



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

**Escuela de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**INFLUENCIA DE CONDICIONES DE ESTRÉS Y DE  
REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA  
INDUCCIÓN A EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN  
*Cattleya maxima* Lindl.**

*Tesis previa a la obtención del título de  
Ingeniero en Gestión Ambiental*

**Autor**

Iván Patricio Guachizaca Granda

**Director**

Ing. Augusta Yadira Cueva Agila

**Loja – Ecuador**

2011

## **CERTIFICACION**

Ingeniera  
Augusta Yadira Cueva Agila  
**DIRECTOR DE TESIS**

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por el Sr. Iván Patricio Guachizaca Granda, previo a la obtención del título de INGENIERO EN GESTION AMBIENTAL, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 12 de Enero de 2011

.....  
Ing. Augusta Yadira Cueva Agila  
**DIRECTOR DE TESIS**

## **AUTORIA**

La investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones de la presente tesis son de exclusiva responsabilidad del autor.

Iván Patricio Guachizaca Granda

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios, a mis padres, hermanas, sobrinos y a todos mis amigos de la Unidad de Fisiología Vegetal que con su incondicional apoyo me han ayudado a cumplir mis metas.

*Iván Patricio Guachizaca Granda*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Técnica Particular de Loja, al personal docente de la carrera de Gestión Ambiental, que con sus enseñanzas han contribuido a mi formación como profesional.

A la Unidad de Fisiología Vegetal del Instituto de Ecología, por abrirme las puertas, contribuir en mis conocimientos como estudiante y brindarme el apoyo en la realización de mi proyecto de fin de carrera.

A, Augusta, Rosita, Máximo, Elizabeth, Silvia, Adriana y todos los becarios que conforman la Unidad de Fisiología Vegetal por su constante apoyo y orientación en la realización de mi trabajo.

*Iván Patricio*

## **CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS**

Yo, Iván Patricio Guachizaca Granda declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad, la propiedad intelectual de las investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico, o institucional (operativo) de la Universidad”.

Iván P. Guachizaca Granda  
**AUTOR**

Ing. Augusta Cueva Agila  
**DIRECTOR DE TESIS**

## INDICE

### Índice de contenidos

Pág.

CERTIFICACIÓN .....	I
AUTORÍA .....	II
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS .....	V
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
METODOLOGÍA .....	8
RESULTADOS .....	10
DISCUSIONES .....	14
BIBLIOGRAFIA .....	19
ANEXOS .....	25
<b>Anexo 1.</b> Detalles del diseño experimental .....	25

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efectos de 2,4-D y TDZ sobre la formación de callos en <i>Cattleya maxima</i> .....	10
<b>Tabla 2.</b> Efecto combinado del pretratamiento de estrés con 2,4-D en la formación embriogénica a partir de protocormos de <i>Cattleya maxima</i> .....	12

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de <i>Cattleya maxima</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Distribución espacial de <i>Cattleya maxima</i> en el Ecuador .....	6
<b>Figura 3.</b> Esquema de desinfección y siembra de <i>Cattleya maxima</i> .....	8
<b>Figura 4.</b> Desarrollo de los protocormos de <i>C. maxima</i> en el tratamiento testigo y en 2 mg/l de TDZ .....	11
<b>Figura 5.</b> Desarrollo de los protocormos de <i>C. maxima</i> en el tratamiento estrés 0.3M NaCl por 6h + 0.1 mg/l de 2,4-D y 0.3M NaCl 6h .....	13

## RESUMEN

Debido a las exigencias del medio ambiente para el desarrollo natural de las orquídeas y a su creciente demanda ornamental, ésta familia ha sido catalogada como una de las que enfrenta mayor grado de amenaza en el país. El objetivo de este estudio fue evaluar doce combinaciones de reguladores de crecimiento 2,4-D/TDZ y tres tipos de sustancias para inducir o provocar estrés: Sorbitol (0.4M) por 2h y 4h, Cloruro de Sodio (0.3M) y Cloruro de Cadmio (0.6mM) por 6h y 12h; cultivados en medio MS½ con y sin 0.1 mg/l de 2,4-D, todos estos comparados con un tratamiento testigo en protocormos de *Cattleya maxima*, una orquídea nativa del Ecuador. Los protocormos dieron un 42% de formación de callos embriogénicos en medio MS½ libre de reguladores de crecimiento vegetal, mientras que en el tratamiento con estrés durante 6 horas con 0.3M de NaCl mostró un 96% de callo. Por otro lado, el tratamiento suplementado con 2 mg/l de TDZ dio un promedio de 21 embriones somáticos por callo, en tanto el tratamiento de 6 horas con 0.3M NaCl y libre de reguladores de crecimiento mostró un promedio de 31 embriones somáticos por callo. El procedimiento descrito permitió obtener un mayor número de embriones somáticos en la mejora de la propagación clonal de esta especie de orquídea.

**Palabras clave:** Embriogénesis somática, reguladores de crecimiento, 2,4-D, TDZ, Sorbitol, CdCl, NaCl.

**Siglas:** 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético; TDZ - Thidiazuron (1-phenyl1-3-(1, 2, 3-tiadiazol-5-il)-urea); MS - Murashige y Skoog (1962); NaCl – Cloruro de Sodio; CdCl – Cloruro de Cadmio.



## ABSTRACT

Orchidaceae, the largest vascular plant family in Ecuador, are at risk of extinction due to habitat loss caused by a high rate of deforestation. It was therefore deemed important to establish an efficient way of clonal propagation based on somatic embryogenesis. To this end, in the present study we evaluated the influence of twelve combinations of growth regulators 2,4-D/TDZ and three kinds of stress on free hormone and 0.1 mg/l 2,4-D containing ½ MS medium compared with a control treatment on somatic embryogenesis induction in protocorms of *Cattleya maxima*, a native Ecuadorian orchid. Protocorms give 42% of embryogenic calli on ½ MS medium, however, this percentage was considerably increased (96%) when protocorms were stressed for 6 hours with 0.3M NaCl and cultured on ½ MS medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D. With the methodology described in this work we can obtain a high number of somatic embryos improving significantly the clonal propagation of this orchid.

**Keywords:** Somatic embryogenesis, growth regulators, 2,4-D, TDZ, Sorbitol, CdCl, NaCl.

**Abbreviations:** 2,4-D - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; TDZ – Thidiazuron (1-phenyl1-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea); MS – Murashige and Skoog (1962) medium; NaCl - Sodium Chloride; CdCl - Cadmium Chloride.

## INTRODUCCIÓN

El Ecuador es considerado un país megadiverso debido a la variabilidad de sus ecosistemas. Tomando en cuenta su extensión, éste alberga mayor cantidad de especies de animales y plantas por km<sup>2</sup> que el resto de países en el mundo (Mantareys, 2004). La familia Orchidaceae en el Ecuador, es la más numerosa de entre todas las plantas vasculares, con cerca de 4.000 especies de orquídeas catalogadas (Dodson y Escobar, 2005; Rivas, 2009), de las cuales 1.318 (40%) son endémicas (Jorgensen y León-Yáñez, 1999).

Según el libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador, la familia Orchidaceae es una de las más vulnerables del país, debido a presiones antropogénicas como: la destrucción de su hábitat y la gran extracción de especímenes de los bosques provocada por el gran interés comercial que ha despertado desde hace muchos años (Ávila y Salgado, 2006; Dodson, 2004).

Según Hágsater et al., (2005), las orquídeas son plantas con gran diversidad en su morfología floral que ha sido alcanzada debido a la evolución provocada por la necesidad de atraer a los polinizadores y con ello poder producir semillas y perpetuar la especie. Estas plantas se han podido establecer en casi todos los ambientes de la tierra, con excepción en los desiertos y polos, gracias a sus adaptaciones para soportar distintas condiciones ambientales. Las orquídeas, por esta variabilidad genética, tienen una gran importancia ecológica, tanto para la flora como para la fauna silvestre (Ossenbach et al., 2007).

Las semillas de las orquídeas son tan diminutas como el polvo y contienen pocas reservas de alimento (Mckendrick, 2000), tienen un peso aproximado de 0.001 mg. (Herrera y Pellmyr, 2002), son semillas fácilmente transportables por el viento, con una producción extremadamente numerosa (en un solo evento de polinización, con un solo polinia depositado en el estigma de una flor compatible pueden producirse millones de semillas viables). Normalmente éstas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorrízico, el mismo que le provee de azúcares y nutrientes que necesita la planta para su crecimiento inicial, esto provoca que los

porcentajes de germinación en condiciones naturales sean muy bajos (Mckendrick, 2000).

Un género representativo de la familia orchidaceae es *Cattleya*, tiene 53 especies con distribución intercalada en Sudamérica tropical (Dodson y Escobar, 2005). Se reconoce por sus pseudobulbos cilíndricos y apicales, de hojas gruesas y una inflorescencia en ráncimo dando lugar a majestuosas flores vistosas de gran tamaño (Dodson y Dodson, 1989), por las cuales es muy apreciado y codiciado.

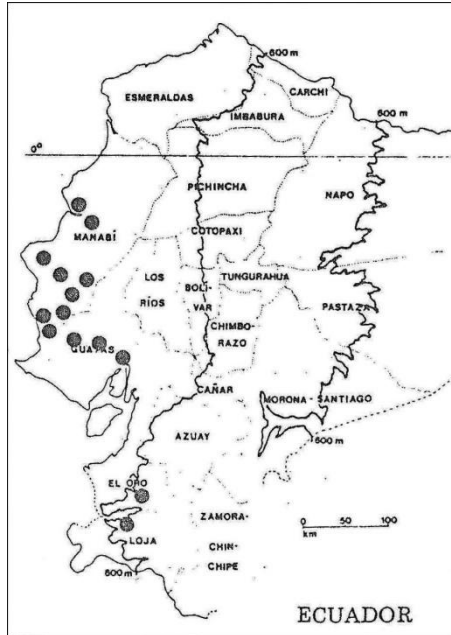
Según el Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador (1999), el género *Cattleya* cuenta con tres especies nativas para el país, de las cuales ninguna se encuentra bajo amenaza, estas especies son: *Cattleya iricolor* Rchb.f., *Cattleya maxima* Lindl. y *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe.

*Cattleya maxima* fue descrita por primera vez por el Dr. John Lindley, esta es una especie epífita, ocasionalmente litófito. Se encuentra distribuida en Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (Dodson y Escobar, 2005). Lindley la describió como una planta caracterizada por poseer pseudobulbos, hojas gruesas, una inflorescencia en ráncimo de 5-13 flores grandes de color rosado-lila con una vaina en la base, por lo general las flores son grandes y vistosas (Dodson y Escobar, 2005) y con producción de miles de semillas por cada evento de polinización (Figura 1).



**Figura 1.** *Cattleya maxima* **a)** Morfología de la especie según Dodson y Dodson (1989), Datos no publicados **b)** Flores de plantas del invernadero de la UTPL, Fotografía de Alejandra Díaz. **c)** Semillas de *Cattleya maxima*.

*Cattleya maxima*, es una especie epífita nativa de la Costa y de los Andes ecuatorianos donde generalmente se distribuye en los bosques húmedos, con menor distribución en los bosques secos de la costa ecuatoriana; en un rango altitudinal que va desde los 0 – 1.500 m s.n.m. Esta especie se la encuentra en las provincias del Oro, Guayas, Loja y Manabí (Jorgensen y León, 1999) (Figura 2).



**Figura 2.** Distribución espacial de *Cattleya maxima* en el Ecuador según Dodson y Dodson (1989), Datos no publicados.

La intensa presión que han sufrido las zonas tropicales en las últimas décadas ha conducido a la desaparición de algunas especies y a poner a otras en peligro de extinción; específicamente *Cattleya maxima*, antiguamente muy común en las regiones secas de la costa, ahora es escasa debido a la persecución por los coleccionistas (Dodson, 1989). La fuerte presión antrópica en los ecosistemas ecuatorianos, junto a los bajos porcentajes de germinación que presentan las orquídeas en condiciones naturales (Dodson y Escobar, 2005); hace necesario el desarrollo de técnicas de conservación *ex situ* en el país.

Una técnica de conservación *ex situ*, es la regeneración *in vitro*, que nos permite una rápida multiplicación de especies en espacios reducidos (Martínez et al., 2003). La embriogénesis somática, un método de propagación escasamente utilizado en el país, es una importante vía para la producción de plantas *in vitro* a gran escala (Guerra et al.,

2001), especialmente cuando se trabaja con especies con número de individuos muy bajos en condiciones naturales.

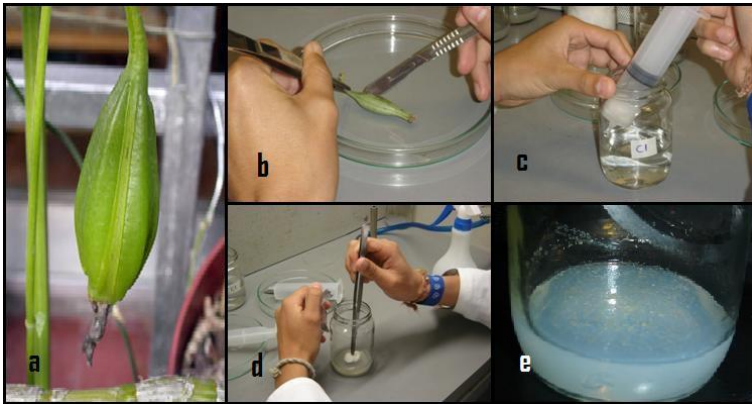
La embriogénesis somática es un proceso en el cual una sola célula o grupo de células producen embriones no cigóticos -somáticos- capaces de germinar para formar plantas completas (Razdan, 2002). A pesar de que el cultivo de embriones somáticos y cultivos de células, presenta la posibilidad de producir plántulas anormales debido a la variación somaclonal, un número cada vez mayor de especies se producen con éxito por estos métodos (Ammirato, 1987).

Como se mencionó anteriormente, *Cattleya* es uno de los géneros más populares y económicamente importantes, por esta razón varias técnicas han sido desarrolladas a través del cultivo de tejidos para este género (Arditti, 2008; Krapiec et al., 2003); sin embargo, protocolos efectivos en embriogénesis somática han sido descritos solo para algunas orquídeas híbridas de los géneros *Oncidium*, *Cymbidium* y *Phalaenopsis* (Ishii et al., 1998; Tokuhara y Mii, 2001; Chen y Chang, 2001, 2003; Huan et al., 2004, Chung et al., 2007; Hong et al., 2008) y para el género *Cattleya*, no existen protocolos establecidos.

En el presente estudio se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal y condiciones de estrés sobre la inducción a embriogénesis somática de *Cattleya maxima* Lindl, con el fin de ser aprovechada como especie modelo para la propagación de especies de la familia Orchidaceae difíciles de propagar en condiciones naturales o mediante formas de propagación *in vitro* convencionales.

## METODOLOGIA

Cápsulas cerradas con semillas maduras en su interior de *C. maxima* se colectaron en el invernadero de la Universidad Técnica Particular de Loja, y luego de un proceso inicial de desinfección (Lavado superficial con el desinfectante Germidal) se almacenaron en sobres de papel absorbente a temperatura ambiente, por el lapso de 4 días antes de su siembra. Las semillas fueron sometidas a un proceso de desinfección (Inmersión durante 3 minutos en hipoclorito de sodio comercial diluido al 1%, seguido de lavado con agua destilada estéril) y sembradas en medio de cultivo Knudson C (1946) al 50%, suplementado con (g/l): 20 sacarosa y 7 Agar (Figura 3). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 con 1M de NaOH antes del autoclavado, durante 20 minutos a 121 ° C (1 Bar de presión).



**Figura 3.** Esquema de desinfección y siembra de *Cattleya maxima*. **a)** Cápsulas de *Cattleya maxima* al momento de la colección. **b)** Apertura de las cápsulas para la colección de semillas **c)** Lavado de las semillas en una solución de hipoclorito de sodio comercial diluida al 5%. **d)** Siembra de las semillas en el medio de cultivo Knudson C 50% **e)** Semillas en los frascos de cultivo.

Luego de la germinación, los protocormos se cultivaron por un período de 201 días, bajo las siguientes condiciones de cultivo: temperatura promedio de 21° C, humedad promedio de 65-75% y un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad con lámparas fluorescentes de 40 W; las mismas condiciones se utilizaron para la germinación.

Para evaluar la influencia de los reguladores de crecimiento vegetal, el medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (MS $\frac{1}{2}$  - MS con la mitad de sales minerales) suplementado con 12 combinaciones: 0/2; 0/0.1; 0/0.3; 0.01/0.01; 0.01/0.1; 0.01/0.3; 0.01/0; 0.03/0.01; 0.05/0.01; 0.3/0; 0.1/0; 1/0 mg/l de 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) / Thidiazuron (TDZ) respectivamente.

En los tratamientos para inducir a estrés se evaluó: estrés osmótico y estrés por metales pesados. Los protocormos se sumergieron en medio MS líquido con: sorbitol 0.4M por 2 y 4 horas; NaCl 0.3M y CdCl 0.6mM por 6 y 12 horas respectivamente. Los explantes se mantuvieron bajo estas condiciones de estrés en un agitador rotatorio (75 rpm) durante los tiempos establecidos. Después de este período los protocormos se lavaron con medio MS $\frac{1}{2}$  líquido y se transfirieron a medio MS $\frac{1}{2}$  sólido libre de hormonas y MS $\frac{1}{2}$  suplementado con 0.1 mg/l de 2,4-D.

Para todo el estudio se realizaron cuatro repeticiones (cajas petri) por tratamiento, con 20 protocormos por repetición. Las observaciones de la formación de callo y el conteo de número de embriones por callo se realizó bajo un estereoscopio (Thomas Científico 1200Z). Las diferencias entre medias se obtuvieron con la prueba de Duncan (Duncan, 1955, sobre XLSTAT, 2008).



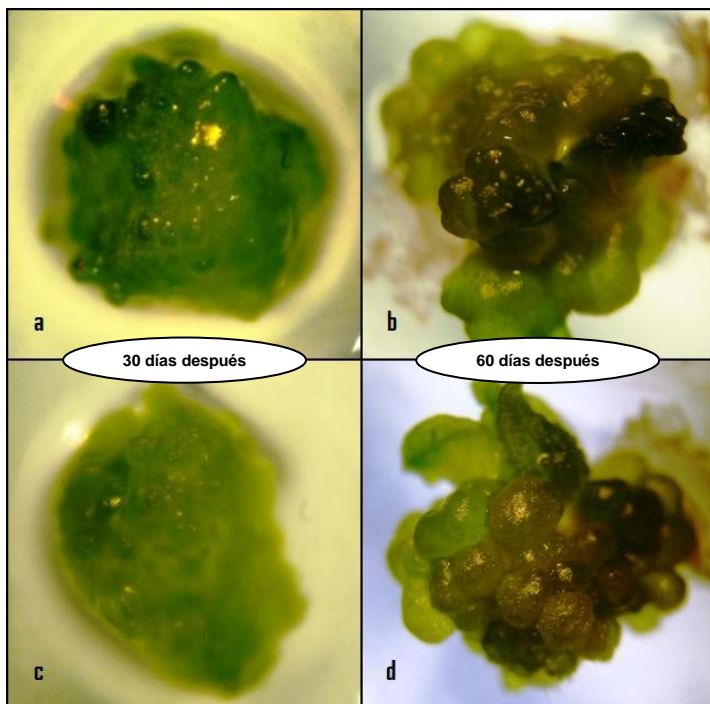
## RESULTADOS

Las semillas de *C. maxima* mostraron un porcentaje del 50% de germinación en medio de cultivo Knudson C después de los 30 días de cultivo.

En los tratamientos con reguladores de crecimiento a los 60 días de cultivo se observó un porcentaje de formación de callo entre 8 – 42% y un rango de 4 – 21 embriones por callo, los resultados finales se muestran en la Tabla 1 y Figura 4.

**Tabla 1.** Efectos de 2,4-D y TDZ sobre la formación de callos embriogénicos en *Cattleya maxima*. Datos registrados a los 60 días de cultivo. Los promedios van seguidos por una letra dentro de la misma columna que muestran si son o no significativamente diferentes (prueba de Duncan  $p < 0,05$ ).

Reguladores de Crecimiento mg/l		Callos Embriogénicos (Porcentaje) Media ± Error Estándar	Número de Embriones (Explantos <sup>-1</sup> ) Media ± Error Estándar
2,4-D	TDZ		
0	2	23 ± 4 bc	21 ± 3 a
0	0.1	19 ± 5 c	20 ± 2 a
0	0.3	30 ± 3 bc	14 ± 2 ab
0.01	0.01	23 ± 5 bc	19 ± 1 a
0.01	0.1	27 ± 4 bc	16 ± 1 ab
0.01	0.3	22 ± 1 bc	17 ± 2 ab
0.01	0	25 ± 3 bc	16 ± 1 ab
0.03	0.01	26 ± 5 bc	16 ± 2 ab
0.05	0.01	26 ± 1 bc	18 ± 2 ab
0.3	0	33 ± 2 ab	9 ± 5 bc
0.1	0	29 ± 6 bc	10 ± 2 bc
1	0	8 ± 3 d	4 ± 1 c
<b>Control</b>		42 ± 3 a	17 ± 3 ab

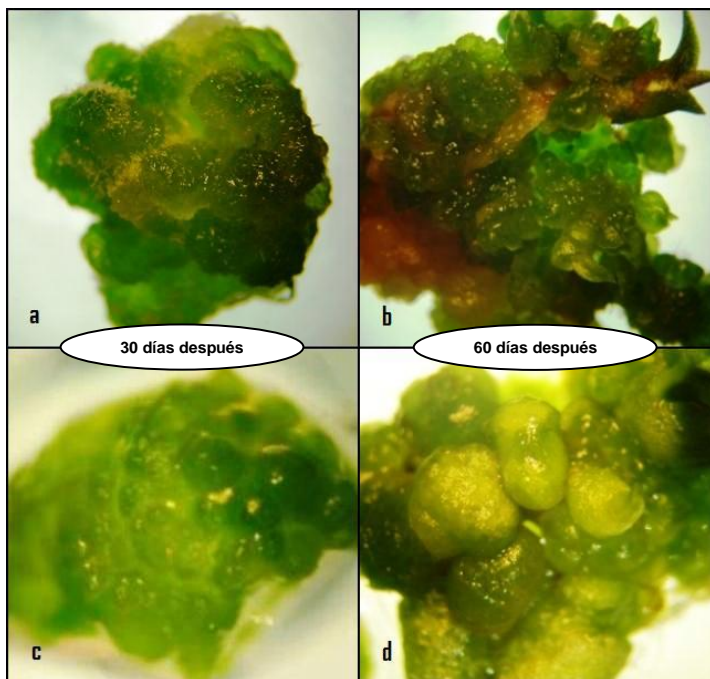


**Figura 4.** Desarrollo de los protocormos en *C. maxima*. **a y b)** Protocormos en medio MS½ sin reguladores de crecimiento. **c y d)** Protocormos en medio MS½ suplementado con 2 mg/l de TDZ.

Para los tratamientos con estrés se observó respuesta de formación de callo en un rango que va desde los 13 – 96% a los 60 días después de su siembra en medio con y sin 2,4-D. Mientras que para el número de embriones, mostraron un rango que va desde 11 – 31 embriones por callo a los 60 días después de su siembra. Ver Tabla 2 y Figura 5, donde se muestran las combinaciones y los resultados de los tratamientos de estrés.

**Tabla 2.** Efecto combinado del pretratamiento de estrés con 2,4-D en la formación de callos embriogénicos a partir de protocormos de *Cattleya maxima*. Datos registrados a los 60 días después de la siembra. Los valores van seguidos por una letra dentro de la misma columna, la que muestra si son o no significativamente diferentes (prueba de Duncan  $p < 0,05$ ).

Tratamientos de Estrés			Callos Embriogénicos (Porcentaje) Media $\pm$ Error Estándar	Número de Embriones (Explantos -1) Media $\pm$ Error Estándar
Tipos de Estrés	Duración del Tratamiento de Estrés (h)			
<b>Con 2,4-D</b>	0.4M Sorbitol	2	79 $\pm$ 6 b	20.8 $\pm$ 3 ab
	0.4M Sorbitol	4	53 $\pm$ 6 cd	11.2 $\pm$ 11 ab
	0.3M NaCl	6	96 $\pm$ 2 a	20.7 $\pm$ 8 ab
	0.3M NaCl	12	61 $\pm$ 9 c	18.7 $\pm$ 7 ab
	0.6mM CdCl	6	19 $\pm$ 3 f	0
	0.6mM CdCl	12	0	0
<b>Sin 2,4-D</b>	0.4M Sorbitol	2	18 $\pm$ 3 f	29.6 $\pm$ 6 a
	0.4M Sorbitol	4	26 $\pm$ 2 de	31.1 $\pm$ 11 a
	0.3M NaCl	6	36 $\pm$ 3 de	31.3 $\pm$ 2 a
	0.3M NaCl	12	44 $\pm$ 8 de	0
	0.6mM CdCl	6	13 $\pm$ 5 f	13.0 $\pm$ 13 ab
	0.6mM CdCl	12	0	0
<b>Control</b>			40 $\pm$ 3 cd	27.3 $\pm$ 3 a



**Figura 5.** Desarrollo de los protocormos en *C. maxima* en el tratamiento estrés 0.3M NaCl por 6h + 0.1 mg/l de 2,4-D (a y b) y 0.3M NaCl 6h (c y d).

## DISCUSIONES

### *Cattleya maxima* presenta 50% de germinación en un medio de cultivo simple.

En el medio de cultivo Knudson C (1946) *Cattleya maxima* alcanzó 50% de germinación después de 30 días de cultivo. Según Singh (1993), muchas especies pueden proliferar muy bien en medios simples como el Knudson C (1946), pero otras como las pertenecientes al género *Cattleya* requieren de medios más complejos para la germinación. Datos de germinación (37%) para *Cattleya warnerii* (Leite y Hebling, 2007) confirman la afirmación de Singh, sin embargo para *Cattleya maxima* nuestro estudio presentó un mejor porcentaje de germinación, utilizando el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones de luminosidad; demostrando que esta especie del género *Cattleya* puede presentar buenos porcentajes de germinación en un medio de cultivo simple.

### *La sacarosa, probable factor inductor de embriogénesis somática.*

Al evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal, la mayor tasa de formación de callo embriogénico (42%) se presentó en un medio de cultivo MS½ libre de reguladores de crecimiento, con 20 g/l de sacarosa.

Generalmente la embriogénesis somática está condicionada por la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citoquininas, pero se puede desencadenar (si el explanto es inmaduro) en ausencia de los mismos, tanto en angiospermas (Fernández-Guijarro, 1997) como en gimnospermas (Lelu et al., 1999).

Hong et al., (2008) en *Oncidium* cvs Gower Ramsey reporta similares respuestas, 50% de embriogénesis, al suplementar el medio de cultivo con 20 g/l de sacarosa libre de reguladores de crecimiento. Chen y Chang (2001), mostraron que en explantes de hojas son capaces de formar embriones somáticos en un medio MS½ libre de hormonas. En *Arabidopsis thaliana* los azúcares son incluidos en los medios de cultivo debido a que inducen el desarrollo directo e indirecto de embriones somáticos (Wu et al., 1992; Gaj, 2001). Similares respuestas han sido reportadas al emplear la sacarosa

en medios de cultivo para la inducción a la embriogénesis somática en *Asparagus officinalis* (Levi y Sink, 1990), *Cichorium ssp.* (Vasseur et al., 1995), *Triticum aestivum* (Barro et al., 1999), y *Pennisetum glaucum* (Oldach et al., 2001).

Estos estudios nos permiten hipotetizar que un posible factor inductor en nuestro primer ensayo es la sacarosa adicionada al medio de cultivo. La formación de callo embriogénico en protocormos ha sido ya reportado para *Cyrtochilum loxense*, orquídea endémica del Ecuador, utilizando el mismo medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (Cueva y González, 2009). Sin embargo dejamos planteada la necesidad de verificar la influencia de sacarosa y otros azúcares en la inducción de embriogénesis somática a partir de protocormos y otros explantes en especies de orquídeas del país.

#### Influencia del 2,4-D en la embriogénesis somática.

Las auxinas son consideradas los reguladores de crecimiento más importantes que regulan la inducción de embriogénesis somática (Thomas y Jiménez, 2005).

Como se muestra en la Tabla 1, la respuesta embriogénica de los protocormos cultivados en medio con 2,4-D, presentan diferentes respuestas; así, con 0,3mg/l 2,4-D la respuesta de formación de callo embriogénico es de 33%, que aunque no es significativamente similar a la respuesta del testigo, es uno de los porcentajes más altos en este primer ensayo. Sin embargo cuando la cantidad de 2,4-D incrementa a 1mg/l se observa una clara disminución de la formación de callo embriogénico (8%).

Ha sido establecido que esta auxina es un factor positivo en la inducción a la embriogénesis indirecta en algunas especies como *Arabidopsis thaliana* (Gaj, 2004), *Plantago hirtella* (González et al., 2006), y *Plantago major* (Rout et al., 2000). Específicamente para las monocotiledóneas, George (1996) menciona que la auxina más adecuada para la iniciación de callo es el 2,4-D; sin embargo para algunas orquídeas como *Oncidium 'Gower Ramsey'* el uso de 2,4-D con explantes de hoja como material de partida, tiene respuesta nula en la formación de embriones somáticos (Chen y Chang, 2001). Los reguladores de crecimiento vegetal exógenos son los responsables de varios procesos morfogénicos, entre los cuales está la formación de callo embriogénico (Rout et al., 2000); sin embargo, la concentración endógena de

auxinas en el explanto, el tipo de explanto y el estado fisiológico del mismo puede influir significativamente en este proceso (Ikeda et al., 2003). En ensayos realizados recientemente con segmentos de hojas de *Cattleya maxima*, no se observaron resultados en la inducción de embriones somáticos (Cueva et al., com. pers.); se atribuye la respuesta embriogénica encontrada al evaluar reguladores de crecimiento en el presente ensayo al tipo de explanto utilizado o como se ha mencionado anteriormente a la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo.

#### Influencia del TDZ en el número de embriones somáticos.

En *C. maxima*, hemos encontrado que el TDZ produce entre el 19-30% de formación de callo, sin embargo este valor no es significativamente similar al presentado por el testigo.

El mayor número de embriones somáticos (22) se dio en el tratamiento de 2 mg/l de TDZ. En explantes de hoja de *Oncidium* 'Gower Ramsey', el TDZ también estimuló la formación de embriones (Chen y Chang, 2001). También en este estudio se observó que TDZ estimuló la formación de embriones sin aumentar significativamente la formación de callos embriogénicos. En el tratamiento 0.1 mg/l de TDZ se obtuvo un total de 21 embriones por callo, por el contrario en *Phalaenopsis amabilis* TDZ a 0.1 mg/l indujo a 62.5% de formación de callo en los explantes de hojas y formaron un promedio de 6.6 embriones (Chen et al., 1999, Chen y Chang, 2001). Chen y Chang (2001), encontraron en hojas que el número promedio de embriones por explanto fue promovido por todos los tratamientos de citoquininas y el mejor (10.7) fue encontrado en un medio basal conteniendo 1 mg/l de TDZ; por consiguiente la formación de embriones fue promovida por TDZ.

Chen y Chang (2006), en *Phalaenopsis amabilis* demostró que con una concentración de 0.1, 1.0, 3.0 mg/l se obtiene un promedio de 6.6, 7.5 y 19.4 de embriones respectivamente. Chen y Chang (2001), en *Oncidium* 'Gower Ramsey' encontraron que en un medio basal libre de hormonas se puede obtener un promedio de 5.6 embriones

por explanto. En nuestro estudio obtuvimos un promedio de 17 embriones por callo en un medio libre de reguladores de crecimiento.

#### Influencia de los tratamientos de NaCl y CdCl en medio de cultivo libre de reguladores.

Kamada et al., (1989); Kiyosue et al., (1989); Harada et al., (1990); Kiyosue et al., (1990) y Kamada et al., (1993), reportan que en zanahoria (*Daucus carota*), una planta modelo de tratamiento de estrés; en un medio de cultivo libre de hormonas se puede inducir embriogénesis somática en presencia de sustancias químicas a concentraciones de 0.7M sacarosa, 0.3M NaCl ó 0.6mM CdCl.

Los tratamientos osmóticos y los de metales pesados, inducen a la formación de embriones somáticos en *Arabidopsis thaliana*, el estrés es el factor más importante que controla la inducción de embriones somáticos (Ikeda-Iwai et al., 2003). En el presente estudio se obtuvieron promedios de 31, 31, 30 y 27% en el número de embriones somáticos por callo, en los tratamientos 0.4M Sorbitol por 4 horas, 0.3M NaCl por 6 horas, 0.4M Sorbitol por 2 horas y control en medio de cultivo libre de reguladores, respectivamente.

Embriones somáticos fueron encontrados en *Arabidopsis thaliana* cuando se utilizó 0.7M de Sorbitol, 0.3M NaCl, 0.6mM de CdCl y transferidos a medio sólido B5 conteniendo 2,4-D. La frecuencia de la formación de embriones somáticos fue notablemente influenciada por la duración del cultivo bajo condiciones de estrés, por lo que este mismo autor concluye que el estrés: osmótico, por metales pesados e hídrico inducen a la formación de embriones somáticos en esta especie (Ikeda-Iwai et al., 2003).

En el presente estudio se evaluó también el efecto del Cloruro de Cadmio 0.6mM por 12 horas con y sin 2,4-D 0.1mg/l en medio de cultivo, dándonos como resultado la muerte de los explantes (datos no mostrados). Reducción de la formación de callos se observó también en el caso de los explantes de *A. thaliana* tratadas con sorbitol 0.7M durante más de 9 horas (Ikeda et al., 2003). Lichtenthaler (1998), menciona que la respuesta a condiciones de estrés depende de dos parámetros principales: el nivel de estrés y el estado fisiológico de las células; si el nivel de estrés es superior a la



tolerancia celular da como resultado la muerte celular y si por el contrario, se da en menores niveles de estrés da como resultado en el aumento del metabolismo e induce mecanismos de adaptación. Quiroz - Figueroa et al., (2006), mencionan que el estrés elevado puede causar que las células se mueran porque no son capaces de tolerar nivel altos de estrés.

*La combinación de Factores de Estrés y la adición de 2,4-D, mejora significativamente la formación de callos embriogénicos.*

Inductores de la embriogénesis somática incluyen la concentración de sacarosa, la presión osmótica y los metales pesados (Kiyosue et al., 1990.; Pasternak et al., 2002). El sorbitol habitualmente se utiliza en cultivos de tejidos vegetales por sus efectos osmóticos o morfogenéticos en el cultivo *in vitro* de plantas (Akula et al., 2000), en nuestro estudio al utilizar 0.4M de Sorbitol por 2 horas con 0.1 mg/l de 2,4-D se obtuvo un porcentaje de 78.75% de formación de callo. En 0.4M de Sorbitol por 2 y 4 horas, 0.3M NaCl 6 horas y 12 horas más 2,4-D hemos obtenido porcentajes de formación de callo de 78.8, 52.5, 96.3 y 61.3 respectivamente.

En conclusión, nuestros resultados muestran que en el caso de formación de callo embriogénico en protocormos de *Cattleya maxima* se produce en un medio MS suplementado con 20 g/l de sacarosa, éste aumenta significativamente cuando los protocormos son sometidos a un tratamiento de estrés osmótico en NaCl y cultivados en un medio de cultivo suplementado con 2,4-D. Como resultado, el procedimiento descrito permite obtener un mayor número de embriones somáticos en la mejora de la propagación clonal de esta especie de orquídea.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ammirato, P. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis: Plant Tissue and Organ Culture. Green, C.E. y col. (Eds). Alan R. Liss. Inc., New York. Pág: 57-81.
- Akula, A; Akula, C y Bateson, M. 2000. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant Growth Regulation*. 30: 241-246.
- Arditti, J. 2008. Micropropagation of Orchids. 2nd Edition. Blackwell Publishing.
- Ávila, I y Salgado, R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*. 8: 138-149.
- Barro, F; Martin, A; Lazzeri, P y Barceló, P. 1999. Medium optimalization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica*. 108: 161–167.
- Chen, J; Chang, C y Chang, W. 1999. Direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' and subsequent plant regeneration - *Plant Cell Rep*. 19: 143-149.
- Chen, J y Chang, W. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. Academia Sinica, Institute of Botany, 115, Taipei, Taiwan, Republic of China. *Plant Growth Regulation*. 34: 229-332.
- Chen, J y Chang, W. 2003. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. *Biologia Plantarum* 46: 455-458.

- Chen, J y Chang, W. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biología Plantarum* 50 (2): 169-173.
- Chung, H; Chen, J y Chang, W. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biología Plantarum* 51: 346-350.
- Cueva, A y González, Y. 2009. *In vitro* germination and somatic embryogenesis induction in *Cyrtorchilum loxense*, an endemic, vulnerable orchid from Ecuador. In: Pridgeon A M, Suarez JP (Eds) Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids. Universidad Técnica Particular de Loja, EC. 1: 56-62.
- Dodson, C y Dodson, P. 1989. Icones Plantarum Tropicarum: Series Fascicle *Cattleya*. Missouri Botanical Garden. 63166-0299. En Prensa.
- Dodson, C. 2004. Native Ecuadorian orchids. Volume V: *Rodriguezia-Zygosepalum*. Imprenta Mariscal. Quito, EC.
- Dodson, C y Escobar, R. 2005. Native Ecuadorian Orchids. Editorial Colina. Medellín, CO. 1: 11.
- Fernández-Guijarro, B. 1997. Embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.). Tesis Doctoral. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid, ES.
- Gaj, M. 2001. Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64: 39–46.
- Gaj, M. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27–47.

- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture. 2nd Edition. Exegetics Limited. England, UK. Page. 582-584.
- González, J; Oropeza, M; Vargas, T y García, E. 2006. Embriogénesis somática en dos especies del genero *Plantago* (*Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth). *Agronomía Trop.* 56(4): 689-695.
- Guerra, M; Vesco, L; Pierre, J; Nodari, R y Dos Reis, M. 2001. Somatic Embryogenesis In Goiabeira Serrana: Genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Ciencias Agrarias, Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil.* 12 pp.
- Hágsater, E; Soto, M; Salazar, G; Jiménez, R; López, M y Dressler, R. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, 304 pp.
- Harada, H; Kiyosue, T; Kamada, H y Kobayashi, T. 1990. Stress-induced carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seed. In *The Impact of Biotechnology in Agriculture* (Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S., Eds). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 129-157.
- Herrera, M y Pellmyr, O. 2002. *Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach.* Blackwell. Australia.
- Hong, P; Chen, J y Chang, W. 2008. Promotion of direct somatic embryogenesis of *Oncidium* by adjusting carbon sources. *Biologia Plantarum.* 52 (3): 597-600.
- Huan, L; Takamura, T y Tanaka, M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science* 166: 1443-1449.
- Ikeda-Iwai, M; Umehara, M; Satoh, S y Kamada, H. 2003. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* 34: 107-114.

- Ishii, Y; Takamura, T; Goi, M y Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 17: 446-450.
- Jorgensen, P. M. and León-Yáñez, S. (ed.) 1999. Catálogo de plantas vasculares del Ecuador. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Kamada, H; Kobayashi, K; Kiyosue, T & Harada, H. 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In vitro Cell Dev. Biol.* 25: 1163-116.
- Kamada, H; Ishikawa, K; Saga, H & Harada, H. 1993. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 10: 38-44.
- Krapiec, P; Milaneze, M; and Pires, M. 2003. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *Acta Scientiarum: Biological Sciences* 25: 179-182.
- Kiyosue, T; Kamada, H y Harada, H. 1989. Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. *Plant Tissue Culture Lett.* 6: 162-164.
- Kiyosue, T; Takano, K; Kamada, H y Harada, H. 1990. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can. J. Bot.* 68: 2301-2303.
- Knudson, L. 1946. A New Nutrient Solution for Germination of Orchid Seeds. *Ibid.* 15: 214-217.
- Leite, V y Hebling, S. 2007. Efeito do ácido giberélico (GA3) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore. *Natureza on line* 5: 55-62.
- Lelu, M; Bastien, C; Drugeault, A; Gouez, M y Klimaszewska, K. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol. Plant.* 105: 719-728.

- Levi, A y Sink, K. 1990. Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in asparagus. *J. Plant Physiol.* 137: 184–189.
- Lichtenthaler, H. 1998. The stress concept in plants: an introduction. *Ann. NY Acad. Sci.* 851: 187–198.
- Mantareys, El nuevo empresario. 2004. Datos curiosos sobre la biodiversidad de Ecuador. 2 pp.
- Martínez, R; Azpiroz, H; Rodríguez, J; Cetina, V y Gutiérrez, M. 2003. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, enero-junio, año/vol. 9. Número 001. Universidad Autónoma Chapingo, MX. 19 pp.
- Mckendrick, S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. 17 pp.
- Oldach K.H; Morgenstern, A; Rother, S; Girgi, M; O’Kennedy, M y Lo” rz, H. 2001. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Cell Rep.* 20: 416–421.
- Ossenbach, C; Arce, J y Warner, J. 2007. Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: II. Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. Universidad de Costa Rica. Cartago, CR. *Tierra Tropical.* 3 (1): 47-59. 13.
- Pasternak, T; Prinsen, E; Ayaydin, F; Miskolczi, P; Potters, G; Asard, H; Van Onckelen, H; Dudits, D y Fehér, A. 2002. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 129: 1807–1819.

- Quiroz-Figueroa, F; Rojas-Herrera, R; Galaz-Avalos, R y Loyola, V. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 86: 285-301.
- Razdan, M. 2002. Introduction to Plant Tissue Culture. 2da Edición. Science Publishers, Inc. Enfield (NH), USA. Pág. 375.
- Rivas, K. 2009. Compendio de Botánica. Imprenta Rocafuerte. Cuenca EC. Pág. 107.
- Rout, G; Samantaray, S y Das, P. 2000. *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuana* A. Richard. *Scientia Horticulturae*. 86: 71-79.
- Singh, F. 1993. *In vitro* Orchid Seed Germination and Cloning of Orchids. En: Plant Biotechnology. Science publishers, Inc. Lebanon, USA. 289 p.
- Thomas, C y Jiménez, V. 2005. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: MUJIB, A. and SAMAJ, J. eds. *Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monographs*. Berlin; Springer-Verlag. 2: 157-175.
- Tokuhara, K. y Mii, M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology* 37: 457-461.
- Vasseur, J; Dubois, J; Hilbert, J y Couillerot, J. 1995. Somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium* species). In: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology for Agriculture and Forestry*. vol. 31. *Somatic Embryogenesis and Synthetic seed II*, Springer, Berlin Heidelberg, New York, Pág. 125–137.
- Wu, Y; Haberland, G; Zhou, C y Koop, H. 1992. Somatic embryogenesis, formation of morphogenic callus and normal development in zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* *in vitro*. *Protoplasma*. 169: 89–96.

## ANEXOS

### Anexo 1. Detalles del diseño experimental

#### FACTORES DEL DISEÑO:

1. Reguladores de Crecimiento Vegetal
2. Condiciones de estrés en combinación con 2,4-D

#### NIVELES DE LOS FACTORES DE DISEÑO:

1. FACTOR 1: Reguladores de Crecimiento Vegetal

Nivel / Tratamiento	2,4-D	TDZ
A	0	0
B	0	2
C	0	0.1
D	0	0.3
E	0.01	0.01
F	0.01	0.1
G	0.01	0.3
H	0.01	0
I	0.03	0.01
J	0.05	0.01
K	0.3	0
L	0.1	0
M	1	0

2. FACTOR 2: Condiciones de Estrés en combinación con 2,4-D

Nivel/ Tratamiento	Tipos de Estrés	Duración del Tratamiento de Estrés (h)
A1	0.4M Sorbitol	2
B1	0.4M Sorbitol	4
C1	0.3M NaCl	6
D1	0.3M NaCl	12
E1	0.6mM CdCl	6
F1	0.6mM CdCl	12
G1	0.4M Sorbitol	2
H1	0.4M Sorbitol	4
J1	0.3M NaCl	6
K1	0.3M NaCl	12
L1	0.6mM CdCl	6
M1	0.6mM CdCl	12
	Control	

#### VARIABLES DE RESPUESTA:

- Porcentaje de formación de callo embriogénico
- Número de embriones somáticos por callo.

#### NÚMERO DE REPETICIONES:

Cuatro repeticiones por tratamiento, con 20 protocormos cada uno.



**ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Programa XLStat, ANOVA - Test de Duncan.