igual que el de las hojas, pero de consistencia compacta.

De tal modo se determinó, que los callos obtenidos en los explantes (hojas y tallos) no fueron cualitativa ni cuantitativamente iguales, según Espinosa *et al.* (2012), señalan que la zona de formación del callo, su color y textura dependen del tipo de explante utilizado. Por lo que, podría ser posible que la cantidad y peso (que se verá más adelante) este también relacionado con el tipo de explante.

Como el análisis de varianza de la tabla 8, mostró la presencia de diferencias altamente significativas para la interacción entre los explantes y la concentración de 2,4-D, se realizó el test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0,05$

como se puede observar en la tabla 9, que refleja que el 2,4-D tuvo efecto en ambos explantes, a una concentración de 0,5 [mg/l] presentó mayor formación de callos en los tallos mostrando un 30% de efectividad. Mientras que, en las hojas las mejores concentraciones para la formación de callos fueron de 5 y 10 [mg/l] de 2,4-D mostrando 40% y 30% de formación de callos respectivamente.

Tabla 9. Formación de callos en la interacción 2,4-D con explantes

2,4-D [mg/l]	EXPLANTE	FORMACION %	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	HOJAS	0	B
0.5	TALLOS	30	A
1	HOJAS	5	B
1	TALLOS	5	B
5	HOJAS	40	A
5	TALLOS	0	B
10	HOJAS	30	A
10	TALLOS	0	B

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Según Córdoba *et al.* (2014), la inducción de la callogénesis se atribuye a los múltiples mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento empleados. El modelo quimiosmótico explica el transporte polar de las auxinas, en este proceso las bombas de H⁺ mantienen una gradiente electroquímica entre el citoplasma y la pared celular. Para que las auxinas induzcan el crecimiento celular estas deben unirse a receptores externos e internos, los que a la vez inducen la expresión de genes que codifican factores proteicos que aumentan la plasticidad y ablandan la pared celular. Esto tiene como efecto la dilatación de la célula, debido a la presión del agua dentro de su vacuola (presión de turgencia), de este modo continúa agrandándose hasta que la pared opone resistencia (Azcón-Bieto y Talón 2008).

Por otro lado, Lee Y.I. y Lee N. (2003), indican que en la orquídea *Cyrtoperium*, el 2,4-D fue esencial para que pueda darse la formación de callo. Por su parte, Espinosa *et al.* (2012), explican que los resultados de su investigación, demostraron que el empleo de explantes de hojas, pecíolos y tallos en el

cultivo *in vitro* de Morera permitió altos valores de formación de callos, y que el 2,4-D en el medio de cultivo resultó imprescindible. Lo que concuerda con el presente experimento ya que también demuestra que es fundamental el uso de esta auxina para la formación de callos.

También se puede identificar (Ver Cuadro N°9) la respuesta diferencial que se da entre tallos y hojas ya que los tallos necesitan mínimas concentraciones de 2,4-D (0.5 [mg/l]) para que se dé el proceso de callogénesis, mientras que en hojas requieren mayores concentraciones de este regulador de crecimiento (5 y 10 [mg/l]) para obtener el mismo proceso, mostrándose así claramente la acción de la interacción de estos dos factores.

Probablemente los tallos, tengan niveles endógenos de auxina más altos que las hojas, por lo que no necesitan concentraciones exógenas elevadas de estos reguladores de crecimiento a diferencia de las hojas. Al respecto González, Morejón y Portilla (2007), plantearon que las diferencias en la respuesta al cultivo *in vitro*, al emplear diferentes tipos de explantes, pueden deberse a variaciones en el contenido endógeno de las hormonas y a sus características anatómicas.

4.1.2. Inicio de formación de callos

En la tabla 10, se puede observar que el análisis de varianza muestra diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), para interacción BC (2,4-D, explante). Asimismo, la interacción ABC (BAP, 2,4-D, explante) presenta diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Tabla 10. Análisis de Varianza - Inicio de formación de callos

Fuente	G.L.	S.C.	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	8102.725	900.303	0.5952	
Factor A (BAP)	1	2755.600	2755.600	1.8216	0.1794ns
Factor B (2,4-D)	3	5978.450	1992.817	1.3174	0.2714ns
AB	3	10001.250	3333.750	2.2038	0.0905ns
Factor C (Explante)	1	3150.625	3150.625	2.0828	0.1513ns
AC	1	235.225	235.225	0.1555	ns
BC	3	47037.325	15679.108	10.3650	0.0000**
ABC	3	14280.525	4760.175	3.1468	0.0273*

Error	135	295755.600	1512.695
--------------	-----	------------	----------

C.V.23.85%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

Para medir esta variable se puso como tiempo máximo 180 días, para que pueda lograrse dar un inicio de formación.

Como se observa en la tabla 11, se ha dado de manera más rápida el inicio de formación de callos en los tallos a los 137 días cuando se aplicó una concentración 0.5 [mg/l] de 2,4-D. Mientras que, los más repentinos inicios de la formación de callos en las hojas fueron aproximadamente en 136 y 143 días aplicando 5 [mg/l] y 10 [mg/l] de concentración 2,4-D, respectivamente. En este sentido, se puede afirmar que a una menor concentración de 2,4-D (0.5 [mg/l]) se da un inicio de formación en un tiempo más corto en los tallos, este tiempo fue similar al inicio de formación de hojas, pero requirió mayores concentraciones de 2,4-D (5 y 10 [mg/l]).

Tabla 11. Efecto del 2,4-D en los explantes al inicio de formación de callos

2,4-D [mg/l]	EXPLANTE	INICIO FORMACIÓN (Días)	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	HOJAS	180	A
0.5	TALLOS	137	B
1	HOJAS	173	A
1	TALLOS	172	A
5	HOJAS	136	B
5	TALLOS	180	A
10	HOJAS	143	B
10	TALLOS	180	A

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Las concentraciones de 2,4-D, para que se dé un inicio de formación más temprana de callos, resultaron ser diferentes en hojas y tallos, ya que este depende de un balance adecuado de auxina (exógena/endógena) dependiendo del tipo de explante, así como lo menciona Ruiz (2000) que para iniciar la

formación de callos a partir de un explante, es necesario agregar reguladores exógenos al medio de cultivo, el regulador exógeno a aplicar dependerá del genotipo del explante y de su contenido de hormonas endógenas.

Caraballo de la Peña (2015), reporto que en el experimento que realizó con hojas y tallos de Morera, observó la aparición de callos en tallos a los pocos días de inducirlos utilizando concentraciones de 0,5 y 1[mg/l] de 2,4-D, en hojas al utilizar 1 [mg/l] de 2,4-D también observó callos pero después de 37 días, con lo que concluye que la formación de callos es más rápida para las secciones nodales que para las hojas de la especie.

En la tabla N° 12, presenta el efecto en la triple interacción, es decir combinación de las concentraciones BAP y 2,4-D aplicados en los explantes (hojas y tallos), para que se dé un mejor inicio de formación de callos.

Tabla 12. Efecto de la combinación BAP y 2,4-D en los explantes al inicio de formación de callos

BAP [mg/l]	2,4-D [mg/l]	EXPLANTE	INICIO FORMACIÓN (Días)	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.1	0.5	HOJA	180.00	A
0.1	0.5	TALLO	165.70	AB
0.1	1	HOJA	180.00	A
0.1	1	TALLO	165.70	AB
0.1	5	HOJA	154.40	ABC
0.1	5	TALLO	180.00	A
0.1	10	HOJA	131.00	BCD
0.1	10	TALLO	180.00	A
1	0.5	HOJA	180.00	A
1	0.5	TALLO	108.00	D
1	1	HOJA	167.70	AB
1	1	TALLO	180.00	A
1	5	HOJA	119.10	CD
1	5	TALLO	180.00	A
1	10	HOJA	155.90	ABC
1	10	TALLO	180.00	A

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Las letras D representan un menor tiempo de inicio de formación, hasta llegar sucesivamente a las letras A que representan el tiempo máximo que se esperó para que se logre dar un inicio de formación.

Por tanto, en la interacción de la combinación de concentraciones (Ver Cuadro 12) se describe de la siguiente forma:

- El más rápido inicio de formación de callos en tallos, se dio a los 108 días, cuando se aplicó las concentraciones de 1 [mg/l] de BAP y 0,5 [mg/l] de 2,4-D. También se observó el inicio de formación de callos a los 165,7 días cuando las concentraciones aplicadas fueron de 0,1 [mg/l] de BAP con 0,5 [mg/l] de 2,4-D y 0,1 [mg/l] de BAP con 1 [mg/l] de 2,4-D.
- El inicio de formación de callos en hojas, con mejores resultados se dio a los 119,10 días, a la interacción de concentraciones de 1 [mg/l] de BAP y 5 [mg/l] de 2,4-D. También pudo observarse el inicio de formación en 131 días al aplicar concentraciones de 0,1 [mg/l] de BAP con 10 [mg/l] de 2,4-D, en 154,40 días al aplicar concentraciones de 0,1 [mg/l] con 5 [mg/l], en 155,90 días cuando se aplicó 1 [mg/l] de BAP y 10 [mg/l] de 2,4-D y en 167,70 días cuando se aplicó 1 [mg/l] de BAP con 1 [mg/l] de 2,4-D.

Jiménez y Guevara (1996), reportaron que obtuvieron una respuesta a los 90 días, después de propagar *in vitro* secciones de ejes florales de *Phalaenopsis* en una combinación de 0,5 [mg/l] de 2,4-D, 3 [mg/l] de BAP y 0,8 [mg/l] de Kinetina.

Ishii y Takamura (1998), señalan que al probar diferentes combinaciones de 2,4-D y BAP, las concentraciones de 0,1 [mg/l] de 2,4-D y 0,01 [mg/l] de BAP, fueron las que registraron segmentos de hojas formando callos, después de 48 días de cultivo de *Phalaenopsis* Richard Shaffer.

Por su parte, Rosas (2018), observo PLBs (Cuerpos Similares a Protocormos) a los 28 días, al inducirlas de hojas de *Phalaenopsis* sp. en una combinación de 5 [mg/l] de 2,4-D y 2 [mg/l] de BAP.

Estos autores, obtuvieron una respuesta *in vitro* de *Phalaenopsis*, en un tiempo más corto y en combinaciones de 2,4-D y BAP no exactamente iguales que en el presente experimento. Por lo que el último autor mencionado, también indica que la concentración y combinación de reguladores de crecimiento y el tipo de tejido vegetal afectan de manera diferente a cada especie o híbrido de *Phalaenopsis*.

En general, se pudo observar que el 2,4-D y el BAP en determinadas concentraciones actúan de manera sinérgica, para que se pueda dar un inicio de formación más temprana en ambos explantes.

4.1.3. Peso fresco de callos

La tabla 13, presenta el análisis de varianza en el cual el factor B mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$), esto implica que la concentración de 2,4-D ha influido en el peso de los callos. En el caso del Factor C, presentó diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) de esta manera el tipo de explante influye en el peso de los callos. Asimismo, la interacción BC también presentó diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), lo que nos muestra que, la aplicación de 2,4-D en función al tipo de explante (tallos y hojas) tiene influencia en el peso de los callos.

Con el fin de reducir el coeficiente de variación se realizó la transformación estadística de $\sqrt[4]{X+1}$.

Tabla 13. Análisis de Varianza – Peso de callos

Fuente	GL	S.C	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.287	0.032	1.1658	0.3219ns
Factor A (BAP)	1	0.062	0.062	2.2653	0.1346ns
Factor B (2,4-D)	3	0.245	0.082	2.9837	0.0336*
AB	3	0.121	0.040	1.4718	0.2250ns
Factor C (Explante)	1	0.205	0.205	7.4959	0.0070**
AC	1	0.004	0.004	0.1498	ns

BC	3	0.769	0.256	9.3581	0.0000**
ABC	3	0.194	0.065	2.3622	0.0741ns
Error	135	3.696	0.027		

C.V. 11.19%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

En la figura 15, se puede observar que la utilización de los diferentes explantes (hojas y tallos) influyeron en el peso fresco de los callos, de esta manera en hojas se obtuvo un peso de 1,5 [g]. Mientras que, en tallos se obtuvo un peso en 0,35 [g] que es un peso mucho menor que el de las hojas.

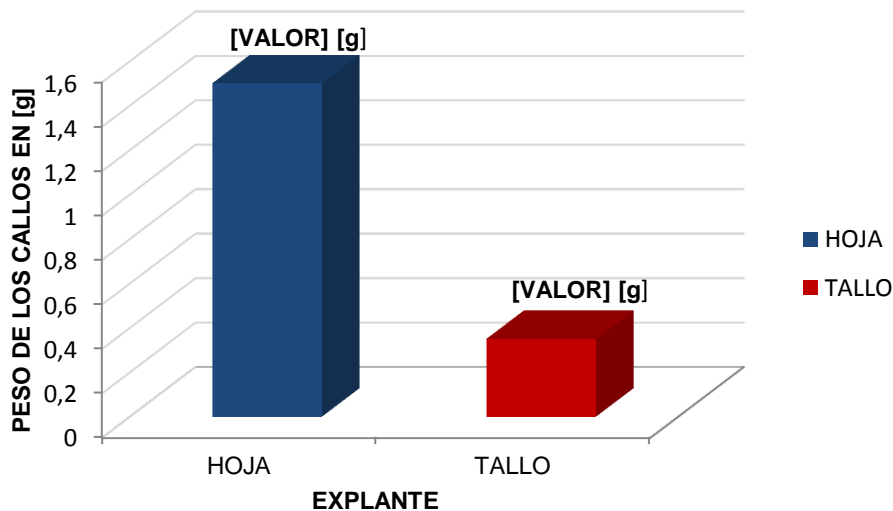


Figura 15. Efecto de los explantes en el peso de los callos

Como se mencionó con anterioridad, los callos obtenidos en los explantes (hojas y tallos), no fueron cuantitativamente iguales y uno de los factores estaría dada, por el tipo de explante, ya que ambos tienen diferentes características fenotípicas y diferentes niveles endógenos de reguladores de crecimiento.

Cabe recalcar, que otro factor podría deberse que al no utilizar los dos explantes de un mismo tamaño, esto pudo haber influido en la respuesta callogénica, y por ende en el peso del mismo.

Cada fracción aislada tiene su propia porción de reservas y hormonas, y es obvio que mientras mayor sea el fragmento vegetal, más fácil es inducir el crecimiento y la regeneración (Ruiz, 2000). Cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos (Levitus *et al.*, 2010).

La tabla 14, presenta el peso fresco que alcanzaron los callos cuando se aplicaron diferentes concentraciones de 2,4-D. Las concentraciones más altas de 2,4-D mostraron mayores pesos frescos de los callos, de 1,975 [g] y 0,922 [g] para 5 [mg/l] y 10 [mg/l] respectivamente, mientras que en las menores concentraciones de 0,5 y 1 [mg/l] se obtuvieron los menores pesos frescos de 0,6 y 0,2 [g] respectivamente.

Tabla 14. Efecto 2,4-D en el peso de los callos

2,4-D [mg/l]	PESO [g]	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	0.6	B
1	0.2	B
5	1.975	A
10	0.925	AB

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Se ha probado que la administración de la fitohormona 2,4-D en los medios de cultivo es esencial para favorecer el aumento de biomasa en cultivos de callo de diversas especies (Sadino, 2015).

Por otro lado, se observa que es a una determinada dosis de 2,4-D cuando los callos adquieren su mayor peso. Según Sterling, Namuth y Hernández-Ríos (2005) la respuesta fisiológica de la planta es dependiente de la dosis aplicada ya que actúa como regulador del crecimiento y estimula el crecimiento celular a dosis bajas, mientras que a dosis altas muestra efectos fitotóxicos.

La tabla 15, individualiza el peso que adquieren los callos en hojas y tallos bajo el efecto de la concentración 2,4-D (interacción 2,4-D con explante). En hojas, el

mayor peso obtenido fue de 3,95 [g] a una concentración de 5 [mg/l] de 2,4-D; seguido de 1,85 [g] cuando se aplicó una concentración de 10 [mg/l] de 2,4-D. En cambio, en los tallos el mayor peso que se obtuvo fue de 1,2 [g] a una concentración de 0,5 [mg/l] de 2,4-D, que corresponde a la menor concentración presentada en este estudio para la auxina 2,4-D.

Tabla 15. Efecto 2,4-D en el peso de los callos respecto a explantes

2,4-D [mg/l]	EXPLANTE	PESO [g]	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	HOJA	0	C
0.5	TALLO	1.2	BC
1	HOJA	0.2	C
1	TALLO	0.2	C
5	HOJA	3.95	A
5	TALLO	0	C
10	HOJA	1.85	B
10	TALLO	0	C

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Estos resultados, muestran que los tallos, necesitan concentraciones bajas de 2,4-D, por lo que sería recomendable bajar aún más la concentración de auxina en este tipo de explante. En hojas por el contrario, al utilizar la concentración más baja de 2,4-D no se obtuvo ningún peso, ya que no hubo formación de callo, por lo que las concentraciones bajas de esta auxina resultan ser insuficientes, ya que al ir incrementando la concentración, esta hizo que los callos vayan generándose y por lo tanto, obteniendo un mayor peso, pero si esta es muy alta al parecer produciría un efecto negativo, ya que hace que el peso vaya disminuyendo paulatinamente.

Así Villalobos y Arias (1987), señalan que uno de los factores para la pérdida de peso (ápices de caña de azúcar) fue que el 2,4-D en concentraciones elevadas a 3 [mg/l] fueron tóxicas al explante lo que limitó su crecimiento, este efecto al parecer es el mismo que causó la disminución del peso en hojas de *Phalaenopsis*.

En la figura 16 (a, b y c), se puede observar la variación en el peso de los callos al aplicar diferentes concentraciones de 2,4-D en el explante hoja.

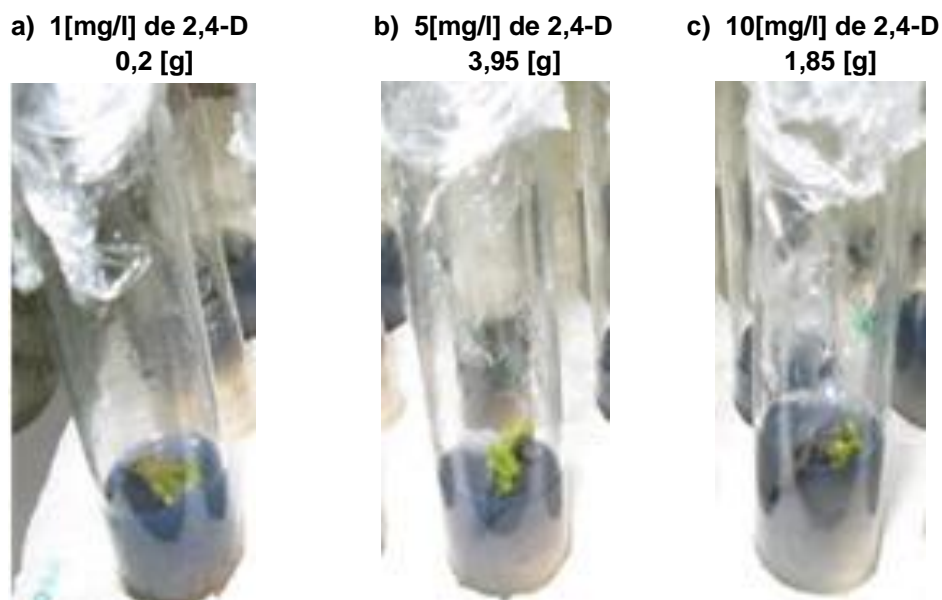


Figura 16. Efecto de las diferentes concentraciones de 2,4-D sobre el peso de las hojas

Se observa, que es a una determinada concentración de 2,4-D cuando los callos adquieren un mayor peso.

4.1.4. Número de callos

La tabla 16, presenta el análisis de varianza en el cual se observa que el Factor B (2,4-D) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$). El Factor C (explante) presentó diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) al igual que la interacción BC (2,4-D, explante) ($P \leq 0.01$). Cabe mencionar que se realizó la transformación estadística $\sqrt[4]{X+1}$.

Tabla 16. Análisis de Varianza – Cantidad

Fuente	G.L.	S.C	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.625	0.069	1.9110	0.0553ns
Factor A (BAP)	1	0.032	0.032	0.8788	ns

Factor B (2,4-D)	3	0.466	0.155	4.2750	0.0064*
AB	3	0.072	0.024	0.6561	ns
Factor C (Explante)	1	0.420	0.420	11.5691	0.0009**
AC	1	0.013	0.013	0.3469	ns
BC	3	0.684	0.228	6.2811	0.0005**
ABC	3	0.097	0.032	0.8912	ns
Error	135	4.904	0.036		

C.V. 12.93%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

En la tabla 17, se puede observar que la concentración de 2,4-D tiene influencia en la obtención del número de callos. Al aplicar una concentración de 5 [mg/l] de 2,4-D hay un promedio de 3,125 callos y al aumentar la concentración en 10 [mg/l] de 2,4-D el promedio disminuye en 1,250 callos, sin embargo, ambas concentraciones muestran la mayor cantidad de callos desarrollados. Mientras que con concentraciones bajas de 1 y 0,5 [mg/l] el número de callos se mantiene constante en 0,125 callos, siendo los que mostraron menor cantidad.

Tabla 17. Efecto 2,4-D en el número de callos

2,4-D [mg/l]	Cantidad de callos	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	0.150	B
1	0.150	B
5	3.125	A
10	1.250	AB

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

El número de callos en nuestro experimento está estrechamente relacionado con el peso, por lo que el 2,4-D tuvo un efecto similar, ya que se requirió incrementar relativamente la concentración de auxina para que exista un mayor número de callos, pero se debe tener cuidado al aumentar más la concentración, ya que como en nuestro caso el peso podría ir descendiendo. Se ha demostrado que los niveles superiores al óptimo de reguladores de crecimiento inhiben respuestas morfogénicas, posiblemente a través del mecanismo de retroalimentación negativa (Hutchinson *et al.*, 2010).

Otra causa para la disminución en el número de callos, es que las células hayan pasado de una fase de división celular (exponencial) a una fase estacionaria. Así García (2014) señala, en cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente de forma exponencial. Las limitaciones de crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por combinación de las causas anteriores.

En la figura 17, se puede observar que el tipo de explante que se usó causa diferencias en la obtención del número de callos. Así, en las hojas se observó el desarrollo de una mayor cantidad de callos (2,250), en relación a los tallos (0,087).

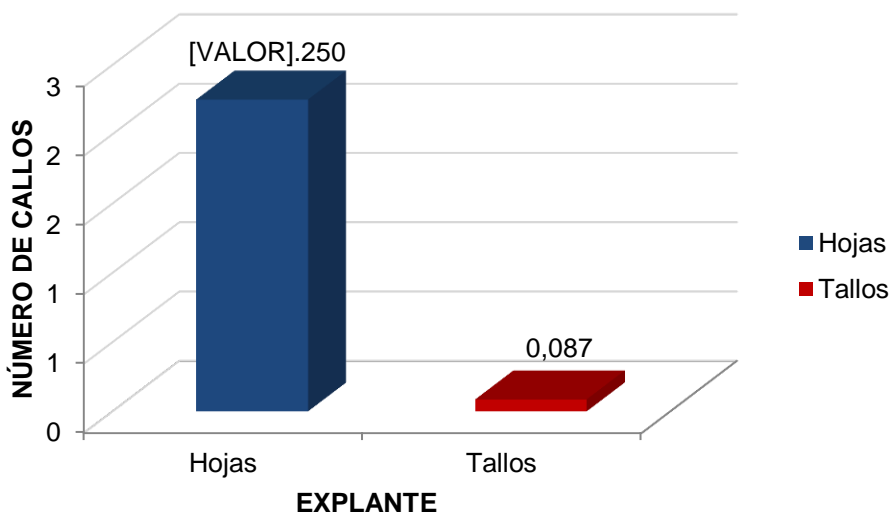


Figura 17. Número de callos respecto a explantes

El número de callos está dado, por el tipo de explante a usarse. (Martin, Chong y Pérez, 2015) indican, que la morfogénesis tiene un fundamento genotípico y la respuesta diferencial del material vegetal de partida va a estar condicionada por esto. Cada especie presenta respuestas diferentes bajo las mismas condiciones de cultivo.

Por lo tanto, observando el análisis de Duncan (Ver Tabla 18) se muestra claramente que en las hojas cuando se emplea 5 [mg/l] de 2,4-D se obtiene la

mayor cantidad de callos con un promedio de 6,25 callos, el resto de los tratamientos mostró muy poca generación de callos en relación a este tratamiento, e incluso los explantes a ciertos tratamientos no generaron callos.

Tabla 18. Efecto 2,4-D en la cantidad de callos respecto a explantes

2,4-D [mg/l]	EXPLANTE	CANTIDAD	DUNCAN $\alpha=0,05^*$
0.5	HOJA	0	B
0.5	TALLO	0.3	B
1	HOJA	0.25	B
1	TALLO	0.05	B
5	HOJA	6.25	A
5	TALLO	0	B
10	HOJA	2.5	B
10	TALLO	0	B

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

López (2014), menciona que las auxinas y citoquininas, ayudan a un aumento en el número de células. Las auxinas promueven tanto la división como el crecimiento celular (Sadino, 2015). Por lo que, se pudo evidenciar en el presente experimento que, la variación de concentración de la auxina 2,4-D afectó en el aumento de número de células indiferenciadas (callos).

Por otro lado, en hojas, no es recomendable aumentar aún más la concentración de 2,4-D. En tallos, este resultado nos confirma que se debería realizar pruebas con concentraciones menores de este regulador de crecimiento.

4.1.5. Supervivencia

En la tabla 19, se puede observar el análisis de varianza y deducir que el Factor A (BAP) presenta diferencias significativas al igual que la interacción AC (BAP,

explante). Mientras que el Factor B (2,4-D), el Factor C (explante) y la interacción BC (2,4-D, explante) mostraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$). También es importante mencionar que se realizó la transformación estadística de $\sqrt{X+1}$, para normalizar la información.

Tabla 19. Análisis de Varianza – Supervivencia

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.178	0.020	1.1785	0.3136ns
Factor A (BAP)	1	0.085	0.085	5.0837	0.0258*
Factor B (2,4-D)	3	0.213	0.071	4.2469	0.0067**
AB	3	0.037	0.012	0.7322	ns
Factor C (Explante)	1	0.884	0.884	52.7824	0.0000**
AC	1	0.085	0.085	5.0837	0.0258*
BC	3	0.213	0.071	4.2469	0.0067**
ABC	3	0.037	0.012	0.7322	
Error	135	2.260	0.017		

C.V. 9.69

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

En la figura 18, se muestra la respuesta a la concentración BAP para la supervivencia. A una concentración de 0,1 [mg/l] de BAP, se obtuvo una supervivencia de 76,3%, si se incrementase la concentración a 1 [mg/l] de BAP, la supervivencia también se incrementa a 87,5%.

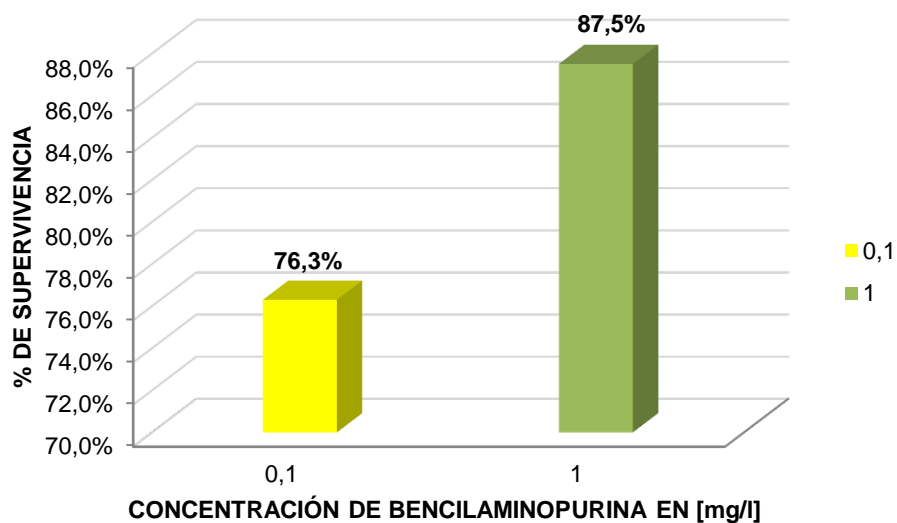


Figura 18. Efecto BAP en la supervivencia de los explantes

Vallejo (2008), menciona que independientemente de las concentraciones de BAP que utilizó, obtuvo supervivencia en hojas de orquídea (*Dendrobium*).

Murray (2006), indica que las citocininas retrasan el envejecimiento de las hojas y aumentan su longevidad de diversas maneras, entre ellas la atracción de aminoácidos desde otras partes de la planta

También en la figura siguiente, se puede observar la diferencia que existe entre los porcentajes de supervivencia de los explantes (tallos y hojas), en los tallos se obtuvo 100% de supervivencia, en el caso de las hojas un 63%. Por lo que estos resultados obtenidos demuestran que el porcentaje de supervivencia, depende del tipo de explante que se utilice.

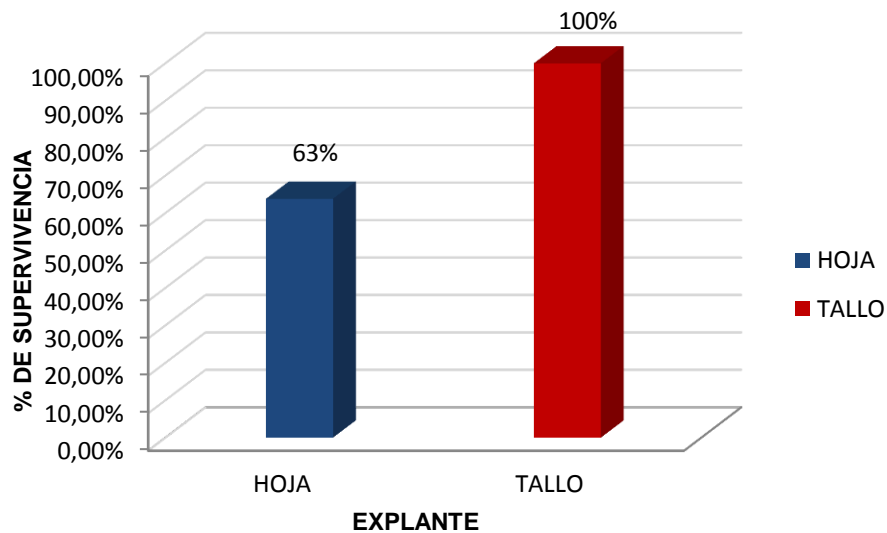


Figura 19. Supervivencia de los explantes

Un factor observado en el presente experimento, fue que en esta variedad de *Phalaenopsis*, las hojas tienden a oxidarse mucho más que los tallos (en tallos se observó poca oxidación).

Esta condición (oxidación) en hojas, afecto en su supervivencia ya que podría ser este el factor que le causó la muerte de los explantes. La oxidación fenólica en el cultivo de tejidos es causada por la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO) que se libera o sintetiza cuando los tejidos sufren lesiones (Azofeifa, 2009). Las cuales pueden inhibir el crecimiento e incluso causar la muerte celular de explantes, el contenido de fenoles y la actividad de la PPO están relacionados con el genotipo (Granado *et al.*, 2015). En ocasiones, es necesario la incorporación de agentes antioxidantes para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes, ya que este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos (Levitus *et al.* 2010).

Jiménez y Guevara (1996), mencionan que en el estudio que realizaron en segmentos de tallo floral de *Phalaenopsis*, pudieron lograr la regeneración de plantas de *Phalaenopsis* probablemente por la adición de carbón activado que limitó el efecto negativo asociado a sustancias fenólicas liberadas en el medio por las estacas. Los resultados de la presente investigación muestran que en los tallos de la variedad de *Phalaenopsis* utilizada no es necesaria la adición de un compuesto antioxidante, pero en hojas sería recomendable utilizarla.

Asimismo, se puede observar en la tabla 20, que a una concentración 5 [mg/l] de 2,4-D se dio una supervivencia óptima de un 95% con respecto a las demás concentraciones de acuerdo al análisis de Duncan con $\alpha = 0,05$.

Tabla 20. Supervivencia en 2,4-D de acuerdo al factor de Duncan

2,4-D [mg/l]	SUPERVIVENCIA %	DUNCAN $\alpha=0,05^*$
0,5	70	B
1	82,5	AB

5	95	A
10	80	B

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Las concentraciones menor y mayor fueron las menos adecuadas para la supervivencia. En el primer caso, la concentración de 2,4-D resultó ser baja para que se pueda alcanzar un nivel de supervivencia óptima. En el segundo caso, la concentración sería demasiada por lo que resultaría toxica lo cual podría provocar apoptosis (muerte celular). Así Azofeifa (2009), nos dice que existen autores que han señalado que conforme aumentaron los niveles de auxina en el medio de cultivo se incrementaron los problemas de oxidación en los explantes (especialmente con el uso del 2,4-D).

Como se muestra en la figura 20, se obtuvo un 100% de supervivencia para todas las concentraciones evaluadas de 2,4-D en el caso de los tallos, mientras que, para las hojas, la mejor concentración fue de 5 [mg/l] ya que esta presentó un 90% de supervivencia en relación a las demás concentraciones, mostrándonos que al utilizar la menor concentración 0,5 [mg/l] de 2,4-D solo sobreviven un 40% de los explantes.

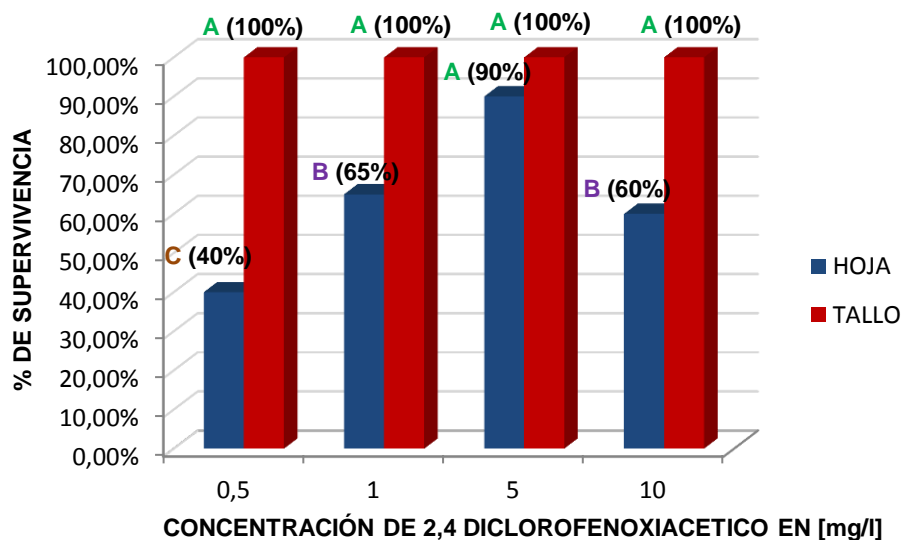


Figura 20. Efecto 2,4-D en la supervivencia de los explantes con análisis de Duncan $\alpha=0.05^*$.

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Si comparamos las hojas y tallos de forma visual, se puede observar que las hojas son más delicadas estructuralmente. Al respecto Torres (1994), nos dice que el tallo está compuesto de tejidos más leñosos y resistentes que las hojas.

Esta condición podría hacer a la hoja más sensible a las diferentes concentraciones de 2,4-D, en cambio los tallos al ser más resistentes serían capaces de soportar las diferentes variaciones en las concentraciones.

En la tabla siguiente presenta el efecto de supervivencia de acuerdo a la concentración de BAP, donde existe mayor posibilidad de supervivencia en tallos dado que para la concentración de BAP de (0,1 [mg/l] y 1 [mg/l]) se observó 100% de supervivencia presentándose como los mejores resultados para esta variable de acuerdo a la prueba de Duncan con $\alpha=0.05$. En lo que respecta a las hojas, la mejor concentración para su supervivencia es utilizando 1[mg/l] de BAP que mostró 75 % de sobrevivencia.

Tabla 21. Concentración BAP en la supervivencia de explantes

BAP [mg/l]	EXPLANTE	SUPERVIVENCIA %	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0,1	HOJA	52,5	C
0,1	TALLO	100	A
1	HOJA	75	B
1	TALLO	100	A

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Los tallos, pueden asimilar las diferentes concentraciones de BAP, por lo que no les afectó en su supervivencia las dos concentraciones que utilizamos de (1 y 0,1 [mg/l]), a diferencia de las hojas que dependió de las concentraciones a utilizarse.

Vallejo (2008), señala que al utilizar diferentes concentraciones de BAP para la inducción de tejido callogénico de la orquídea *Dendrobium* spp., a partir de explantes foliares, el tratamiento con mayor concentración de BAP (6 mg/l) fue el que obtuvo un mayor nivel de sobrevivencia.

Ese resultado concuerda con la presente investigación, en el sentido de que al utilizar la mayor concentración que BAP en hojas, este dio mayores porcentajes de supervivencia, por lo que en las hojas es preferible utilizar concentraciones mayores de BAP.

No fue uno de los objetivos planteados la obtención de brotes, pero es importante mencionar que, a los 123 días los callos provenientes de hojas fueron capaces de generar estas importantes estructuras (figura 21).



Figura 21. Brote en el explante hoja: Formación de brote en el tratamiento 6, que corresponde a una concentración de 5 [mg/l] de 2,4-D y 1 [mg/l] de BAP.

Los callos provenientes de hojas bajo esta condición (luz), a una combinación de 5 [mg/l] de 2,4-D y 1 [mg/l] de BAP, fueron capaces de generar brotes (vía organogénesis indirecta), esto nos demuestra la capacidad totipotente que tienen estos callos, ya que estos brotes posteriormente podrían regenerarse a una plantula completa, así como lo indican Tokuhara & Masahiro (2001) que en muchas especies la regeneración de plantas a partir de tejido de callo altamente totipotente, ha sido reconocida como una de las técnicas esenciales para la micropropagación y aplicaciones biotecnológicas.

Este resultado también nos indica, que en este trabajo se encontró la combinación adecuada para la formación de brotes. De tal modo la Revista Horticultivos (2016), menciona que la fase, en la que las células se determinan para formar un órgano o embrión, está dada por un balance de citocininas/auxinas específico del órgano o embrión a formarse.

Por otro lado se debe indicar que, estos callos formaron brotes solo bajo condiciones de luz, a lo cual Talavera *et al* (2016), mencionan que la calidad, intensidad y duración de la luz afecta el desarrollo vegetal porque promueven diferentes respuestas fisiológicas. El suministro de luz favorece la diferenciación de órganos (Levitus *et al.*, 2010)

Asimismo, la formación de brotes solamente se presentó en hojas y no en tallos por lo que López (2014), señala que el tejido más empleado para la formación de una plántula es la hoja, en la cual las células poseen mayor capacidad de dar un nuevo individuo que las células del tallo o raíz.

4.2. FORMACIÓN DE CALLOS EN OSCURIDAD

En los puntos siguientes, se describe cada una de las variables evaluadas en la formación de callos en hojas y tallos, en condiciones de oscuridad.

4.2.1. Formación

En la tabla 22, se puede observar que, según el análisis de varianza, existen diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en la interacción BC (2,4-D, explante) con respecto a los demás factores que no presentan diferencias estadísticas.

Tabla 22. Análisis de varianza- Formación

Fuente	G.L	S.C.	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.059	0.007	0.8678	ns
Factor A (BAP)	1	0.000	0.000	0.0000	ns
Factor B (2,4-D)	3	0.050	0.017	2.2314	0.0874ns
AB	3	0.017	0.006	0.7438	ns
Factor C (Explante)	1	0.017	0.017	2.2314	0.1376ns
AC	1	0.000	0.000	0.0000	ns
BC	3	0.101	0.034	4.4628	0.0061**
ABC	3	0.017	0.006	0.7438	
Error	135	1.017	0.008		

C.V. 8.51%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

La tabla 23, muestra que a una concentración de 0,5 [mg/l] de 2,4-D se tiene una formación mayor de callos observada en los tallos, mostrando el 25% de efectividad respecto a los demás tratamientos que no mostraron diferencias significativas en relación a sus porcentajes de acuerdo al análisis de Duncan.

Tabla 23. Efecto 2,4-D en los explantes para la formación de callos - oscuridad

2,4-D [mg/l]	EXPLANTE	FORMACIÓN %	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	HOJA	0	B
0.5	TALLO	25	A
1	HOJA	0	B
1	TALLO	5	B
5	HOJA	5	B
5	TALLO	0	B
10	HOJA	5	B
10	TALLO	0	B

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Chen, Chang y Chang (2000), reportaron que cuando indujeron la formación de callos de protocormos derivados de semilla de *Phalaenopsis*, el 2,4-D (0,5 y 1 [mg/l]) en concentraciones bajas, tuvo un efecto positivo en la formación de callos. De la misma forma Lee Y.I. y Lee N. (2003) mencionan que obtuvieron un mejor porcentaje de callos de 55,8% cuando aplicaron 1 [mg/l] de 2,4-D en la orquídea *Cypripedium*.

En las hojas las concentraciones que indujeron la formación de callos fueron las de 5 y 10 [mg/l] de 2,4-D con igual porcentaje de 5% y 5% de formación. Este porcentaje concuerda con el que obtuvieron Kuo, Chen y Chang (2005) al obtener 5% de embriones de *Phalaenopsis* 'Little Steve' inducidos de hojas, pero contrasta con la concentración de 2,4-D (0,5 [mg/l]). Por lo que Lee Y.I. y Lee N. (2003) afirman que los requisitos hormonales exógenos que se necesitan para inducir la morfogénesis *in vitro* son diferentes para cada especie de orquídea. Esto nos explica porque los requerimientos de las concentraciones de 2,4-D fueron diferentes en nuestra variedad de *Phalaenopsis*.

Un aspecto importante a resaltar es, que las hojas bajo esta condición lumínica tuvieron un porcentaje de formación de callos mucho menor al que obtuvieron en luz, por lo que se puede afirmar que, la condición lumínica en hojas, fue un factor que afectó la formación de callos.

Gow, Chen y Chan (2008) investigaron la influencia del régimen de luz (luz y oscuridad) utilizando hojas de dos especies de *Phalaenopsis*, *P. Amabilis* y *P. Nebula*, para la formación de embriogénesis somática directa y mencionan que la luz fue un factor negativo ya que retraso la embriogénesis somática en ambas especies. Este resultado, aunque corresponde a otra respuesta morfológica, muestra que el régimen de luz afecta la morfogénesis dependiendo de la especie a utilizarse.

En tallos no existe mucha diferencia en los porcentajes que adquirieron en ambas condiciones, por lo que a este explante no le afectó de manera considerable la condición lumínica a la que fue expuesto.

En general, en ambos, se puede observar que el porcentaje de formación de callos en oscuridad es bajo. La luz suministrada a los cultivos debe ser evaluada en cuanto a la calidad, intensidad y período de suministro. La respuesta morfológica de un explante puede variar según si se le proporciona luz o no. Para estimular la formación de callo, es común que se prefiera la oscuridad (Levitus *et al.*, 2010).

En la siguiente figura se observa, el efecto del 2,4-D en la formación de callos en los explantes hojas y tallos.

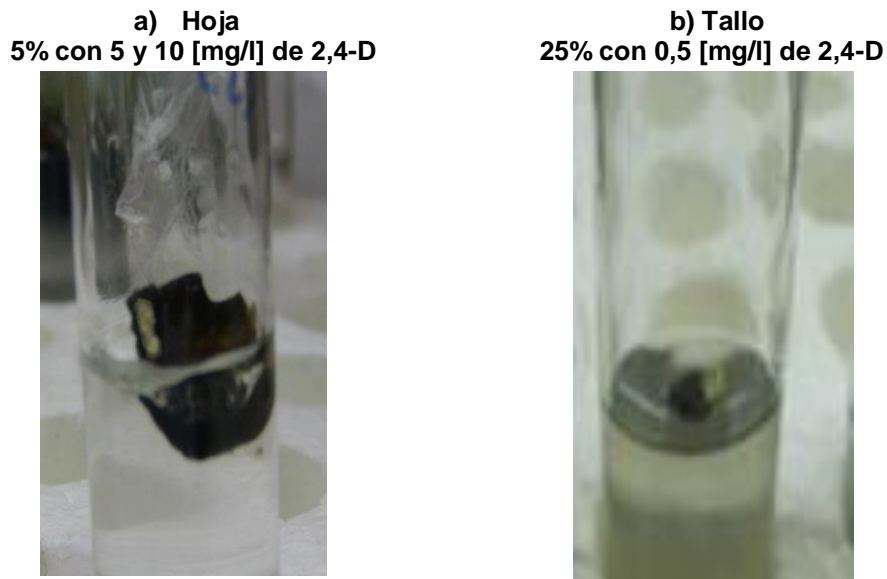


Figura 22. Efecto del 2,4-D en la formación de callos

Como se puede observar en la figura 22(a), los callos obtenidos en hojas resultaron ser de color blanquecino y de consistencia friable. Lo que concuerda con los callos obtenidos por Espinosa *et al.* (2012), que señalan que los callos obtenidos de hojas de Morera fueron de color crema y de consistencia friable. En la figura 22(b) se observa que, los callos que se obtuvieron cubrieron aproximadamente la cuarta parte del explante y fueron de color blanquecino, de

consistencia compacta. Espinosa *et al.* (2012), también reportaron callos obtenidos en tallos de Morera de color pardo oscuro y de consistencia esponjosa, esto contrasta con lo observado en nuestros resultados, pero podría deberse a que son dos especies distintas. Martínez, Hernández y Restrepo (2007) señalan, que el callo puede tener diferentes apariencias y color en dependencia de la especie o genotipo con que se trabaje, y por las condiciones del cultivo *in vitro* como luz y oscuridad o por el tipo de reguladores de crecimiento que se utilicen.

4.2.2. Inicio de formación

En la tabla 24, se observa que el Factor B (2,4-D) presenta diferencias significativas ($P \leq 0.05$) y la interacción BC (2,4-D, explante) muestra diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), con respecto a los otros factores en los cuales no se observó la presencia de diferencias estadísticas.

Tabla 24. Análisis de Varianza - Inicio de formación

Fuente	G.L.	S.C.	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	1.056	0.117	0.8043	ns
Factor A (BAP)	1	0.506	0.506	0.0097	ns
Factor B (2,4-D)	3	1.269	0.423	2.8595	0.0393*
AB	3	0.219	0.073	0.6453	ns
Factor C (Explante)	1	5.256	5.256	3.4020	0.0673
AC	1	0.506	0.025	0.0097	ns
BC	3	1.269	0.242	4.6718	0.0039**
ABC	3	0.219	0.842	0.6453	ns
Error	135	13.444	0.375		

C.V.

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

Al igual que en condiciones luz se puso un tiempo máximo de 180 días para la evaluación del inicio de formación.

En la siguiente tabla, se observa que a una concentración mínima de 0.5 [mg/l] de 2,4-D se inicia más rápidamente la formación de callos.

Tabla 25. Inicio de la formación de callo para la concentración de 2,4-D de acuerdo al análisis de Duncan

2,4-D	INICIO DE	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
-------	-----------	----------------------------

[mg/l]	FORMACIÓN (DÍAS)	
0,5	162,125	B
1	176,425	A
5	177,925	A
10	177,050	A

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Córdova *et al.* (2014), reportaron que al inducir la formación de callos en *Myrciaria dubia* en los explantes (hojas, nudos y pulpa), en los distintos tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento, el tiempo requerido de cultivo fue variable, lo que concuerda con el presente trabajo, ya que al adicionar las diferentes concentraciones de 2,4-D el tiempo de inicio de formación de callos varió, lográndose determinar que la concentración baja fue la que dio un inicio de formación más rápida.

La tabla 26, muestra el inicio de formación de callos en hojas y tallos, a un tiempo máximo de 180 días. Por lo que se ha obtenido el inicio de formación de callos en tallos a los 144,25 días cuando se aplicó una concentración 0.5 [mg/l] de 2,4-D y el inicio de la formación de callos en hojas fue aproximadamente en 175,85 y 174,10 días, con 5 [mg/l] y 10[mg/l] de concentración de 2,4-D.

Tabla 26. Efecto 2,4-D en los explantes al inicio de formación – oscuridad

2,4 D [mg/L]	EXPLANTE	INICIO DE FORMACIÓN [DÍAS]	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	HOJA	180.000	A
0.5	TALLO	144.250	B
1	HOJA	180.000	A
1	TALLO	172.850	A
5	HOJA	175.850	A
5	TALLO	180.000	A
10	HOJA	174.100	A
10	TALLO	180.000	A

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Se pudo determinar, que el 2,4-D en una concentración baja indujo un inicio de formación más temprana de callos en tallos, este fue el mejor tiempo comparado con el resto de los tratamientos que si bien iniciaron la formación de callos esta fue más tardía.

Espinosa *et al.* (2012), señalan que a los 15 días posteriores al establecimiento *in vitro*, se inició la formación de los callos en todos los tipos de explantes cultivados (hojas y tallos) de Morera en medios que contenían 2,4-D independientemente de su concentración. Este resultado al igual que el obtenido en la presente investigación, muestra la capacidad que posee esta auxina para que se pueda dar un inicio de formación de callos.

4.2.3 Peso fresco de los callos

La tabla 27, muestra el análisis de varianza en la variable peso fresco. La interacción BC (2,4-D, explante) presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) con respecto a los demás factores que no mostraron diferencias estadísticas.

Tabla 27. Análisis de varianza – Peso

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.351	0.039	0.8036	ns
Factor A (BAP)	1	0.007	0.007	0.1474	ns
Factor B (2,4-D)	3	0.337	0.112	2.3124	0.0789
AB	3	0.182	0.061	1.2503	0.2941
Factor C (Explante)	1	0.176	0.176	3.6295	0.0589
AC	1	0.001	0.001	0.0238	ns
BC	3	0.521	0.174	3.5744	0.0158*
ABC	3	0.188	0.063	1.2914	0.2800
Error	135	6.555	0.049		
Total	159	8.318			

C.V. 21.04%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

En la tabla 28, se observa la diferencia que existe en el peso que adquieren los callos en hojas y tallos bajo el efecto de la concentración 2,4-D. En hojas, el mayor

incremento del peso fresco de los callos fue de 0,1 [g] con una concentración de 5 [mg/l] de 2,4-D, aunque esta respuesta en peso no muestra diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos. Mientras que, en tallos el mayor peso es de 0,8 [g] cuando se aplicó 0,5 [mg/l] de 2,4-D, mostrando diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos.

Tabla 28. Concentración de 2,4-D en relación al peso de los callos

2,4 D [mg/l]	EXPLANTE	PESO [g]	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	HOJA	0.000	B
0.5	TALLO	0.800	A
1	HOJA	0.000	B
1	TALLO	0.250	B
5	HOJA	0.100	B
5	TALLO	0.000	B
10	HOJA	0.050	B
10	TALLO	0.000	B

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Se observa, que en los tallos cuando se aplicó la concentración mínima de 2,4-D fue cuando los callos obtuvieron su mayor peso, pero cuando se fue incrementando la concentración el peso fue disminuyendo, por lo que pudimos determinar que el peso de los callos es inversamente proporcional a la concentración de 2,4-D. En las hojas los callos generados no mostraron mucho peso en general, por lo que el análisis de Duncan no mostró diferencias estadísticas entre estos tratamientos. Gonzales *et al.* (2011), comentan que los resultados que obtuvieron en *Ipomoea batatas*, les permitió señalar que es evidente la marcada influencia que ejerce la composición hormonal endógena del explante empleado y los reguladores en el medio de cultivo, en el crecimiento de la masa fresca de los callos.

Cabe señalar, que el peso en hojas, bajo esta condición es mucho menor al que se obtuvo en luz lo que concuerda con lo que reportaron Martínez, Hernández y Restrepo (2007), que en los ensayos que realizaron bajo condiciones de luz y

oscuridad para la obtención de callos de hojas de *Borojo*, estos presentaron diferencias estadísticas para la variable peso, lo cual mencionan que significó que es más conveniente un ambiente luminoso para obtener callos de buen tamaño, color y peso.

En la figura 23, se puede observar, la diferencia en los pesos que adquirieron los callos en los explantes (hoja y tallo) con diferentes concentraciones de 2,4-D.

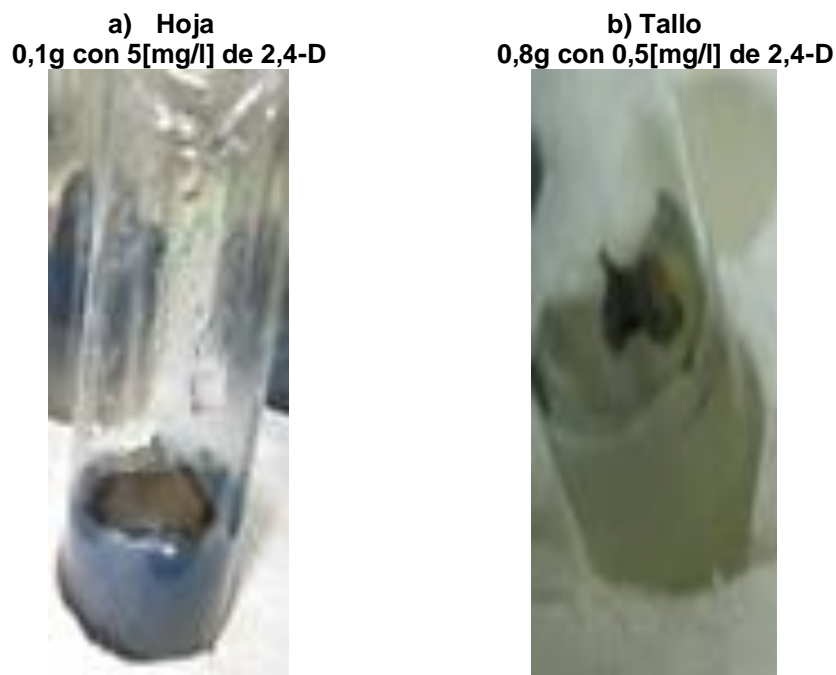


Figura 23. Peso de los explantes

4.2.4 Número de callos

La tabla siguiente muestra el análisis de varianza, a través del cual podemos deducir que solo hay diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en la interacción BC (2,4-D, explante). Cabe mencionar que se realizó la transformación estadística de $\sqrt{X+1}$, para reducir el coeficiente de variabilidad.

Tabla 29. Análisis de Varianza – Cantidad

Fuente	GL	S.C.	M.C	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.318	0.035	1.8419	0.0662ns
Factor A (BAP)	1	0.000	0.000	0.0026	ns
Factor B (2,4-D)	3	0.127	0.042	2.2116	ns
AB	3	0.022	0.007	0.3768	ns

Factor C (Explante)	1	0.007	0.007	0.3872	0.0896ns
AC	1	0.003	0.003	0.1737	ns
BC	3	0.288	0.096	5.0087	0.0025**
ABC	3	0.018	0.006	0.3198	ns
Error	135	2.589	0.019		

C.V. 13.41%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

La tabla 30, se puede observar que las diferentes concentraciones de 2,4-D, tienen influencia en los explantes para que se dé una determinada cantidad de callos. En tallos al emplear 0,5 [mg/l] de 2,4-D se obtuvo un promedio de 0,25 callos, mostrándose este resultado como el mejor en relación al resto de las interacciones entre el explante y la concentración de 2,4-D.

Tabla 30. Efecto 2,4-D en la cantidad de callos respecto a explantes

2,4-D [mg/l]	EXPLANTE	CANTIDAD	DUNCAN $\alpha=0,05^*$
0.5	HOJA	0	B
0.5	TALLO	0.25	A
1	HOJA	0	B
1	TALLO	0.05	B
5	HOJA	0.05	B
5	TALLO	0	B
10	HOJA	0.04	B
10	TALLO	0	B

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Hernández, López y Estrada (2013), señalan que la eficacia del 2,4-D en la inducción de callos radica en que puede actuar directamente como auxina o indirectamente modificando el metabolismo intracelular del AIA.

También se debe señalar, que el número de callos en tallos es mucho mayor que el de hojas, contrariamente a lo que sucedió en condiciones luz, por lo que el número de callos podría estar dado por la eficacia del 2,4-D de acuerdo a la condición lumínica en la que el explante se encuentre.

4.2.5. Supervivencia

La tabla 31, presenta el análisis de varianza de la variable supervivencia, donde se observa que todos estos factores, el Factor A (BAP), el Factor B (2,4-D), el factor C (explante), la interacción AC (BAP, explante) y la interacción BC (2,4-D, explante) presentan diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$).

Tabla 31. Análisis de varianza – supervivencia

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F	Prob.
Replicación	9	0.190	0.021	1.3945	0.1965
Factor A (BAP)	1	0.127	0.127	8.3898	0.0044**
Factor B (2,4-D)	3	0.331	0.110	7.2804	0.0001**
AB	3	0.054	0.018	1.1787	0.3203
Factor C (Explante)	1	2.321	2.321	153.1664	0.0000**
AC	1	0.127	0.127	8.3898	0.0044**
BC	3	0.331	0.110	7.2804	0.0001**
ABC	3	0.054	0.018	1.1787	0.3203
Error	135	2.046	0.015		

C.V. 9.55%

G.L.= grados de libertad; S.C.=suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, * Diferencia significativa $p \leq 0.05$, ** diferencia altamente significativa para $p \leq 0.01$, ns = no significativo ($p > 0.05$).

La siguiente tabla, muestra que existe mayor posibilidad de supervivencia (77,5%) de los explantes a una concentración de 1 [mg/l] en relación a 0,1 [mg/l] de BAP.

Tabla 32. Concentración de BAP en relación a la Supervivencia

BAP [mg/l]	SUPERVIVENCIA %
0.1	63.8%
1	77.5%

Ruiz (2000), señala que en el experimento que realizó en hojas de *Anthurium*, los resultados que obtuvo sugirieron que la concentración de BAP en el medio de cultivo tuvo influencia en la producción de compuestos fenólicos en la base del explante, obteniéndose un mejor control de la oxidación a una concentración media de BAP de 0.5 mg/l esto concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación ya que también muestran que el BAP tiene efecto en la supervivencia de los explantes.

La tabla 33, muestra que hay una mayor posibilidad de supervivencia al aplicar (1, 5 y 10 [mg]) de 2,4-D al explante y una menor posibilidad de supervivencia 52,5% a aplicar 0,5 [mg/l].

Tabla 33. Concentración De 2,4-D en relación a Supervivencia

2,4-D [mg/l]	SUPERVIVENCIA %	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.5	52.5%	B
1	72.5%	A
5	82.5%	A
10	75.0%	A

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

El 2,4-D es un regulador de crecimiento que al aplicarlo en ciertas dosis hace que exista un mayor porcentaje de supervivencia, la concentración de auxina requerida para la supervivencia depende de las necesidades que tenga cada explante.

La figura siguiente, muestra que existe mayor posibilidad de supervivencia (100%) de tallos que de hojas (41,3%).

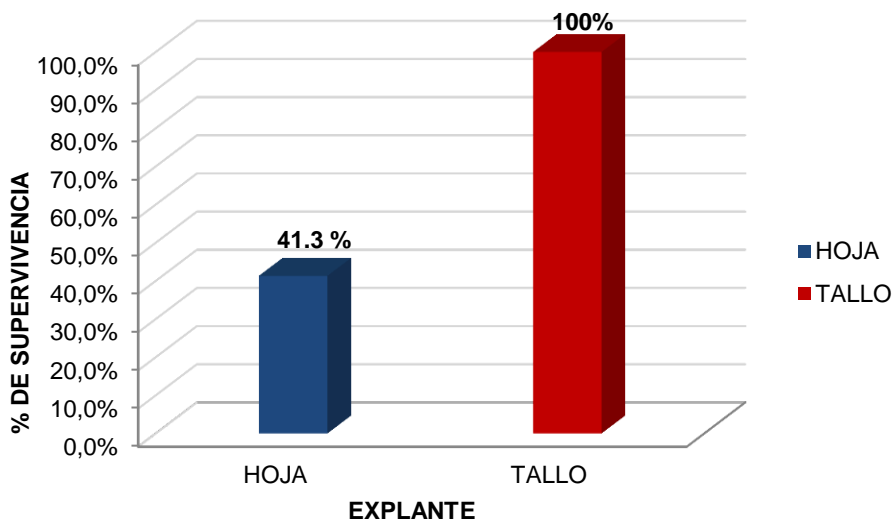


Figura 24. Supervivencia en explantes

En el experimento que hizo Rojas (2014), cuando propago *in vitro* *Phalaenopsis* violácea a través de vara floral, reportó que obtuvo un 90 % de supervivencia del explante y menciona que básicamente, el 10 % que no sobrevivió fue por contaminación causada por hongos, pues se evidenció la presencia de micelio en él. Ella introdujo varas de tallo floral que no se encontraban *in vitro* y procedió a su desinfección. En el presente trabajo, los tallos ya estaban en condiciones *in vitro* y no hubo contaminación, esta podría ser una de las razones de la diferencia en el porcentaje de supervivencia (10%).

En el caso de las hojas, la supervivencia podría deberse a, como ya se mencionó anteriormente, la tendencia a oxidarse de este tejido en relación a los tallos, aparte de tener una estructura más sensible, por lo que podrían necesitar requerimientos más estrictos tanto nutricionales como ambientales para su supervivencia.

En la tabla siguiente, se muestra que existe mayor posibilidad de supervivencia (100 %) de callos formados en los tallos a pesar de variar la concentración de BAP. Mientras que, en las hojas la posibilidad de supervivencia aumenta cuando la concentración de BAP es de 1 [mg/l].

BAP [mg/L]	EXPLANTE	SUPERVIVENCIA %	DUNCAN $\alpha=0,0,5^*$
0.1	HOJA	27.5%	C
0.1	TALLO	100.0%	A
1	HOJA	55.0%	B
1	TALLO	100.0%	A

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

En hojas, cuando se aumentó la concentración de BAP también aumento su supervivencia por lo que se puede concluir que la concentración de BAP es directamente proporcional a la supervivencia. En los tallos no hubo ninguna

diferencia, ya que sobrevivieron en su totalidad en ambas concentraciones de BAP por lo que pudimos determinar que esta citocinina no interfiere en su supervivencia.

Ruiz (2000) señala, que el grado de oxidación encontrado durante el proceso de inducción de organogénesis indirecta se debe al efecto del estado fisiológico del explante y la concentración de BAP.

La figura siguiente, muestra que la posibilidad de supervivencia se mantiene constante para los tallos a pesar del cambio de concentración de 2,4-D. Sin embargo, en las hojas la mayor posibilidad de supervivencia se presentó en 5 y 10 [mg/l] de concentración de 2,4-D, siendo el máximo 5 [mg/l] con una posibilidad de supervivencia de 65%.

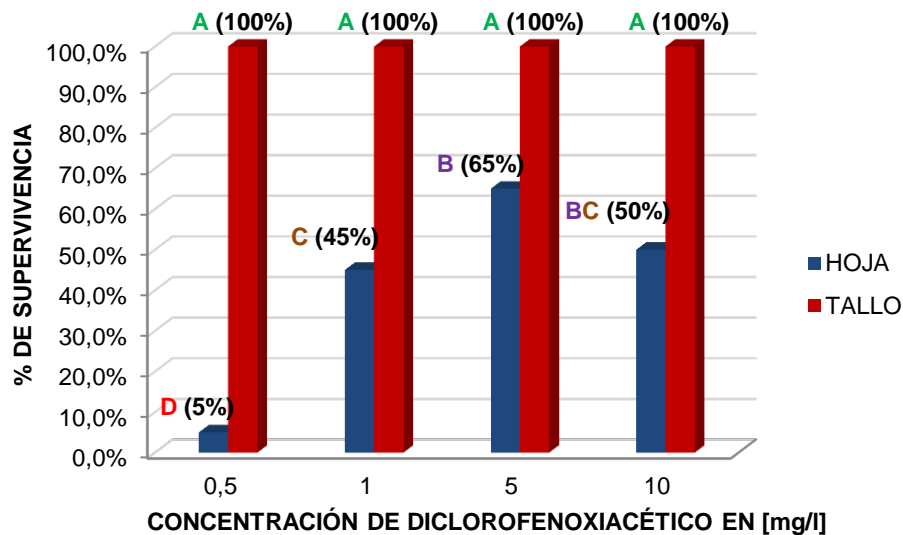


Figura 25. Efecto 2,4-D en la supervivencia de los explantes con análisis de Duncan $\alpha=0.05^*$.

*Resultados de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan con un $\alpha=0.05$, donde letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Así, se determinó que la concentración de auxina tiene influencia en la supervivencia de las hojas, a diferencia de los tallos que no les afectó las diferentes concentraciones de auxina que se aplicó.

De tal modo, también se evidencio que las hojas sobreviven menos en oscuridad por lo que requieren estar en condiciones luz para que haya una mejor interacción con el 2,4-D. Así, Sadino (2015), menciona que los cultivos establecidos sin luz tienden a necrosarse.

4.3 COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE LUZ Y OSCURIDAD

La tabla 35, presenta la comparación de resultados en ambientes luz y oscuridad, observados para las variables de evaluación formación de callo, inicio de formación de callo, peso fresco de callo, cantidad de callos, y supervivencia de los explantes (hoja y tallo). De esta manera a nivel general se han observado las siguientes diferencias:

- La formación de callos en tallos fue de hasta un 30% en presencia de luz y hasta un 25% en oscuridad a la aplicación de 0,5 [mg/l] de 2,4-D. La formación de callos en hojas fue de hasta 40% y 30% en presencia de luz; y en oscuridad 5% a concentraciones de 5 y 10 [mg/l] de 2,4-D. Por lo que, se llega a inferir que la formación de callos fue superior en presencia de luz que en oscuridad; asimismo se ha tenido mejores rendimientos de formación de callos en hojas que en tallos en presencia de luz, contrario a lo sucedido en oscuridad.
- Para el inicio de formación de callos en tallos y en presencia de luz, la formación más temprana se dio a los 137 días, mientras que en oscuridad se inició 144,25 días, en ambos casos este mejor resultado se expresó bajo la acción de 0,5 [mg/l] de 2,4-D. Por otro lado, en hojas el inicio de formación más temprano se dio después de 136 y 143 días en presencia de luz; mientras que recién se dio esta respuesta a los 175,85 y 174,80 días en condiciones de oscuridad todos con la aplicación de 5 y 10 [mg/l] de 2,4-D respectivamente. Así se puede deducir que se inició de manera más temprana la formación de callos en condiciones de luz comparado

con la oscuridad. Incluso se observó que bajo algunas concentraciones de BAP, 2,4-D y un explante respectivo, se puede observar el inicio de formación de callos de manera más temprana aun en condiciones de luz, de esta manera se observó el inicio de formación de callos en tallos a 108 días con 1 [mg/l] de BAP y 0.5 de 2,4-D, mientras que en hojas se reduce a 119 con 1 [mg/l] de BAP y 5 de 2,4-D.

- En tallos se observó el mayor peso fresco de callos en presencia de luz con 1,2 [g], mientras que en oscuridad este tejido generó un peso fresco de callo de 0,8 [g]. En cambio, el explante hojas obtuvo sus mayores pesos frescos de callos de 3,95 [g] y 1,85 [g] en presencia de luz; y 0,1 [g] y 0,05 [g] en oscuridad cuando se combinaron con 5 y 10 [mg/l] de 2,4-D respectivamente. Por tanto, el peso de los callos es menor en oscuridad. La particularidad en hojas es evidente con relación al peso, debido a que en presencia de luz se observó mayor incremento de peso.

- La supervivencia a la formación de callos en tallos es del 100% en los ambientes luz y oscuridad. Sin embargo, la supervivencia mayor a la formación de callos en hojas fue de 90% en presencia de luz y 65% en oscuridad cuando interactuaron ambos con 5 [mg/l] de 2,4-D. Por tanto, existiría mayor supervivencia en la formación de callos en presencia de luz en hojas.

Tabla 35. Tabla comparativa de resultados sobresalientes entre condiciones de luz y oscuridad

		Luz		Oscuridad	
		Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
Formación	2,4-D	40% (5[mg/l]) 30% (10[mg/l])	30% (0,5[mg/l])	5%(5[mg/l]) 5%(10[mg/l])	25%(0,5[mg/l])
Inicio de Formación (180 días)	2,4-D	136 días (5[mg/l]) 143 días (10[mg/l])	137 días (0,5[mg/l])	175,85 días (5[mg/l]) 174,10 días (10[mg/l])	144,25 días (0,5[mg/l])
	2,4-D y BAP	119,10 días (5[mg/l]) y (1[mg/l]) 131 días (10[mg/l]) y (0,1[mg/l])	108 días (0,5[mg/l]) y (1[mg/l])		
Peso	2,4-D	3,95 g (5[mg/l]) 1,85 g (10[mg/l])	1,2 g (0,5[mg/l])	0,1 g (5[mg/l]) 0,05 g (10[mg/l])	0,8 g (0,5[mg/l])
Número	2,4-D	6,25 callos (5[mg/l]) 2,5 callos (10[mg/l])	0,3 callos (0,5[mg/l])	0,05 callos (5[mg/l]) 0,04 callos (10[mg/l])	0,25 callos (0,5[mg/l])
Supervivencia	2,4-D	90% (5[mg/l])	100% (0,1, 1, 5, 10[mg/l])	65% (5[mg/l])	100% (0,1, 1, 5, 10[mg/l])

5. CONCLUSIONES

- Durante la experimentación se logró determinar que ambos explantes fueron capaces de generar callos y que reaccionaron uno mejor que otro de acuerdo a la condición lumínica a la que fueron sometidas, pero en general la hoja fue el explante que obtuvo mejores resultados por lo que resultó ser el explante más adecuado para la obtención de callos de *Phalaenopsis* variedad híbrida *pha.taisuko lady x dtps taisuko red lip*.
- Se ha determinado la concentración óptima de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP donde:
 - En tallos, la concentración óptima de reguladores de crecimiento aplicable es de 0,5 [mg/l] de 2,4-D; y en la combinación de 0,5 [mg/l] de 2,4-D más 1 [mg/l] de BAP.
 - En hojas, las concentraciones óptimas de reguladores de crecimiento son 5 [mg/l] o 10 [mg/l] de 2,4-D; y las combinaciones de reguladores de crecimiento óptimas son 5 [mg/l] de 2,4-D más 1 [mg/l] de BAP ó 10 [mg/l] de 2,4-D más 0,1 [mg/l] de BAP para la formación de callogénesis en *Phalaenopsis*.
- El uso del 2,4-D resultó ser fundamental, debido a que fue el regulador de crecimiento que mostró diferencias estadísticas para la inducción a la formación de callos y ejerció efecto en todas las variables. El BAP (1[mg/l]) tuvo un efecto más notorio para que pueda darse un inicio de formación más temprana.
- Además, es más efectiva la inducción a callogénesis en hojas, en presencia de luz ya que esta condición favorece a que las hojas obtengan un mayor porcentaje de formación de callos (40%), un inicio de formación más temprana (119 días), un mejor peso (3,95[g]), un mayor de número

de callos (6,25) y de supervivencia (90%), en relación a los resultados obtenidos en oscuridad.

- Por otro lado, bajo esta condición lumínica (luz) los callos obtenidos de hojas fueron capaces de formar brotes adventicios vía organogénesis indirecta, pero no puede descartarse que este suceso hubiese podido pasar en condiciones de oscuridad, ni tampoco que no pase en tallos, solo que para ello podrían haber necesitado más tiempo, para confirmar esto se requiere hacer más estudios.

- En los tallos si bien se obtuvieron mejores resultados en luz los porcentajes no variaron en gran medida en la formación de callos (30%) en relación a los resultados obtenidos en oscuridad (25%), al igual que en las demás variables. Por lo que, la condición lumínica no es un factor determinante para la obtención de callos en tallos, ni en su supervivencia ya que sobrevivieron un 100% en ambas condiciones lumínicas.

Por tanto, se ha logrado desarrollar el proceso de inducción a callogénesis *in vitro* de *Phalaenopsis* a partir de la experimentación en diferentes explantes (hojas y tallos), aplicando la variación de reguladores de crecimiento, como una base para la regeneración de vitroplantas.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar condiciones luz, cuando se trabaje con hojas de la orquídea *Phalaenopsis*.

- Es recomendable utilizar algún compuesto antioxidante en hojas de *Phalaenopsis*.

- Continuar con la investigación utilizando menores concentraciones de 2,4-D en el caso de los tallos.

- Evaluar concentraciones mayores a 1 [mg/l] de BAP ya que con la mayor concentración utilizada en el presente estudio se obtuvieron mejores resultados.
- Por otro lado, se recomienda seguir realizando estudios sobre la orquídea *Phalaenopsis* hasta la obtención de plantas *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrobiotecnología, (2014). *Biotecnología Vegetal*. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/In-Vitro-Agrobiotecnología>.

Arditti, J., & Ernest, R. (1993). *Micropropagation of orchids*. John Willey and Sons, New York, Estados Unidos. 681 p.

Arditti, J., & Krikorian, A. (1996). *Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators*. Botanical Journal of the Linnean Society 122: 183-241.

ASOCOA. (2013). *Orquídeas*. Obtenido de www.asocoa.com/plantas/orquídeas.asp

Azcon-Bieto, J., & Talon, M. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Editorial McGraw - Hill - Interamericana. Madrid, España. 385-432 p.

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

Bejarano, F. (2007). *2,4-D, Respuestas a preguntas frecuentes*. Razones para su prohibición mundial. Editorial Rapam. Texcoco, Mexico. 8 p.

Bhojwani, S.S., & Dantu, P.K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Editorial Springer India. New Delhi, India. 39-50 p.

Caraballo de la Peña, D. (2015). *“Cultivo de Callos in vitro a partir de las Hojas de Jodina rhombifolia Hook. & Arn. (Reissek) para Obtención de C-Glicosilflavonas”*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. 84-97p. Obtenido de sedeci.unlp.edu.ar/.../Facultad de ciencias Exactas/tesis

Chen, J., & Chang, W. (2004). *Induction of Repetitive Embryogenesis from Seed-Derived Protocorms of Phalaenopsis amabilis Var. Formosa Shimadzu. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40:290-293.

Chen, J., & Chang, W. (2006). *Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of Phalaenopsis amabilis. Biologia Plantarum* 50 (2):169-173.

Chen, W. H., Chen, T. M., Fu, Y.M., Hsieh. R.M., & Chen, W.S. (1998). *Studies on somaclonal variation in Phalaenopsis. Plant Cell Reports* 18: 7–13.

Chen, Y., Chang, C., & Chang, W. (2000). *A Reliave Protocol for Plant Regeneration from Callus Culture of Phalaenopsis. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 36:420-423.

Chin-Chi, L. (1986). *Invitro culture of flower stalk internodes of Phalaenopsis and Doritaenopsis. American Orchid Society* 1(3): 158-163

Córdova, A., Cobos, M., Imán, S., & Castro, J. (2014). *Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". Scientia Agropecuaria* 5. 25 – 34.

De Feira, M. (2007). *Establecimiento in vitro de Phalaenopsis. Biotecnología Vegetal.* 7(1): 27 - 33

EcuRed. (2012). *Cymbidium*. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Cymbidium>.

EcuRed. (2013). *ECURED, conocimiento en todos y para todos*. Obtenido de http://www.ecured.cu/index.php/Phalaenopsis_gigantea.

EcuRed. (2018). *6-N-Bencilaminopurina*. Obtenido de <http://www.ecured.cu/6-N-Bencilaminopurina>.

Elicriso. (2013). *Phalaenopsis*. Obtenido de <http://www.elicriso.it/es/orquideas-phalaenopsis/>

Elicriso. (2018). *Cattleya técnicas de cultivo*. Obtenido de <https://www.elicriso.it/orquideas/cattleya>.

Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Masapanta, C., & Delgado, H. (2012). *Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en Morus alba L.* Pastos y forrajes 35 (4):407-415.

Flor de Planta, (2016). *Orquídea mariposa (Phalaenopsis): Características y cultivo*. Obtenido de <https://www.flordeplanta.com.ar>

Floricultura, (2013). *Importancia de las Orquídeas Phalaenopsis*. Obtenido de Floricultura 34.blogspot.com

Freepik, (2019). *Orquídeas Blancas*. Obtenido de <https://www.freepik.es/vector-gratis/vector-orquideas-blanca>.

Galeon. (2013). *flores del Oriente, las orquideas*. Obtenido de floresorientegaleon.com/orquidea.htm

García, Q. (2014). *Curva de crecimiento*. Obtenido de microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html

Gonzales, O., Hernández, M., Silva, J., & Espinoza, A. (2011). *Evaluación de la dinámica del crecimiento in vitro en callos de Ipomoea batatas*. Rev. Colombiana de biotecnología. 13(1):148-155.

González, M., Morejón, R., & Portilla, M. (1998). Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo "in vitro" de ápices de *Coffea arábica* L. *Cultivos Tropicales* 19(2): 37-40.

Gow, W., Chen, J., & Chang, W. (2008). *Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of Phalaenopsis orchids*. *Acta Physiol Plant* 31:363–369.

Hernández, E., López, M., & Estrada, A. (2013). *Callogénesis de Heliconia collinsiana GRIGGS in vitro: establecimiento, inducción y proliferación*. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas* vol.4, no.8 pp. 1175-1186.

Homma, Y., & Tadashi, A. (1985). *New Means of Phalaenopsis Propagation with Internodal Section of Flower Stalk*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 54 (3): 379-387.

Hutchinson, M.J.; Onamu, R., Kipkosgei, L., & Obukosia, S.D. (2010). *Effect of thidiazuron, NAA and BAP on in vitro propagation of Alstroemeria aurantiaca cv. 'Rosita' from shoot tip explants*. *The Journal of Agriculture, Science and Technology*, 12(2): 60-69.

IMAC & Anthura. (2012). *Directrices del cultivo de Phalaenopsis en masa*.
Obtenido de <http://www.anthura.nl/uploads/downloads/manuals/es/Manual%20Phalaenopsis/%20SPA.pdf>

INTAGRI, (2015). *Las hormonas vegetales en plantas*. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/nutrición-vegetal/las-hormonas-veg...>

Ishii, Y., & Takamura, T. (1998). *Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports*.17: 446–450.

Islam, O., Ichihashi, S. (1999). *Effects of Sucrose, Maltose and Sorbitol on callus Growth and Plantlet Regeneration in Phalaenopsis, Doritaenopsis and Neofinetia*. J. Japan Soc. Hort. Sci. 68 (6): 1124-1131.

Jiménez, V., & Guevara, E. (1996). *Propagacion in vitro de Phalaenopsis (orchidaceae) mediante el cultivo de secciones de ejes florales despues de la senescencia de las flores*. Agronomía Costarricense 20 (1): 75-79.

Jiménez, H. (2018). *Las exportaciones de orquídeas crecieron*. Obtenido de <https://www.agronegocios.co/agricultura/las-exportaciones-de-orquideas...>

Kuo, H., Chen, J., & Chang, W. (2005). *Efficient Plant Regeneration through Direct Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of Phalaenopsis "Little Steve"*. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:453-456.

la Reserva. (2011). *La Fascinante orquidea "cabeza de pájaro"*. Obtenido de http://www.lareserva.com/home/orquidea_cabeza_pajaro

Lee, YI. & Lee, N. (2003). *Plant regeneration from protocorm-derived callus of Cypripedium formosanum*. *In vitro cellular & Developmental Biology-Plant* (39)5:475-479.

Lee, YI. & Yeung, EC. (2018). *Orchid Propagation: From Laboratories to Green houses-Methods and Protocols*. Editorial Humana Press. Nueva York, Estados Unidos. 101-118 p.

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginsky, L. (2010). *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*. Editorial INTA. Argentina. 18-33 p.

López, C. (2007). *Micropropagación de orquídeas del genero Phalaenopsis a partir de yemas florales*. Tesis de licenciatura en Agronomía. Universidad mayor de San Andres. La Paz, Bolivia. 38 p.

López, J. (2014). *Obtener una planta a partir de una hoja*. Obtenido de <https://jmmulet.naukas.com/2014/07/11/obtener-una-planta-partir-de-una-hoja/>

Martin, R., Chong, B., & Perez, N. (2015). *Organogénesis in vitro en el género Digitalis*. *Biotecnología Vegetal*. 15(4):195 - 206.

Martinez, M., Hernandez, C., & Respreto, L. (2007). *Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (Borojoa patinoi Cuatr.) fase I*. *Rev. Colombiana de Biotecnología*. 9(2): 45-55.

Morel, G. (1960). *Producing virus free Cymbidium*. *American Orchid Society Bulletin*. 29: 495-497.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture*. *Physiol. Plant*. 15:473-497.

Murray, W. (2006). *Introducción a la Botánica*. Editorial Pearson. Madrid, España.11:268-277

Namur, J. (2012). *Micropropagación Vegetal*. Obtenido de micropropagar.blogspot.com/

NINE ECIT. (2016). *Tipos de propagación CTV parte I*. Obtenido de https://youtu.be/yHuF_nPe1wk.

Park, Y.S., Kakuta, S., Kano, A. & Okabe M. (1996). *Efficient propagation of protocorm-like bodies of Phalaenopsis in liquid medium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 45: 79–85.

PortalFruticola, (2018). *Totipotencialidad, los cultivos de células vegetales y sus aplicaciones*. Obtenido de <https://www.portalfruticola.com/>

Plant Hormones, (2009). *6-Bencilaminopurina Hormona Reguladora del Crecimiento De Plantas Citoquinina 6-BAP*. Obtenido de www.bestplanthormones.com/plant...hormones/6-benzylaminopirine-plant-gro...

Probiotek, (2017). *Murashige and skoog (MS) medium*. Obtenido de <https://www.probiotek.com/productos/.../murashige-and-skoog-ms-mediu...>

Revista horticultivos, (2016). *La Micropropagación*. Obtenido de [Htp www horticultivos. Com/agricultura-protegida/plántulas/la-micropropagacion/](http://www.horticultivos.com/agricultura-protegida/plántulas/la-micropropagacion/).

Rico, L., & Ortega, A. (2017). *Paradojas de la ciencia: el polémico ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)*. *Ciencia y Desarrollo* 43(291): 106-111.

Rosas, R. (2018). *Efecto del Aguamiel–Pulque y Auxinas citocininas en la Inducción in vitro de PLBs en Phalaenopsis sp.* Tesis de licenciatura en Agronomía. Universidad Autonoma del Estado de Mexico. Toluca, México. 29 p. Obtenido de ri.uaemex.mx/handle

Rojas, D. (2014). *Propagación in vitro de la orquídea “Phalaenopsis violacea” a través de la vara floral*. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.16-17p. Obtenido de <https://www.scrib.com/document/Tesis-Propagacion-in-vitro-de-la-orqu...>

Ruiz, B. (2000). *Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de Anthurium andraeanum L.* Tesis de licenciatura en Agronomía. Zamorano, Honduras.19-24p. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/>.

Russ, F. (2010). *Mstat Program*. Obtenido de <https://www.msu.edu/~freed/disks.htm>

Sadino, M. (2015). *Estrategias de Cultivo e Inducción in vitro de Células de Aristotelia chilensis (MAQUI) para la Obtención de Antocianinas*. Tesis de licenciatura en Ingeniería Civil. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 13-33 p. Obtenido de repositorio.uchile.cl/handle

Sajise, J. U., & Sagawa, Y. (1991). *Regeneration of plantlets from callus and protoplasts of Phalaenopsis sp.* Malaysia Orchid Bull. 5:23-28.

Salgado, R. (2014). *La Propagación de Plantas in vitro un Éxito Biotecnológico*. Obtenido de [Htp www sabermas.umich.mx/.../153-la-micropropagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito](http://www.sabermas.umich.mx/.../153-la-micropropagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito).

Sannicolo, V. (2014). Orquídea *Phalaenopsis* luna blanca. Obtenido de <https://www.cepolina.com/po/palaeniosis-lua.html>

Sterling, T.M., Namuth, D., & Hernández-Ríos, I. (2005). Introducción a los mecanismos de acción de los herbicidas auxínicos-Parte 2. Library of Crop technology lessons modules. University of Nebraska, Lincoln. Obtenido de <http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmosule=1055959268>

Talavera, M., Santos, M., Rangel, N., Mendoza, M., Lobit, P., & Palacios, A. (2016). *Calidad de Luz Led y Desarrollo in vitro de Oncidium tigrinum y Laelia autummmalis (ORCHIDACEAE)*. Agrocienia 50: 1065-1080.

Tokuhara, K., & Masahiro, M. (2001). *Induction of Embryogenic Callus and Cell Suspension Culture from Shoot Tips Excised from Flower Stalk Buds of Phalaenopsis (Orchidaceae)*. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:457-461.

Torres, J. (1994). *Propagación In Vitro y por Estacas de Tallo del Nim*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, Mexico. 48 p. Obtenido de [eprints.uanl.mx/...](http://eprints.uanl.mx/)

UNAD. (2009). *Callogénesis en "Cultivo de Tejidos"*. Obtenido de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/203024/leccion_511_callognesis.html

Us. Dept. of State, Google. (2019). *Google Heart*. Obtenido de <http://www.google.com/intl/es/earth/index.html>

Vallejo, M. (2008). *Establecimiento in vitro de Dendrobium spp. a partir de explantes foliares*. Tesis de licenciatura en Agronomía. Zamorano, Honduras. 7-9 p. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/>.

Villalobos, I. & Arias, O. (1987). *Inducción y multiplicación de callos in vitro en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (Saccharum spp.)*. *Agronomía Costarricense* 11(1): 39-44.

ANEXO 1: ELEMENTOS DE LABORATORIO

Material de vidrio y de plástico

Nº	Nombre	Descripción
1	Erlenmeyer	Para preparar el medio
2	Mecheros	Para evitar la contaminación
3	Pipetas de 1, 5, 10 ml	Medir los reactivos
4	Micropipetas 5-50ul y 100-1000ul	Medir los reactivos
5	Vasos de precipitados	Para preparar el medio
6	Frascos	Para colocar las yemas
7	Tubos de ensayo	Para colocar el explante

Equipos

Nº	Nombre	Descripción
1	Agitador magnético	Para mezclar el medio
2	Autoclave	Para esterilizar el medio
3	Balanza analítica	Para pesar los reactivos
4	Cámara de flujo laminar	Para introducir el explante
5	Cámara fotográfica	Para sacar las fotos de los resultados
6	Termómetro	Para medir la temperatura
7	Timer (regulador de fotoperiodo)	Para regular el fotoperiodo
8	pHmetro	Para medir el pH
9	Microondas	Para calentar el medio

Reactivos

Nº	Nombre	Descripción
1	Medio Basal de Murashige&Skoog (MS) 1962.	Medio para orquídeas
2	Sacarosa	Azúcar
3	<i>Phytigel</i> TM (Agente gelificante que sustituye al agar)	Gelificar
4	NaOH 1N	Base para regular el pH
5	HCL 1N	Acido para regular el pH
6	BAP (Bencil amino purina)	Regulador de Crecimiento
7	2,4-D (Acido 2,4 diclorofenoxi acético)	Regulador de Crecimiento
8	Agua de coco	Tiene nutrientes para las orquídeas

Otros Materiales

Nº	Nombre	Descripción
1	Agua destilada	Para el medio
2	Alcohol 70% y 96%	Desinfección
3	Algodón	Para limpiar la cámara
4	Bisturíes	Cortar los explantes
5	Hipoclorito de sodio	Desinfección
6	Espátulas	Sacar los reactivos
7	Pinzas	Tomar los explantes

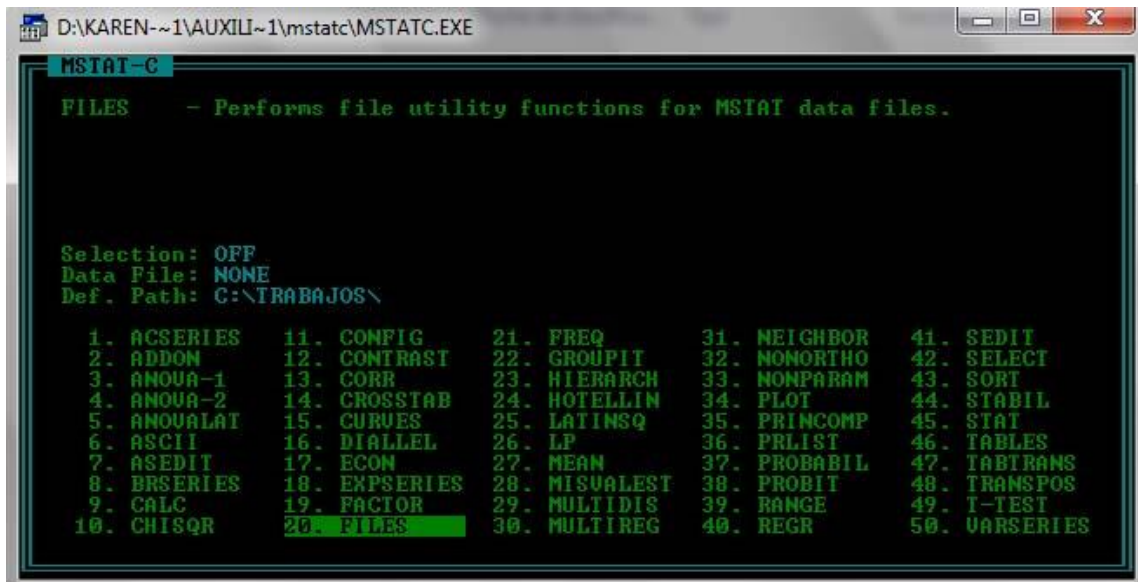
**ANEXO 2: COMPOSICIÓN DEL MEDIO BASAL DE CULTIVO UTILIZADO
MURASHIGE & SKOOG, 1962 (MS)**

Elementes esenciales	Medio basal MS [mg/l] (Murashing & Skoog, 1962)
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MgSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Fuente de hierro	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
Suplementos orgánicos	
Myoinositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.5
Glicina	2
Fuente de carbono	
Sacarosa	30000

Fuente: Elaboración en base a (Probiotek, 2017)

ANEXO 3: MSTAT -C

Interfaz usuario Mstat-C



The screenshot shows a window titled "MSTAT-C" with a command prompt interface. The window title bar includes the path "D:\KAREN~1\AUXILI~1\mstatc\MSTATC.EXE". The main content area displays the following text:

```
FILES - Performs file utility functions for MSTAT data files.
```

Selection: OFF
Data File: NONE
Def. Path: C:\TRABAJOS\
1. ACSERIES 11. CONFIG 21. FREQ 31. WEIGHBOR 41. SEDIT
2. ADDON 12. CONTRAST 22. GROUPIT 32. NONORTHO 42. SELECT
3. ANOVA-1 13. CORR 23. HIERARCH 33. NONPARAM 43. SORT
4. ANOVA-2 14. CROSSTAB 24. HOTELLIM 34. PLOT 44. STABIL
5. ANOVA-LAI 15. CURVES 25. LATINSQ 35. PRINCOMP 45. STAT
6. ASCII 16. DIALLEL 26. LP 36. PRLIST 46. TABLES
7. ASEDIT 17. ECON 27. MEAN 37. PROBABIL 47. TABTRANS
8. BRSERIES 18. EMPSERIES 28. MISVALEST 38. PROBIT 48. TRANSPOS
9. CALC 19. FACTOR 29. MULTIDIS 39. RANGE 49. T-TEST
10. CHISQR 20. FILES 30. MULTIREG 40. REGR 50. VARSERIES