

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Efecto de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético
(ANA) y ácido indolbutírico (AIB) sobre el enraizamiento *in vitro*
de plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*

Trabajo de graduación presentado por Sara María Monterroso Cifuentes
para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala,
2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



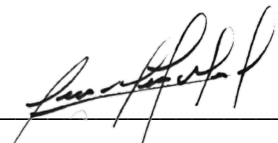
Efecto de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) sobre el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*

Trabajo de graduación presentado por Sara María Monterroso Cifuentes para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala,

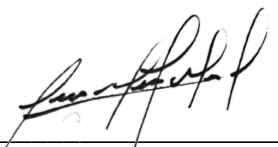
2025

Vo. Bo. Asesor principal:

(f) 

(M.Sc. José Miguel Morales Santiago)

Tribunal Examinador:

(f) 

(M.Sc. José Miguel Morales Santiago)

(f) 

(M.Sc. María Mercedes López-Selva)

(f) 

(M.Sc. Maríafernanda Alarcón Méndez)

Fecha de aprobación: Guatemala 18 de junio del 2025

Prefacio

La presente investigación surgió como un resultado de las prácticas profesionales que realicé en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Tecnología de la Universidad Rafael Landívar (Iarna-URL). Durante las prácticas hice actividades enfocadas en el cultivo *in vitro* de orquídeas. En conjunto con el equipo, identificamos la necesidad de estudiar el enraizamiento *in vitro* de las orquídeas, ya que cuentan con viales que llevan muchos años dentro del laboratorio y no han podido establecerse en condiciones *ex vitro* porque no tienen raíces lo suficientemente largas y resistentes. A partir de esto, surgió el tema de esta tesis, enfocada en dos especies que no contaban con un crecimiento radicular notorio. El proceso para establecer las concentraciones de ANA y AIB que se utilizaron en este estudio implicó intentos, fallos y aciertos. Por ello, cuando observé crecimiento de raíces por primera vez, fue algo muy satisfactorio y emocionante, ya que evidenciaba que los tratamientos establecidos estaban generando un efecto positivo y que mi trabajo empezaba a convertirse en un aporte real para el laboratorio.

Agradezco a mi asesor, M.Sc. José Miguel Morales, por su guía y por compartir sus conocimientos, que fueron fundamentales para llevar a cabo esta investigación. Agradezco al Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala, en especial a la M.Sc. Gabriela Alfaro y a Ericka Santos por su apoyo constante. Gracias al Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Tecnología (Iarna-URL) y a la Vicerrectoría de Investigación y Proyección (VRIP) de la Universidad Rafael Landívar por brindarme todos los recursos y espacios necesarios para desarrollar esta investigación. Agradezco a la M.Sc. María Mercedes López-Selva por su orientación desde el inicio; le agradezco por confiar en mí y haberme recibido en el laboratorio. Gracias a la técnica del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Iarna-URL, Lucía Vásquez, y a la auxiliar, Paula Traña, por sus

enseñanzas, su apoyo constante y aprendizaje compartido durante este proceso. Gracias a doña Delia Obando, cuyo apoyo en la limpieza de frascos y espacios de trabajo fue fundamental, especialmente en la época de diciembre. Agradezco al PhD. Daniel Ariano por compartir sus conocimientos y su tiempo desde el planteamiento del diseño experimental de mi tesis hasta el desarrollo del análisis estadístico. También agradezco al Lic. Alejandro Vásquez por haberme guiado en el análisis estadístico y el diseño de gráficas. Gracias a la M.Sc. Priscila Juárez, quien fue una motivación desde el inicio de mi carrera, quien, por medio de palabras y acciones, me alentó a terminar esta tesis con éxito. Gracias a mi papá, José Manuel, por facilitar el vínculo con la Universidad Rafael Landívar y por ser mi compañero y consejero en todo el proceso. Gracias a mi mamá, Genoveva, y mis cuatro hermanos, por animarme siempre y brindarme su apoyo y amor incondicional. Finalmente, agradezco a mis amigos (María, Johan, Sofía, Andrea y Paula), quienes fueron mi compañía durante todos estos años en la universidad, cuyo apoyo se manifestó de formas concretas en distintos momentos de mi carrera.

Además, es mi deseo dedicar este trabajo a todas aquellas personas apasionadas por conservar la biodiversidad y sembrar esperanza. Especialmente a quienes alguna vez han investigado o trabajado en cultivo de tejidos vegetales, ya que conocen el esfuerzo, la paciencia, la dedicación y la minuciosidad que esto requiere.

Índice

Prefacio	v
Índice.....	vii
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras.....	x
Resumen.....	xii
Abstract	xiii
I. Introducción.....	1
A. Antecedentes	2
1. Familia Orchidaceae	2
2. Orquídeas de Guatemala.....	10
3. Conservación <i>ex situ</i>	15
4. Cultivo <i>in vitro</i>	16
5. Enraizamiento <i>in vitro</i> de orquídeas	20
B. Justificación.....	23
C. Objetivos	26
1. Objetivo general.....	26
2. Objetivos específicos.....	26
II. Metodología	27
A. Especies de estudio.....	27
B. Selección de muestra para ensayos de enraizamiento <i>in vitro</i>	28
1. Preparación de medios.....	28
2. Selección de plántulas y medición inicial.....	29
C. Monitoreo del crecimiento de las raíces.....	30
D. Análisis de datos.....	30
1. Recopilación y ordenamiento de datos	30
2. Análisis estadístico	31

III.	Resultados	32
A.	Longitud promedio de raíces en diferentes tratamientos.....	32
B.	Enraizamiento <i>in vitro</i> y su relación con el tiempo.....	37
C.	Comparación del porcentaje final de enraizamiento entre tratamientos ..	40
D.	Formación de raíces laterales	41
IV.	Discusión.....	43
V.	Conclusiones	51
VI.	Recomendaciones	53
VII.	Referencias	55
VIII.	Apéndices	69
A.	Registro fotográfico del proceso de cultivo y medición.....	69
B.	Registros de temperatura y humedad relativa en el área de crecimiento .	71
C.	Selección y validación de modelos para longitud promedio y enraizamiento	72
D.	Prueba Chi-cuadrado para porcentajes finales de enraizamiento	76
E.	Evidencia fotográfica del crecimiento radicular de <i>Lycaste cochleata</i>	77
F.	Evidencia fotográfica del crecimiento radicular de <i>Sobralia macrantha</i>	80
IX.	Glosario.....	83

Lista de cuadros

Cuadro 1. Tratamientos evaluados con distintas concentraciones de ANA y AIB	29
Cuadro 2. Resumen del modelo más parsimonioso para longitud promedio de raíces	33
Cuadro 3. Efecto de la especie, de la interacción especie×tratamiento y de las variables aleatorias y suavizadas en la longitud promedio de raíces según el modelo más parsimonioso	35
Cuadro 4. Resumen del modelo más parsimonioso para enraizamiento	38
Cuadro 5. Comparación entre proporciones finales de enraizamiento de <i>Lycaste cochleata</i> en los siete tratamientos	40

Lista de figuras

Figura 1. Morfología floral de las orquídeas.	4
Figura 2. Rizoma de orquídea con hojas y pseudobulbos.....	5
Figura 3. Morfología de raíces de orquídeas.	5
Figura 4. Frutos de diferentes especies de orquídeas.....	6
Figura 5. Desarrollo general de las orquídeas.....	7
Figura 6. Distribución de la familia Orchidaceae en Guatemala a partir de datos de GBIF.	12
Figura 7. Flor de <i>Lycaste cochleata</i>	13
Figura 8. Flor de <i>Sobralia macrantha</i>	14
Figura 9. Distribución de <i>Lycaste cochleata</i> y <i>Sobralia macrantha</i> en Guatemala a partir de datos de GBIF.....	14
Figura 10. Predicción del modelo para longitud promedio de raíces según el efecto del tratamiento en cada especie.	34
Figura 11. Predicción del modelo para longitud promedio de raíces según el efecto de la especie.....	35
Figura 12. Crecimiento en longitud de las raíces durante los meses de estudio.....	37
Figura 13. Proporción de plántulas enraizadas durante los meses de estudio.	39
Figura 14. Proporción de plántulas que presentaron raíces laterales durante los meses de estudio.	41
Figura 15. Medición y transferencia de plántulas bajo condiciones estériles.....	69
Figura 16. Método empleado para medición de raíces con regla y caja Petri de vidrio. ..	69
Figura 17. Método de rotulación y siembra de tres plántulas en cada frasco.	70
Figura 18. Vista general de los 210 frascos experimentales en el área de crecimiento. ...	70
Figura 19. Promedio diario de temperatura y humedad relativa para <i>Lycaste cochleata</i> . 71	
Figura 20. Promedio diario de temperatura y humedad relativa para <i>Sobralia macrantha</i>	71

Figura 21. Análisis de residuos DHARMA del modelo seleccionado para longitud promedio de raíces.	73
Figura 22. Análisis de residuos DHARMA del modelo seleccionado para enraizamiento.	74
Figura 23. Efecto parcial de las variables aleatorias sobre la longitud promedio de raíces.	74
Figura 24. Efecto parcial de las variables aleatorias sobre el enraizamiento.....	75
Figura 25. Efecto parcial del tiempo sobre la longitud promedio de raíces.	75
Figura 26. Efecto parcial del tiempo sobre el enraizamiento	76
Figura 27. Ejemplos de plántulas de <i>L. cochleata</i> con raíces en el primer mes.	77
Figura 28. Ejemplos de plántulas de <i>L. cochleata</i> con raíces en el segundo mes.....	77
Figura 29. Ejemplos de plántulas de <i>L. cochleata</i> con raíces en el tercer mes.	78
Figura 30. Ejemplo del crecimiento radicular de <i>L. cochleata</i> en el tratamiento control después de cuatro meses.	78
Figura 31. Ejemplos de plántulas de <i>L. cochleata</i> con raíces en el cuarto mes.	79
Figura 32. Crecimiento de hojas e inicio de debilitamiento de raíces en ANA 0.4 mg/L después de cuatro meses.	79
Figura 33. Crecimiento de raíces en <i>S. macrantha</i> después de un mes en AIB 0.2 mg/L.	80
Figura 34. Ejemplos de plántulas de <i>S. macrantha</i> con crecimiento radicular en el segundo mes.	80
Figura 35. Ejemplos de plántulas de <i>S. macrantha</i> con raíces en el tercer mes.	81
Figura 36. Ejemplo del crecimiento radicular de <i>S. macrantha</i> en el tratamiento control después de cuatro meses.	81
Figura 37. Ejemplos de plántulas de <i>S. macrantha</i> con raíces en el cuarto mes.	82
Figura 38. Plántulas de <i>S. macrantha</i> del tratamiento con AIB 0.2 mg/L dos meses después de haber terminado el estudio.	82

Resumen

Orchidaceae es una de las familias de plantas más amenazadas a nivel mundial y la más amenazada en Guatemala. Frente a esta situación, el cultivo y la propagación *in vitro* han resultado ser alternativas viables y muy beneficiosas para su conservación. Sin embargo, estas técnicas implican muchos retos económicos y técnicos, especialmente en las fases de enraizamiento y aclimatación, ya que las respuestas hacia los tratamientos varían entre especies. A partir de esto, se planteó esta investigación con el objetivo de evaluar el efecto de distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*. Se realizaron ensayos utilizando medio MS a la mitad de su concentración, modificado con auxinas sintéticas (ANA y AIB), cada una en tres concentraciones diferentes: 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L. Durante cuatro meses se realizó una medición mensual de la cantidad y la longitud de raíces por plántula en cada tratamiento. Los datos se analizaron a través de modelos aditivos generalizados mixtos (GAMM) en RStudio para determinar las tendencias de crecimiento de las raíces con cada tratamiento. Además, se evaluaron diferencias entre los porcentajes de enraizamiento final con una prueba Chi-cuadrado y una comparación por pares de proporciones. Se comprobó que la respuesta a los tratamientos hormonales difiere significativamente entre ambas especies. *Lycaste cochleata* respondió de manera positiva a varios tratamientos, siendo el tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L) el más efectivo. *Sobralia macrantha* no presentó un crecimiento significativo en sus raíces en ninguno de los tratamientos evaluados.

Palabras clave: orquídeas, enraizamiento *in vitro*, auxinas, ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB)

Abstract

Orchidaceae is one of the most threatened plant families worldwide and the most threatened in Guatemala. Faced with this situation, *in vitro* culture and propagation have proven to be viable and highly beneficial alternatives for its conservation. However, these techniques involve many economic and technical challenges, especially during the rooting and acclimatization phases, since species exhibit variable responses to treatments. Based on this, the main objective of this research was to evaluate the effect of different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA) on the *in vitro* rooting of *Lycaste cochleata* and *Sobralia macrantha* seedlings. Experiments were conducted using half-strength MS medium modified with synthetic auxins (NAA and IBA), each at three different concentrations: 0.2, 0.4, and 0.6 mg/L. Over four months, monthly measurements were taken to assess both root number and root length per seedling for each treatment. Data were analyzed using generalized additive mixed models (GAMM) in RStudio to determine root growth trends with each treatment, and differences between final rooting percentages were evaluated using a Chi-square test and pairwise comparison of proportions. Results confirmed that hormonal responses differ significantly between the two species. *Lycaste cochleata* showed a positive response to several treatments, with treatment 3 (NAA at 0.4 mg/L) being the most effective. In contrast, *Sobralia macrantha* did not exhibit significant root development under any of the tested treatments.

Keywords: orchids, *in vitro* rooting, auxins, naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA)

I. Introducción

Orchidaceae es reconocida por ser una de las familias más diversas entre las angiospermas y por tener una distribución global muy amplia (Merritt *et al.*, 2013). A pesar de esto, es una de las familias de plantas más amenazadas principalmente por la extracción y comercio ilegal a nivel mundial, además de factores como el cambio climático y la pérdida de hábitat. Muchas orquídeas son bastante cotizadas en el mercado y son de gran importancia por sus usos comestibles, medicinales, ornamentales y rituales. Por ello, la búsqueda de metodologías para promover su reproducción ha generado cada vez más interés, tanto con fines comerciales como de conservación y restauración de hábitats (Ticktin *et al.*, 2019; Sánchez y Rodríguez, 2018).

En este contexto, el cultivo de tejidos *in vitro* resulta ser una estrategia bastante útil y ventajosa para la propagación de varias especies vegetales. Específicamente para las orquídeas ha promovido un manejo sostenible y ha permitido el establecimiento de sistemas de micropropagación (Díaz y Salgado-Garciglia, 2006; Sharry *et al.*, 2015). Considerando la importancia cultural, económica y ecológica de esta familia, este método es clave para su conservación de forma *ex situ*. Además, es de gran relevancia porque los espacios que se generan permiten la investigación de diferentes especies y complementan programas de manejo *in situ* (Cortes *et al.*, 2017).

Sin embargo, durante el proceso de propagación *in vitro* de las orquídeas pueden presentarse varios retos, especialmente en las fases de enraizamiento y aclimatación, ya que en muchos casos los conductos vasculares que se forman son muy débiles o hay malformación en las raíces (Mendieta, 2013). De manera especial, el enraizamiento es una de las fases de mayor importancia porque determina en gran parte el éxito de establecimiento de las orquídeas en condiciones *ex vitro*. Por ello, se han generado diferentes composiciones de medios de cultivo utilizando reguladores de crecimiento para

inducir la formación de raíces sanas. No obstante, uno de los principales desafíos para establecer un método efectivo es que las respuestas hacia los tratamientos de enraizamiento varían entre especies y tipos de explantes (Mirani *et al.*, 2017; Vasco, 2020; Mendieta, 2013; Thuy *et al.*, 2014; Coello *et al.*, 2010).

Debido a la problemática planteada, es fundamental realizar más investigaciones sobre el enraizamiento *in vitro* de orquídeas con diferentes especies y tratamientos para generar protocolos cada vez más precisos. En este contexto, la presente investigación se centra en evaluar el efecto de distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Tecnología de la Universidad Rafael Landívar (Iarna-URL), donde se ha presentado dificultad para la aclimatación de diversas especies debido a la ausencia de raíces. Es por esto que esta investigación buscaba determinar si alguno de los tratamientos evaluados favorece el enraizamiento en las especies de estudio para facilitar su aclimatación.

A. Antecedentes

1. Familia Orchidaceae

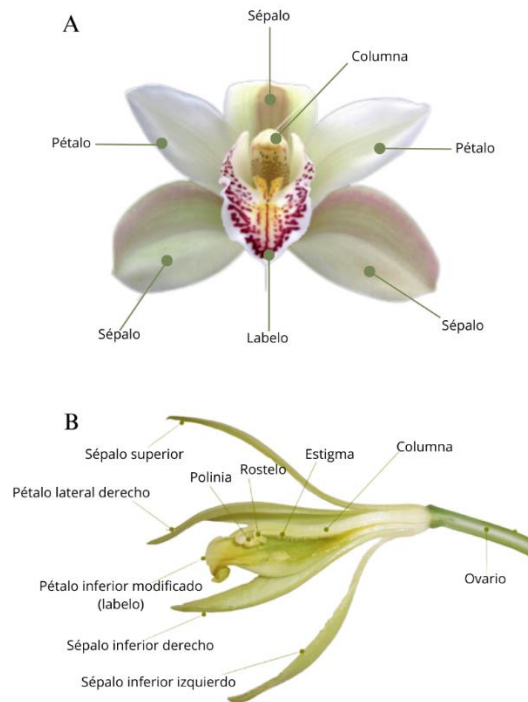
La familia Orchidaceae es una de las dos familias más grandes de plantas angiospermas, junto con la familia Asteraceae. Consta de cinco subfamilias: Apostasioideae, Cypripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae y Vanilloideae, de las cuales Epidendroideae es la más grande (Chase *et al.*, 2015). Actualmente se conocen 736 géneros de orquídeas y se estima que existen más de 28,000 especies (Dressler, 2005; Lal y Singh, 2020), lo cual representa más del 40 % de todas las monocotiledóneas y el 10 % de todas las angiospermas (Scotland y Wortley, 2003).

Esta gran cantidad de especies refleja, en parte, su capacidad de adaptación a diferentes ambientes. Lo cual ha permitido que se distribuyan en todo el mundo, menos en

regiones con clima desértico o polar como la Antártida y en zonas con alturas superiores a los 4,500 msnm. El 70 % de las especies son epífitas, aunque también existen comunidades terrestres y litófitas. En general, son capaces de crecer en condiciones de baja luz y alta humedad, típica de hábitats en selvas tropicales. Es por esto que han sido especialmente exitosas en regiones montañosas de zonas tropicales, subtropicales y templadas (Pantoja-Ambriz *et al.*, 2016; Philips *et al.*, 2020; Ajú, 2009).

1.1. Morfología y fisiología de las orquídeas. Las orquídeas presentan una amplia variedad de morfologías florales. Al igual que la mayoría de monocotiledóneas, sus flores son trímeras con un verticilo de tres sépalos y otro de tres pétalos. Las flores son hermafroditas en la mayoría y comúnmente se agrupan en inflorescencias de forma basal, axilar o apical (Freuler, 2008). De manera más específica, esta familia se distingue por presentar ovario inferior, perianto zigomorfo (simétrico), un pétalo de mayor tamaño, usualmente más colorido, que se denomina “labelo” y sirve para que los insectos polinizadores se posen en la flor (Gaskett, 2011). Además, tienen un androceo reducido fusionado al gineceo en una estructura llamada “columna” (Figura 1). La mayor parte presenta solo una antera fértil y el polen se encuentra aglutinado en polinias (Singer, 2009).

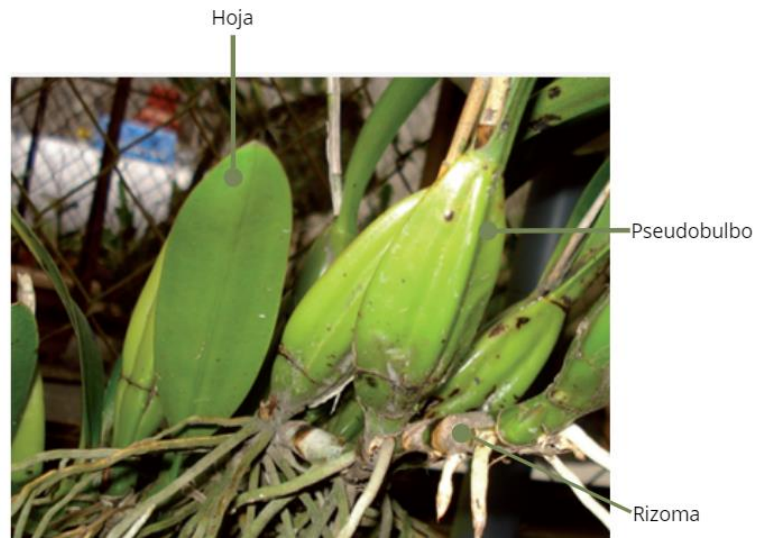
Figura 1. Morfología floral de las orquídeas.



Nota. (A) Vista frontal de flor de *Cymbidium* sp.; (B) Corte longitudinal de flor de vainilla. Adaptada de Díaz-Toribio (2013) y Navez (2006).

Como el resto de monocotiledóneas, las hojas de las orquídeas presentan nervaduras paralelas y pueden ser suculentas o más delgadas (Freuler, 2008). Asimismo, cuentan con un rizoma, que es un tallo aéreo o subterráneo a partir del cual se forman pseudobulbos (Figura 2). Los pseudobulbos son órganos, usualmente de forma globosa, que sirven para reserva de alimento y agua y dan origen a las raíces o, en muchos casos, a las flores (Collantes *et al.*, 2007; Freuler, 2008). Las especies terrestres presentan raíces alargadas gruesas o suculentas cortas. Mientras que las especies que son epífitas generalmente tienen raíces gruesas con velamen (Figura 3), un tejido que brinda protección mecánica y evita la pérdida excesiva de agua (Collantes *et al.*, 2007).

Figura 2. Rizoma de orquídea con hojas y pseudobulbos.



Nota. Adaptada de Díaz-Toribio (2013).

Figura 3. Morfología de raíces de orquídeas.



Nota. (A) Raíces de una orquídea epífita; (B) Raíces de una orquídea terrestre. Adaptada de Díaz-Toribio (2013) y Fernández-Fernández *et al.* (2018).

En gran parte de las orquídeas, el fruto es una cápsula dehiscente que se abre por tres a seis ranuras longitudinales (Figura 4); muy raras veces el fruto es una baya. Tienen semillas muy diminutas y numerosas que poseen poco o nada de endospermo (Rasmussen y Rasmussen, 2014). Para la formación de las semillas requieren de polinizadores específicos, principalmente insectos, que permitan la fecundación (Banda-Sánchez *et al.*, 2017).

Figura 4. Frutos de diferentes especies de orquídeas.



Nota. (4A, B) *Stanhopea*; (4C) *Lycaste*; (4D) *Prescottia*; (4E, F) *Dichaea*; (4G) *Sobralia*; (4H) *Prosthechea*. Adaptada de Cetzal y Noguera-Savelli (2014).

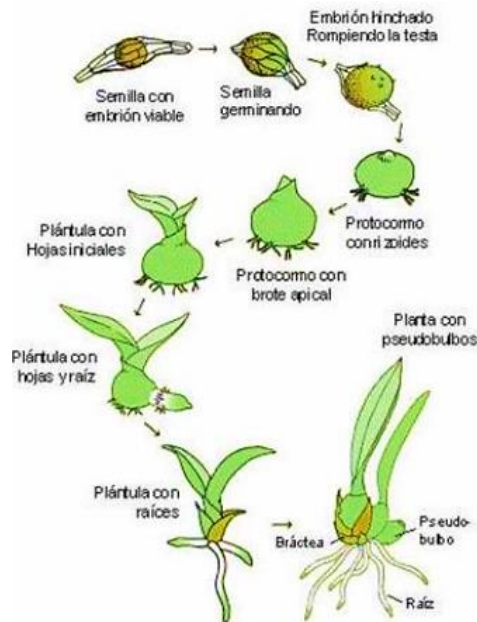
1.2. Ciclo de vida de las orquídeas. Las orquídeas son plantas perennes que pueden ser terrestres, epífitas o saprófagas (Banda-Sánchez *et al.*, 2017). La diversidad taxonómica y morfológica de esta familia permite que tengan una amplia diversidad de sistemas de polinización, por lo que este es su principal mecanismo de reproducción. Los polinizadores son atraídos por el aroma, el color y/o la forma de las flores y por recompensas como néctar y aceites esenciales. Entre los polinizadores de orquídeas se encuentran abejas, escarabajos, moscas, avispas, mariposas diurnas y nocturnas, hormigas, murciélagos y colibríes. Cada uno especializado en un tipo de flor específico, lo cual ha sido clave para el proceso de especiación de las orquídeas (Díaz, 2015; Ackerman y del Castillo, 1992).

Luego de que ocurre polinización, el polen germina y forma un tubo polínico que crece hacia el interior de la columna del pistilo y hacia el ovario para la fecundación. Posterior a ser fecundado, empieza a cambiar la estructura del ovario para formar el fruto,

que es la cápsula. Esta se abre cuando está madura, lo cual permite la dispersión de miles de semillas por medio del viento. Debido a que estas no tienen endospermo, necesitan llegar a un sustrato adecuado y dependen ampliamente de la presencia de hongos simbióticos apropiados para tener una germinación exitosa. A través de micorrizas, los hongos les brindan carbohidratos para su desarrollo y estos a su vez reciben vitaminas y otras sustancias (Ackerman y del Castillo, 1992).

Las orquídeas tienen un carácter exclusivo que es compartido por todas las especies de la familia: cuando las semillas germinan no generan una plántula como el resto de monocotiledóneas, sino que forman primero un cuerpo esférico de unos cuantos milímetros que carece de raíces. Este se denomina protocormo miotrófico (Figura 5) (Rasmussen y Rasmussen, 2014). El tiempo que transcurre entre la germinación de la semilla y la maduración de la planta suele ser de varios años en vida silvestre, pero en algunas especies este ciclo pasa rápidamente. Cuando la plántula crece lo suficientemente grande, la asociación con hongos deja de ser tan necesaria, aunque muchas veces sí se mantiene (Ackerman y del Castillo, 1992).

Figura 5. Desarrollo general de las orquídeas.



Nota. Adaptada de Duarte (2014).

1.2.1. Regulación hormonal. Dentro de las etapas de su desarrollo, todas las plantas requieren de reguladores de crecimiento, los cuales son compuestos sintetizados químicamente o producidos por la misma planta (fitohormonas), que controlan la actividad metabólica y el crecimiento. Existen diferentes tipos dependiendo de su estructura molecular y efectos a nivel celular y vegetal. Las principales son las auxinas, citoquininas, giberelinas y el ácido abscísico (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019).

a. Auxinas: actúan principalmente a nivel celular porque dirigen procesos de división, elongación y diferenciación de las células. Es sumamente importante y suele distribuirse en la mayoría de los tejidos vegetales. Es uno de los principales promotores de la diferenciación celular en raíces, tallos y hojas, tanto para su origen como su crecimiento. Dentro de las auxinas más conocidas para el desarrollo de tallos y raíces está el ácido indolacético (AIA), la principal auxina producida de forma natural. Además, entre las auxinas producidas de forma sintética se encuentran el ácido indolbutírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA) (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019).

b. Citoquininas: al igual que las auxinas, pueden favorecer la elongación de las raíces porque estimulan la división y diferenciación celular. Se distinguen porque suelen producirse en el ápice de la raíz y transportarse hacia las hojas a través del xilema. Son capaces de retardar la senescencia de las hojas y es por esto que tienen un rol muy importante en el aumento y la generación de brotes. Además, pueden iniciar y promover la proliferación de tejidos madre cuando son aplicadas en pequeñas cantidades. Las citoquininas más reconocidas son la kinetina, zeatina (proveniente del maíz) y benciladenina (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019).

- c. **Giberelinas:** son fitohormonas que pueden ser producidas por diversos microorganismos, como bacterias y hongos, cuando se generan interacciones simbióticas. También pueden ser producidas por las mismas plantas en tejidos jóvenes. Están principalmente involucradas en el desarrollo de tejidos que tienen un crecimiento constante, como raíces, hojas jóvenes, floración y otros procesos vegetales. El ácido giberélico AG₃ es el más utilizado y es reconocido por permitir el alargamiento de explantes o segmentos extraídos de una planta madre. Esto debido a que estimula la elongación celular en respuesta a condiciones de luz y oscuridad (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019).

Asimismo, cumple un rol muy importante en la iniciación de la floración y los aparatos reproductores vegetales, por lo que es vital para la fertilidad de las plantas. Tiene la capacidad de inducir la germinación de semillas y el crecimiento embrionario. Es por esto que las plantas producen esta fitohormona principalmente durante el proceso de germinación y el desarrollo apical (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019).

- d. **Ácido abscísico:** fitohormona conocida como ABA, producida de manera indirecta por las plantas principalmente en tejidos jóvenes y en algunos tejidos de las semillas. A diferencia de las auxinas y citoquininas, esta fitohormona usualmente está asociada con la inhibición de ciertos procesos. Se encarga de controlar procesos vegetales que normalmente ocurren de forma natural y en respuesta a condiciones de estrés como sequía, frío y salinidad. Específicamente, regula la dormancia, germinación y maduración de las semillas y regula la producción de cigotos, la senescencia y la floración (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019, Flórez y Aleixo, 2009).

2. Orquídeas de Guatemala

La variedad de condiciones topográficas y geológicas de Guatemala, como cadenas montañosas y áreas volcánicas, además de variaciones climáticas y altitudinales, genera una gran diversidad de climas y microclimas. Esto da lugar a una gran diversidad de flora y hace que el país sea considerado como uno de los más ricos en flora de América Central (Ames y Correll, 1985). Específicamente, la familia Orchidaceae es una de las familias de flora más diversas en Guatemala. Para 2006, se registraron 770 especies de orquídeas, de las cuales 41 eran endémicas (Dix y Dix, 2006). Mientras que para 2008 se registraron 796 especies, 200 de ellas endémicas (Véliz, 2008). Recientemente, en 2023, se estableció que en el país hay más de 1,200 especies clasificadas en 223 géneros, incluyendo muchas endémicas (Archila *et al.*, 2023).

En Guatemala, las orquídeas se usan principalmente para decoración, ceremonias religiosas o saborizantes de alimentos. Por ejemplo, *Guarianthe aurantiaca*, *Sobralia macrantha* y varias especies del género *Oncidium* son muy cotizadas en el mercado por sus flores atractivas para decoración y ceremonias religiosas (ej. altares, procesiones) (López-Selva, 2016). De igual forma, el género *Lycaste* tiene especial relevancia etnobotánica en el país ya que algunas de sus especies han sido utilizadas tradicionalmente por pueblos indígenas. Este género también es reconocido porque incluye la flor nacional, *Lycaste virginalis*, comúnmente conocida como Monja Blanca (Alfaro *et al.*, 2023; Archila y Chiron, 2022).

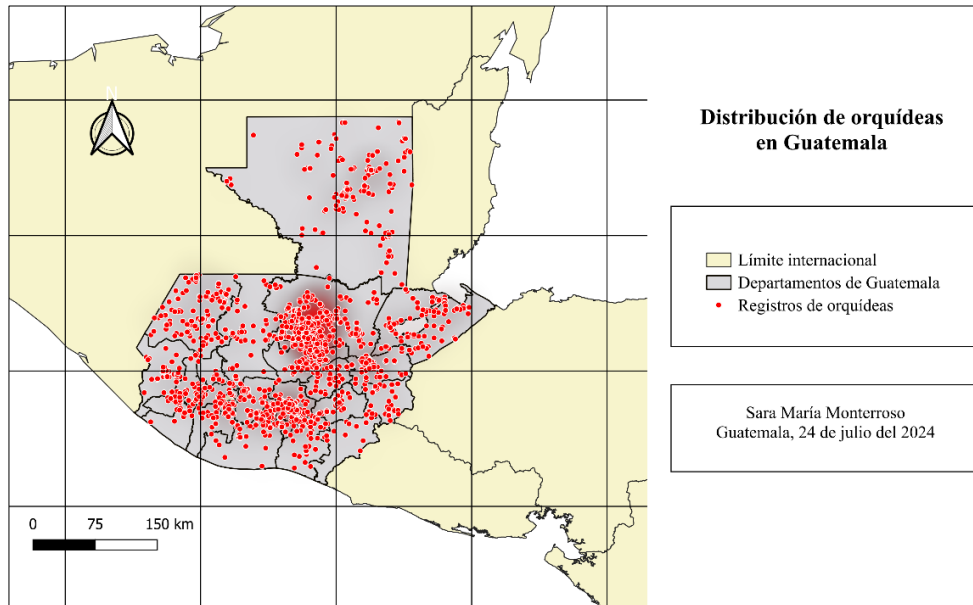
2.1. Distribución geográfica de orquídeas en Guatemala. La mayoría de las orquídeas de Guatemala son epífitas y se encuentran en un rango altitudinal de 800 a 1600 msnm (Ajú, 2009). La mayor riqueza de especies se encuentra en los bosques húmedos del departamento de Alta Verapaz, que incluye el 60% de todas las especies registradas en el país. Se ha determinado que esta región alberga alrededor de 242 especies agrupadas en 60 géneros (Vásquez *et al.*, 2021). Después de dicho departamento, los que tienen mayor riqueza

son Baja Verapaz, Izabal, Huehuetenango, Guatemala, Chimaltenango, Suchitepéquez y Petén (Figura 6) (López-Selva, 2016).

Concretamente, el hábitat de bosque lluvioso en la costa atlántica del país, incluyendo parte de Izabal, alberga otra gran parte de la diversidad con alrededor de 111 especies de orquídeas en 43 géneros, incluyendo ejemplares endémicos. Asimismo, Huehuetenango, un departamento inmerso en tierras altas y regiones montañosas, tiene 110 especies y 41 géneros que presentan endemismo en su mayoría. Los bosques mixtos de tierras altas que abarcan Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala y Zacapa presentan más de 75 especies en 40 géneros, aproximadamente (Figura 6) (Vásquez *et al.*, 2021).

Por otro lado, Petén es una región con planicies y llanuras a una altitud relativamente baja con estación húmeda y seca que contiene 57 especies agrupadas en 25 géneros. Por último, el área de la boca costa del Pacífico presenta montañas mixtas y abundante lluvia en determinados meses del año. Esta región abarca varios departamentos que varían en el número de especies: Quetzaltenango con 72 especies, San Marcos con 59, Santa Rosa con 58, Suchitepéquez con 53 y Sololá con 47 (Figura 6). En estas regiones se encuentran muchas de las especies importantes por su valor ornamental (Vásquez *et al.*, 2021).

Figura 6. Distribución de la familia Orchidaceae en Guatemala a partir de datos de GBIF.



2.2. Especies de estudio. Para este estudio se seleccionaron dos especies de orquídeas nativas de Guatemala. Ambas pertenecientes a la subfamilia Epidendroideae y clasificadas en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES). Esto indica que no necesariamente se encuentran en peligro de extinción, pero podrían estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio (Rivera y Viquez, 2010). A continuación, se detalla más información de cada una de estas especies.

2.2.1. *Lycaste cochleata* Lindl. Es una especie epífita o litófito que, como el resto de orquídeas de su género, se caracteriza por tener pseudobulbos cortos, ovoides y engrosados. Además, tiene hojas de hasta 25 cm de largo, flores anaranjadas o amarillas con el labelo aplanado, generalmente grandes y atractivas con olor dulce (Figura 7). Es una especie rara que tiene una distribución limitada en bosques montanos húmedos de México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua (Alfaro *et al.*, 2023). Se distribuye desde los 200 a 1800 msnm. En Guatemala se encuentra naturalmente en Alta Verapaz, Baja

Verapaz, Chiquimula, Izabal, Jalapa, Petén y Zacapa (Figura 9) (World Flora Online [WFO], 2023).

Figura 7. Flor de *Lycaste cochleata*.



Nota. Adaptada de De los Milagros (2021).

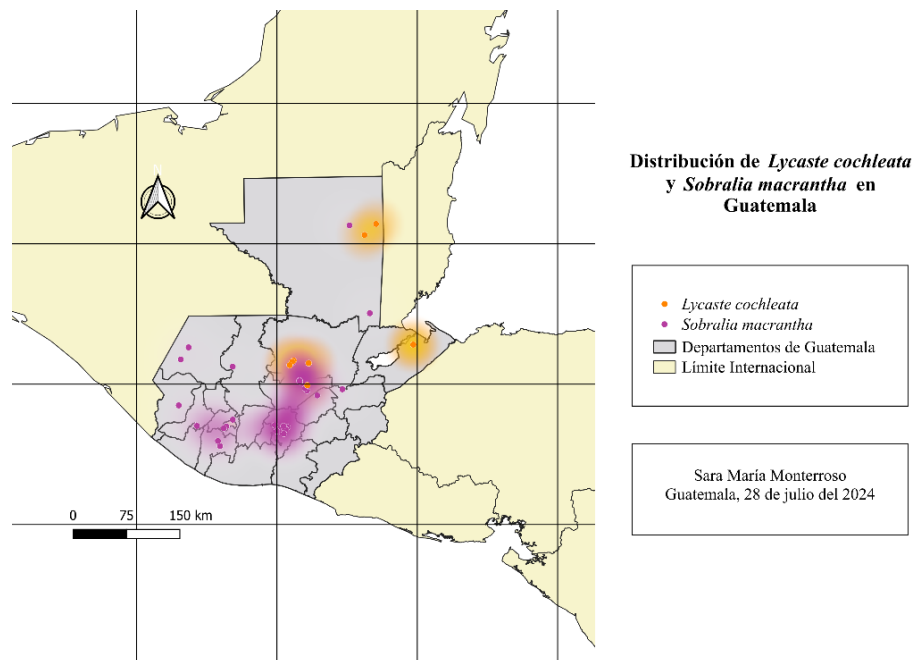
2.2.2. ***Sobralia macrantha* Lindl.** Es una orquídea usualmente terrestre o litófito y, en raras ocasiones, epífita. Carece de pseudobulbos y en lugar de ellos presenta tallos largos con vainas de color negro-verdoso. Puede medir hasta 1 m de alto y se distingue principalmente porque tiene hojas angostas lanceoladas de 20 cm de largo y flores grandes de color púrpura con un labelo redondeado de hasta 10 cm de largo y 6 cm de ancho con bordes ondulados (Figura 8). Es una especie localmente común que se encuentra en bosques siempreverdes de clima templado a frío desde México hasta Costa Rica, a 900 – 3400 msnm (World Flora Online [WFO], 2023). En Guatemala se distribuye principalmente en la región suroccidente (Figura 9).

Figura 8. Flor de *Sobralia macrantha*.



Nota. Adaptada de Hassan (2022).

Figura 9. Distribución de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha* en Guatemala a partir de datos de GBIF.



Nota. Anaranjado: *Lycaste cochleata*. Púrpura: *Sobralia macrantha*.

3. Conservación *ex situ*

La viabilidad de poblaciones silvestres a largo plazo está determinada por factores ecológicos, genéticos y medioambientales, incluyendo factores dependientes (ej. pérdida de hábitat) e independientes del ser humano (ej. fenómenos naturales). Debido a que muchas actividades antropogénicas han incrementado la pérdida de la biodiversidad en las últimas décadas, es importante implementar estrategias para la conservación de organismos que son cada vez más escasos en vida silvestre (Díaz y Salgado-Garciglia, 2006).

La conservación *ex situ* se ha convertido en una herramienta clave para preservar la biodiversidad. Es una estrategia que consiste en promover la recuperación y sobrevivencia de individuos o poblaciones fuera de su hábitat. Por lo tanto, tiene la ventaja de que facilita el estudio de la biología, anatomía y fisiología de las especies. Para ello se emplean diversos recursos, técnicas e infraestructuras con el principal objetivo de reducir el riesgo de extinción. También puede realizarse con el fin de restablecer poblaciones nuevas en su hábitat natural, pero esto sucede siempre y cuando exista hábitat disponible y hayan desaparecido las presiones que provocaron la reducción de la especie (Lascuráin *et al.*, 2009).

3.1. Conservación *ex situ* de orquídeas. La conservación *ex situ* de especies vegetales es un complemento muy importante de las acciones *in situ* y se puede desarrollar de diferentes maneras. Entre los métodos más reconocidos se encuentran los jardines botánicos, bancos de semillas, bancos de germoplasma y cultivo o propagación *in vitro* (Lascuráin *et al.*, 2009). Dado que la familia Orchidaceae es una de las más vulnerables ante la pérdida de hábitat y otras amenazas latentes, se han implementado acciones de conservación *ex situ* para garantizar su supervivencia y facilitar su investigación (Díaz y Salgado-Garciglia, 2006).

Se han definido tres consideraciones para la adecuada conservación y recuperación de las orquídeas. La primera es el diseño y gestión de reservas naturales, la segunda es el almacenamiento efectivo de germoplasma *ex situ* y la tercera, el desarrollo de restauración

in situ con enfoques de translocación. En el caso de las orquídeas, la conservación *ex situ* consiste en el almacenamiento de muestras representativas de material genético (germoplasma) como semillas, hongos compatibles para micorrizas, protocormos y tejidos somáticos (Swarts y Dixon, 2009).

Por lo tanto, para tener un respaldo de la conservación *in situ* se han adoptado los bancos de germoplasma como principal estrategia en los últimos años. Para ello se aplica el método de criopreservación, que consiste en almacenar tejidos u órganos de las plantas a muy bajas temperaturas (-20 a -196 °C) para reducir el daño y mantener la integridad celular. También los bancos de semillas son cada vez más comunes como estrategia para la conservación de orquídeas ya que, según la especie, cada cápsula puede producir miles a millones de semillas (Seaton *et al.*, 2010; Banda-Sánchez *et al.*, 2017). Por último, el cultivo *in vitro* se ha convertido en una alternativa viable para la reproducción de orquídeas amenazadas y consiste en facilitar su desarrollo mediante la presencia de nutrientes y condiciones controladas (Flores-Hernández *et al.*, 2017; Menchaca y Moreno, 2011).

Estos métodos permiten que se conserve información genética de diferentes especies y, además, preservar individuos que luego pueden ser reintroducidos en vida silvestre. Sin embargo, es un reto generar poblaciones con las características y aptitudes necesarias para una recuperación *in situ* exitosa (Merritt *et al.*, 2013). Por lo tanto, lo ideal es realizar estrategias combinadas en las que la conservación *ex situ* se aplique como un apoyo y complemento para la conservación *in situ* (Lascuráin *et al.*, 2009).

4. Cultivo *in vitro*

El primer cultivo de tejidos exitoso fue generado a inicios del siglo XX por Gottlieb Haberlandt, un botánico austriaco. Aunque en ese entonces no se habían descubierto los reguladores de crecimiento para promover la división celular, fue un hallazgo muy importante. Desde 1920 otros científicos, incluyendo estudiantes de Haberlandt, investigaron más sobre el cultivo *in vitro* de plantas, los reguladores de crecimiento y los suplementos para un medio de cultivo (Caponetti *et al.*, 2018).

En 1970, cuando descubrieron métodos para modificación genética, aumentó aún más el interés por investigar el cultivo de tejidos y sus aplicaciones en diferentes ámbitos (Thorpe, 2012). Hasta la actualidad, este método ha demostrado tener un gran potencial en la propagación comercial, mejoramiento genético, bancos de germoplasma e investigación científica (Caponetti *et al.*, 2018). Además, ha hecho posible el desarrollo de estrategias de mejoramiento y conservación *ex situ* de especies vegetales que tienen baja tasa de reproducción en vida silvestre (Domínguez *et al.*, 2008)

4.1. Fundamentos del cultivo *in vitro* de plantas. El cultivo de tejidos vegetales es el cultivo de fragmentos o explantes de plantas (ej. células, tejidos, órganos) bajo determinadas condiciones físicas y químicas dentro de frascos de vidrio con medios nutritivos en un ambiente artificial. Este método de cultivo se basa en dos características principales: la asepsia y el control de factores que afectan el crecimiento. La asepsia se refiere a condiciones para minimizar el riesgo de contaminación por microorganismos como bacterias, virus y hongos (Thorpe, 2012; Borges *et al.*, 2009).

El cultivo de tejidos vegetales se fundamenta en la teoría de la totipotencialidad celular, que es la capacidad de obtener una planta completa a partir de cualquier célula viva bajo condiciones controladas. Con base en esto, se han generado diferentes formas de cultivo *in vitro* dependiendo del explante que se utiliza. Se pueden cultivar callos (callogénesis), segmentos de tallo, raíz, suspensiones celulares, embriones maduros o inmaduros (embriogénesis), polen, yemas axilares o meristemos, primordios de hojas, primordios de flores, germinación de semillas, entre otros (Sharry *et al.*, 2015).

Los tejidos se cultivan en medios nutritivos que son soluciones acuosas que permiten el desarrollo de microorganismos, células o tejidos. Son de los factores más importantes para una propagación exitosa, por lo que deben tener los nutrientes que el organismo vivo requiera. En el caso de las plantas, el medio de cultivo debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que brinda el suelo en estado natural. Los principales componentes que debe tener son: agua, vitaminas, macronutrientes,

micronutrientes, azúcares, agentes gelificantes (ej. agar) y hormonas (Perea y Tirado, 2011). No existe un medio que sirva para todos los propósitos y todas las especies, pero el que más se utiliza es Murashige y Skoog o MS, reconocido por ser rico en sales (Mroginski *et al.*, 2004; Martínez-Villegas *et al.*, 2015).

Para promover la diferenciación celular es necesario añadir reguladores de crecimiento a los medios de cultivo, principalmente auxinas y citoquininas, ya que ambas regulan el crecimiento de las plantas (Sharry *et al.*, 2015). Las auxinas estimulan el crecimiento por elongación celular y las citoquininas lo hacen por división celular (Sinha, 2004). Además de los reguladores de crecimiento, las plantas responden a otros estímulos como la luz, nutrientes minerales, agua, suelo (medio), temperatura y pH. Estos factores deben medirse para tener condiciones controladas y un ambiente adecuado, tanto físico como químico, según los requerimientos de cada planta (Tiza, 2010).

Con el fin de lograr dichas condiciones, un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales debe disponer de tres sectores o estaciones. El primero para la preparación de medios, lavado y esterilización de material. El segundo bajo condiciones asépticas para realizar siembras y transferencias de explantes en campanas de flujo laminar. El tercero corresponde a una habitación de incubación para el crecimiento de las plantas bajo condiciones de luz artificial y temperatura adecuadas (Sharry *et al.*, 2015).

Una vez se obtienen las condiciones ideales, es posible regenerar plantas completas y propagarlas (Sharry *et al.*, 2015). Para ello, la micropropagación es de las técnicas más utilizadas y generalizadas del cultivo *in vitro*. Esta consta de las siguientes fases: selección de explantes obtenidos de una planta madre (cultivada o no previamente en laboratorio), cultivo de explantes en un medio nutritivo, multiplicación (se propagan los brotes), enraizamiento y aclimatación (se preparan para condiciones *ex vitro*). Esta forma de propagación permite la obtención de una descendencia uniforme y plantas genéticamente idénticas (Castillo, 2004). Ha demostrado un gran potencial productivo para fines comerciales, conservación y reintroducción de especies (Bello-Bello y Spinoso-Castillo, 2023).

4.2. Rol del cultivo *in vitro* en la conservación de orquídeas. El cultivo *in vitro* ha adquirido una importancia considerable en la investigación científica y la biotecnología aplicada a tejidos vegetales. Ha sido especialmente relevante para la reproducción de especies amenazadas de Orchidaceae (Sharry *et al.*, 2015). Naturalmente las orquídeas se reproducen por germinación de semillas o propagación vegetal, pero ambas formas son bastante lentas como para satisfacer la demanda de orquídeas a nivel mundial (Lal y Singh, 2020). Por ello, estas fueron las primeras plantas en ser propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas o embriones con fines comerciales (Griesbach, 1986; Díaz y Salgado-Garciglia, 2006).

A lo largo de varios años se han desarrollado más métodos de propagación de orquídeas, tanto de forma sexual (a través de semillas), como asexual (cultivo de segmentos vegetativos o explantes). En 2006, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en México estableció cultivos *in vitro* exitosos para la conservación de nueve especies de orquídeas mexicanas pertenecientes a los géneros *Guarianthe*, *Laelia*, *Oncidium* y *Epidendrum*. Establecieron sistemas de micropropagación y lograron la formación de callos, regeneración de estructuras y desarrollo de plántulas utilizando el medio MS con reguladores de crecimiento ANA (ácido naftalenacético), BA (benciladenina) y AG₃ (ácido giberélico) (Díaz y Salgado-Garciglia, 2006).

En Guatemala, se ha generado información muy útil desde 2013 a través del Proyecto de Investigación y Conservación de Orquídeas de Guatemala. Se han estudiado las causas del riesgo de extinción de este grupo y se proponen posibles soluciones, como el cultivo *in vitro*, para especies prioritarias. Desde entonces, el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Rafael Landívar ha generado protocolos de reproducción para 21 especies de orquídeas, y este número sigue en aumento. Una vez reproducidas con éxito por medio de micropropagación, las plantas se desarrollan en un invernadero para que puedan ser reintroducidas en orquidearios y/o áreas protegidas. Estos esfuerzos han permitido la sensibilización de diferentes grupos de interés a través de educación y difusión de conocimiento (López-Selva, 2016).

En general, la micropropagación en cultivo *in vitro* ha demostrado ser muy ventajosa porque es un sistema clonal que permite que se obtenga un gran número de plantas. Además, requiere un espacio relativamente pequeño y un ambiente bajo condiciones controladas y estériles. Es decir, las orquídeas no se ven afectadas por condiciones externas que usualmente las afectan en vida silvestre, como hongos dañinos, sequías, temperaturas muy altas o muy bajas. Esto permite reproducir especies amenazadas de manera eficiente para apoyar programas de reintroducción y restauración de hábitats (Domínguez *et al.*, 2008).

Sin embargo, también se han identificado riesgos y limitaciones en el cultivo *in vitro*. Este proceso requiere conocimientos técnicos especializados e infraestructura bien establecida para mantener las condiciones adecuadas, lo que implica costos específicos que podrían limitar su sostenibilidad a largo plazo (Sharry *et al.*, 2015). Aunque las técnicas como la micropropagación permiten una reproducción relativamente rápida, también presentan desventajas como la pérdida de diversidad genética. Ya que se selecciona germoplasma con ciertas características y solo se generan clones de este, provocando la pérdida de alelos diferentes (Merritt *et al.*, 2014).

La integración de diferentes técnicas *in vitro* es de suma importancia para la producción y conservación de las orquídeas. Por ello, este método continúa innovando y generando diferentes alternativas a nivel mundial. La germinación asimbiótica de semillas (germinación en laboratorio) es la metodología más usada. También, se realiza propagación a partir de cuerpos similares a protocormos (PLB) y regeneración directa a partir de explantes. Incluso se ha creado una tecnología de semillas artificiales donde se encapsulan embriones de orquídeas en una sustancia gelificada para que luego germinen y se desarrollen. Esto demuestra el potencial de continuar con el estudio de las orquídeas y promover colaboración internacional para su producción (Lal y Singh, 2020).

5. Enraizamiento *in vitro* de orquídeas

En el proceso de micropropagación, cuando los brotes crecen y se multiplican lo suficiente, inicia la fase de enraizamiento. Esta consiste en inducir el desarrollo de raíces

en un medio establecido. Cuando las plantas generan raíces resistentes y sanas, pasan a la fase de aclimatación, donde se preparan para un ambiente externo, pero aún controlado, como un invernadero. Luego, si se establecen exitosamente, se pueden reintroducir al hábitat que corresponde (Sharry *et al.*, 2015; Borges *et al.*, 2009).

5.1. Efecto de los reguladores de crecimiento en el enraizamiento. Hay varios factores que pueden afectar, de manera positiva o negativa, el enraizamiento *in vitro*. Entre ellos, factores ambientales (ej. luz y temperatura), factores hormonales (reguladores de crecimiento) y factores genéticos (diversidad genética de la planta). De estos aspectos, la presencia de reguladores de crecimiento en el medio nutritivo es de los más importantes a tomar en cuenta para el éxito de enraizamiento (Mirani *et al.*, 2017). Desde la biotecnología ha sido posible producir, de forma sintética, varios reguladores de crecimiento que cumplen el rol de fitohormonas que se encuentran de manera natural. Estos han permitido potencializar el proceso de cultivo *in vitro* de especies vegetales y por ello es importante comprender su función metabólica (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019).

Los reguladores de crecimiento son añadidos al medio de cultivo para estimular la respuesta celular. Si no se agregan, es muy difícil que se generen respuestas de interés como la diferenciación, crecimiento, elongamiento y división celular. Concretamente, se ha comprobado que el grupo de las auxinas es indispensable para el cultivo de tejidos en general y en particular, para la micropropagación de orquídeas ya que aumentan consistentemente la formación de tejidos radiculares (Yam y Arditti, 2009). Estas hormonas estimulan la iniciación y desarrollo de raíces por la activación de células del periciclo, las cuales son células parenquimáticas que rodean el xilema y floema en las raíces de las monocotiledóneas y que, al diferenciarse, se forman raíces laterales (Mendieta, 2013).

Al combinar las auxinas con otras auxinas o con citoquininas, se han obtenido resultados positivos en el desarrollo de brotes pequeños (Fukaki y Tasaka, 2009). Los dos tipos de hormonas se complementan en la estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal, ya que ambas favorecen la diferenciación celular. Una mayor concentración de

auxinas puede incrementar la producción de raíces y una mayor concentración de citoquininas puede promover la producción de brotes vegetales. Por lo tanto, son complementarias y pueden generar un medio adecuado para inducir la proliferación de células no diferenciadas (ej. meristemos) y acelerar el crecimiento vegetal (Alcántara-Cortés *et al.*, 2019).

5.2. Métodos generales para el enraizamiento *in vitro* de orquídeas. Para el enraizamiento *in vitro* de orquídeas la composición del medio de cultivo, condiciones y reguladores de crecimiento varían según de la especie y el tipo de explante que se utiliza. En general, en cuanto a las condiciones ambientales, las orquídeas deben estar expuestas a 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Mientras que el área de crecimiento idealmente debe estar a una temperatura de 23 ± 4 °C (Mendieta, 2013). En cuanto a los reguladores de crecimiento, principalmente se utilizan auxinas porque son las que han mostrado mayor efectividad en la formación de raíces (Mirani *et al.*, 2017).

Las auxinas se emplean solas o combinadas con otras hormonas y en diferentes concentraciones dependiendo de la planta (Mirani *et al.*, 2017). Las principales auxinas que se utilizan son: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA) (Mendieta, 2013). Estas y otras hormonas han sido bastante estudiadas para evaluar su rendimiento en enraizamiento con diferentes especies. Por ejemplo, para especies del género *Epidendrum*, específicamente *Epidendrum ibaguense* y *Epidendrum quinquepartitum*, el ácido naftalenacético (ANA) ha sido el más óptimo. En *E. ibaguense* se forma una mayor cantidad de raíces a una concentración de 2.0 mg/L (Vasco, 2020). Mientras que para *E. quinquepartitum* el nivel más óptimo es de 10 mg/L (Mendieta, 2013).

También se ha evaluado el desarrollo de estructuras y brotes en *Lycaste skinneri* y en *Brassia verrucosa* empleando ácido naftalenacético (ANA) suplementado con 6-benciladenina (BA), que es una citoquinina. La combinación de ambas hormonas se ha usado principalmente para la multiplicación de brotes, aunque promueve el desarrollo de estructuras en general. En *L. skinneri* la combinación de BA/ANA en concentraciones de 0/0.5 y 0.5/2.2. μ M estimula una mayor formación de estructuras (Mata-Rosas y Salazar-

Rojas, 2009). En *B. verrucosa* la multiplicación de brotes es mayor con una concentración de BA/ANA igual a 0.5/0.3 mg/L. Mientras que para inducción de raíces es más óptimo emplear solo ANA a una concentración de 0.5 mg/L (Thuy *et al.*, 2014).

Por último, el ácido giberélico o giberelina (AG₃) ha resultado ventajoso en la micropropagación de *Guarianthe skinneri* a partir de protocormos. La inducción y elongación de brotes y raíces en esta especie es controlada principalmente por dicha fitohormona. Sin embargo, es mejor en concentraciones pequeñas (0.001 μM), ya que las concentraciones más altas generan un efecto negativo en el desarrollo de las plantas. Por el contrario, el ácido indolacético (AIA) en concentraciones más altas (17.1 μM) ha mostrado resultados positivos en la cantidad de brotes y largo de raíces (Coello *et al.*, 2010).

B. Justificación

La familia Orchidaceae es reconocida por ser la segunda más diversa de las angiospermas y la más diversa entre las monocotiledóneas (Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Tecnología de la Universidad Rafael Landívar [Iarna-URL], 2018). Las orquídeas destacan por su capacidad de adaptarse a distintos hábitats, lo que ha favorecido su gran diversidad y amplia distribución en casi todo el mundo (Véliz, 2008). Son de gran importancia porque cumplen con múltiples roles ecosistémicos, tienen beneficios culturales, económicos y ornamentales. Incluso han demostrado potencial para alimento (ej. *Vanillia planifolia*) y medicina tradicional en algunos países, incluyendo Guatemala. Además, representan una parte importante del comercio mundial de flores, ya que representan ventas anuales de más de cuatro mil millones de dólares (López-Selva, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

Sin embargo, la familia Orchidaceae sufre muchas amenazas de diversa índole, entre las cuales destacan la extracción y comercio ilegal, pérdida de cobertura forestal, cambio climático y reducción de su hábitat (Vásquez *et al.*, 2021; Jiménez-López *et al.*, 2019). Asimismo, su alta especificidad en cuanto a polinizadores y micorrizas, junto con la baja tasa de germinación en vida silvestre, han restringido el crecimiento de sus poblaciones

y han hecho que sean más vulnerables (Lal y Singh, 2020). Actualmente se encuentran en un alto grado de amenaza y comprenden aproximadamente el 70% de las especies de flora incluidas dentro de CITES, la gran mayoría dentro del Apéndice II (Hinsley *et al.*, 2018).

Específicamente en Guatemala, se considera la familia de flora más amenazada. Desde 2016, todas las especies reportadas para el país se encontraban en peligro de extinción (López-Selva, 2016). Entre los factores que contribuyen a esta problemática, destaca la pérdida de cobertura boscosa en el país, que en el período de 2016-2020 alcanzó 61,099 hectáreas por año (Instituto Nacional de Bosques [INAB], 2024). Por otro lado, la ausencia de controles constantes y conciencia ambiental, facilitan las actividades de extracción y tráfico ilegal de vida silvestre. Dentro del país, las orquídeas son de los grupos de plantas más representativos que se han decomisado y son las que enfrentan una mayor presión específica, ya que sus raíces sufren daños inevitables por la extracción forzada y provoca que muchas no sobrevivan (Consejo Nacional de Áreas Protegidas [CONAP], 2020; López-Selva, 2016).

Ante estas problemáticas, se ha reconocido la necesidad de hacer estudios sobre técnicas que promuevan el crecimiento y la reproducción de las orquídeas para su conservación. Un ejemplo concreto de estos estudios es el que ha venido realizando el Iarna-URL, ya que ha convertido la conservación de orquídeas en una de sus líneas prioritarias. En este sentido, el laboratorio de biotecnología vegetal que tiene a su cargo dicha institución está enfocado en generar protocolos de reproducción de orquídeas nativas de Guatemala mediante técnicas de cultivo de tejidos para contribuir al Proyecto de Investigación y Conservación de Orquídeas de Guatemala. A través de procesos de investigación se han establecido técnicas de desinfección de cápsulas, germinación y propagación *in vitro* (López-Selva, 2016).

A pesar de estos esfuerzos en el laboratorio del Iarna-URL, en los últimos años se han presentado problemas con el enraizamiento *in vitro* de varias orquídeas, principalmente de los géneros *Epidendrum*, *Guarianthe*, *Oncidium* y *Lycaste*. La fase de enraizamiento es crucial porque determina, en gran parte, el éxito de la aclimatación y el establecimiento de las plántulas en condiciones *ex vitro* (Mirani *et al.*, 2017). Como consecuencia, las

orquídeas que no desarrollan raíces lo suficientemente grandes y abundantes permanecen en el laboratorio, algunas incluso durante años. Por ejemplo, un registro de *Sobralia macrantha* se ha mantenido durante nueve años en el laboratorio del Iarna-URL. De igual forma, dos registros de *Lycaste cochleata* han permanecido durante seis y cuatro años, respectivamente.

Lo anterior es de gran relevancia considerando que el mantenimiento de una especie de cultivo *in vitro* implica costos elevados principalmente por los insumos, equipo, infraestructura y personal especializado que se necesita (Muñoz, 2019). Aunque el costo exacto del cultivo de tejidos varía, se ha estimado que solamente el enraizamiento comprende del 35 al 70 % del costo total del proceso de micropropagación (Pence, 2010; Barba, 2001). Uno de los mayores desafíos ante esto es que la respuesta a los tratamientos para enraizamiento varía entre especies, lo que dificulta el establecimiento de un método efectivo (Betancourt, 2020).

Esta situación resalta la necesidad de optimizar metodologías de micropropagación para promover la sobrevivencia y rendimiento de las plántulas, especialmente en la fase de enraizamiento (Mendieta, 2013). En Guatemala se han realizado muy pocos estudios sobre cultivo *in vitro* de orquídeas y son aún menos los que tratan específicamente sobre el enraizamiento *in vitro* en diferentes especies (Agvik, 2011). Por ello, una investigación en esta área permite llenar vacíos de información y generar datos que favorezcan el establecimiento de protocolos más precisos y eficientes para la reproducción y el crecimiento óptimo de las orquídeas. Esto no solo mejorará la producción comercial, sino también los programas de conservación de estas plantas tan emblemáticas.

C. Objetivos

1. Objetivo general

Evaluar el efecto de distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*

2. Objetivos específicos

- Determinar la longitud promedio de las raíces generadas en plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha* con distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB)
- Establecer el tratamiento hormonal que induzca el enraizamiento *in vitro* en plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha* en un menor tiempo
- Comparar el porcentaje de enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha* ante diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB)

II. Metodología

A. Especies de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Tecnología de la Universidad Rafael Landívar (Iarna-URL) en la Ciudad de Guatemala. La experimentación se desarrolló de agosto del 2024 a enero del 2025. En primer lugar, se hizo una observación general del estado de las orquídeas que se encuentran en el área de crecimiento de dicho laboratorio y se registraron las que presentaban problema de enraizamiento. Específicamente, se consideraron las plantas que no mostraban buen desarrollo de raíces a pesar de haber sido transferidas múltiples veces. De estas especies registradas, se seleccionaron dos para este estudio con base en cuatro criterios: primero, que fueran especies nativas de Guatemala; segundo, que tuvieran estructuras foliares ya desarrolladas de al menos 1 cm de altura; tercero, que hubieran sido transferidas más de 10 veces y, cuarto, que tuvieran al menos 30 viales disponibles en el laboratorio para realizar los ensayos.

A partir de esto, se estableció que la primera especie de estudio sería *Sobralia macrantha*. Esta ingresó al laboratorio como el registro 147 desde junio del 2015 (plántulas de nueve años de edad) y cuenta con 34 viales que han sido transferidos de 15 a 16 veces. La segunda especie de estudio fue *Lycaste cochleata*, que corresponde al registro 306, el cual ingresó desde octubre del 2020 (plántulas de cuatro años de edad) y cuenta con 40 viales que han sido transferidos de 11 a 12 veces.

B. Selección de muestra para ensayos de enraizamiento *in vitro*

1. Preparación de medios

Para llevar a cabo los ensayos de enraizamiento se prepararon medios Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración ($\frac{1}{2}$ MS) con el pH ajustado a un rango óptimo de 5.7-5.8 siguiendo el protocolo para cultivo *in vitro* de orquídeas establecido por el Iarna (Iarna-URL, 2018). Se empleó el medio MS con menor concentración de sales porque de esta manera se han reportado resultados favorables en la fase de enraizamiento de algunas especies al reducir el estrés osmótico (Betancourt, 2020; Pinedo-Panduro *et al.*, 2022; Yalapuspa *et al.*, 2024). Sobre esta base, los medios de cultivo se modificaron añadiendo dos auxinas sintéticas: ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB), las cuales han sido utilizadas previamente en otros estudios y han generado éxito en el enraizamiento de otras especies de orquídeas (Mendieta, 2013; Vasco, 2020; Mata-Rosas y Salazar-Rojas, 2009; Saravia-Castillo *et al.*, 2022). En este estudio, cada auxina fue evaluada en tres concentraciones diferentes: 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L. También se incluyó un control negativo utilizando solo $\frac{1}{2}$ medio MS sin reguladores de crecimiento, lo que resultó en un total de siete tratamientos a evaluar en cada una de las especies de estudio (Cuadro 1) (Mendieta, 2013; Agvik, 2011; Vasco, 2020).

Para diferenciar visualmente los tratamientos se estableció antes un código de colores y se agregaron 1-2 gotas de colorante vegetal por litro según el color establecido para cada uno. Se prepararon en total 2 litros de medio por tratamiento y estos fueron distribuidos en 15 frascos de vidrio o cajas Magenta asegurando que cada recipiente contuviera aproximadamente 130 mL de medio. Todos los medios preparados, junto con los instrumentos que se usarían para medir y transferir, fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1.5 atm y se mantuvieron en condiciones estériles hasta su uso (Betancourt, 2020; Mendieta, 2013; Agvik, 2011; Vasco, 2020).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados con distintas concentraciones de ANA y AIB

Tratamiento	Color del medio	ANA (mg/L)	AIB (mg/L)
T1	Sin color	0.0	0.0
T2	Celeste	0.2	0.0
T3	Amarillo	0.4	0.0
T4	Rojo	0.6	0.0
T5	Verde	0.0	0.2
T6	Naranja	0.0	0.4
T7	Lila	0.0	0.6

2. Selección de plántulas y medición inicial

Todas las plántulas para los ensayos se obtuvieron al azar de viales que se encontraban en el área de crecimiento. Para alcanzar el total de muestra requerida, se usaron 10 viales de *Lycaste cochleata* y 11 de *Sobralia macrantha*. En una campana de flujo laminar, previamente desinfectada con etanol al 70 % y bajo condiciones estériles, se extrajeron las plántulas de cada vial (una por una) utilizando pinzas. Para todas las plántulas seleccionadas se hizo un registro inicial de sus raíces. En caso de que alguna ya presentara, se contó la cantidad de raíces y se midió la longitud en centímetros con una regla de metal esterilizada (Figura 15 y Figura 16). Luego, cada plántula era transferida a un frasco de vidrio o caja Magenta con nuevo medio (Agvik, 2011). Como se mencionó en la fase anterior, se prepararon 15 frascos de medio para cada tratamiento, por lo que se colocaron 3 plántulas en cada uno para ajustar 45 réplicas por tratamiento. Todos los frascos se rotularon en la parte externa para distinguir las plántulas como “A”, “B” y “C” (Figura 17).

Cabe mencionar que se definieron 45 réplicas tomando en cuenta posibles pérdidas por contaminación u otros factores. Para garantizar la validez estadística del análisis, se fijó como objetivo mantener una muestra mínima de 30 plántulas por tratamiento, por lo que se consideró un margen adicional de 15 plántulas (5 frascos) en cada uno. En síntesis, se utilizaron 315 plántulas por especie (630 plántulas en total). Después de sembrarlas y medirlas, se incubaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 °C con 12 horas

diarias de luz directa (Figura 18) (Vasco *et al.*, 2020; Mora-Cruz *et al.*, 2023; Iarna-URL, 2018). Para verificar si las condiciones de esta área se mantenían, se colocó un *datalogger* junto a las plántulas de *Lycaste cochleata* y otro junto a las de *Sobralia macrantha*. Estos se configuraron para medir la temperatura y humedad relativa cada 30 minutos para luego determinar un promedio diario (Figura 19 y Figura 20).

C. Monitoreo del crecimiento de las raíces

La medición realizada antes de la exposición a las hormonas se consideró como línea base para evaluar el crecimiento posterior. Con el fin de documentar un crecimiento gradual de las raíces en cada tratamiento se registró, por plántula, la cantidad de raíces presentes y la longitud de cada raíz. Este procedimiento se repitió cada cuatro semanas durante cuatro meses (120 días aproximadamente) siguiendo la misma metodología de la medición inicial. Antes de cada medición se preparaban medios siguiendo exactamente el mismo procedimiento de la fase 2a para transferir a un nuevo medio las plántulas ya medidas.

D. Análisis de datos

1. Recopilación y ordenamiento de datos

Después de cada medición, se fue registrando la siguiente información para cada plántula en una base de datos: mes de medición (0, 1, 2, 3 o 4), fecha en la que se midió, código de la plántula (ej. “306_T1F1A” corresponde a la plántula A del frasco 1 en el tratamiento 1 del registro 306), número de tratamiento, longitud de cada raíz y cantidad total de raíces. Asimismo, se calculó la longitud radicular promedio de cada plántula, se determinó si había o no enraizamiento y se registró una variable extra que surgió en el estudio: presencia-ausencia de raíces laterales. Para ello, se estableció que una plántula presentaba raíces laterales si al menos una de sus raíces principales mostraba este crecimiento. En cuanto al enraizamiento, se estableció un parámetro para clasificar las plántulas como “enraizada” o “no enraizada” en cada mes. Esto se hizo con base en los

criterios de aclimatación propuestos por Lesar *et al.*, (2012) y Park *et al.* (2003). Por un lado, Lesar *et al.* (2012) mencionan que las plántulas con al menos dos raíces de 2-3 cm de largo tienen mayor éxito de aclimatación. Mientras que Park *et al.* (2003) recomiendan que las plántulas tengan mínimo 3-4 raíces, pero no mencionan el tamaño de las mismas. Por lo tanto, para fines de este estudio se unieron ambos criterios y se estableció como enraizamiento la presencia de mínimo tres raíces de 2 cm de largo.

2. Análisis estadístico

Una vez ordenada la base de datos, se hicieron todos los análisis estadísticos en RStudio. Se hizo una selección de modelos aditivos generalizados mixtos (GAMM) para dos variables de respuesta: longitud promedio de las raíces (Gaussiano) y enraizamiento (binomial). Para ello se utilizaron los paquetes *MuMIn* (Bartoń, 2023), *performance* (Lüdtke *et al.*, 2021) y *mgcv* (Wood, 2011). Además, para validar el modelo seleccionado para cada variable de respuesta, se hizo un análisis de residuos con el paquete *DHARMA* (Hartig, 2022) (Figura 21 y Figura 22). Luego, se hizo una prueba de Chi-cuadrado y una comparación por pares de proporciones para determinar si existían diferencias significativas entre el porcentaje de enraizamiento final de todos los tratamientos. Finalmente, se elaboró una gráfica para visualizar qué tratamientos promovían la formación de raíces laterales, utilizando los datos de presencia y ausencia de raíces laterales por plántula.

III. Resultados

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en el enraizamiento *in vitro* de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha* se hicieron en total cinco mediciones para las 630 plántulas del estudio (desde la medición 0 hasta la medición 4), lo cual equivale a 3150 datos recolectados (Cuadro 7). Es importante mencionar que a lo largo del estudio se eliminaron 29 plántulas de *Lycaste cochleata* y 48 de *Sobralia macrantha* por muerte o contaminación. En estos casos, luego de ser eliminadas, las mediciones se reportaron como cero en los meses posteriores. A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de los análisis realizados.

A. Longitud promedio de raíces en diferentes tratamientos

A través de la selección de modelos se estableció que el mejor modelo para la longitud promedio de raíces era el que tenía las siguientes variables predictoras: mes de medición, la interacción especie×tratamiento, frasco y muestra (Cuadro 6). Donde el número de frasco y el código de cada muestra se establecieron como efectos aleatorios (Figura 23) y el mes de medición se consideró como una variable continua con efecto suavizado (Cuadro 8).

En primer lugar, se evaluó el efecto específico de cada tratamiento en cada una de las especies. En el caso de *L. cochleata*, hay tres tratamientos que tienen un efecto significativamente positivo en la longitud de sus raíces en comparación con el tratamiento sin hormonas (T1). Tanto T2 (0.29, $p < 0.001$) como T3 (0.78, $p < 0.001$) mostraron un efecto positivo altamente significativo. Específicamente, el efecto de T3 es mucho mayor, lo que indica que es el tratamiento más efectivo para favorecer el crecimiento de las raíces en esta especie. T5 también mostró un efecto positivo, pero este es menor que el de los anteriores (0.21, $p = 0.003$). Por otra parte, en el caso de *S. macrantha*, se puede establecer

que ningún tratamiento aumenta significativamente la longitud promedio de sus raíces. El único tratamiento con un efecto significativo fue T6, pero este efecto es negativo (-0.14, $p = 0.041$), es decir que tampoco favorece el crecimiento de sus raíces (Cuadro 2 y Figura 10).

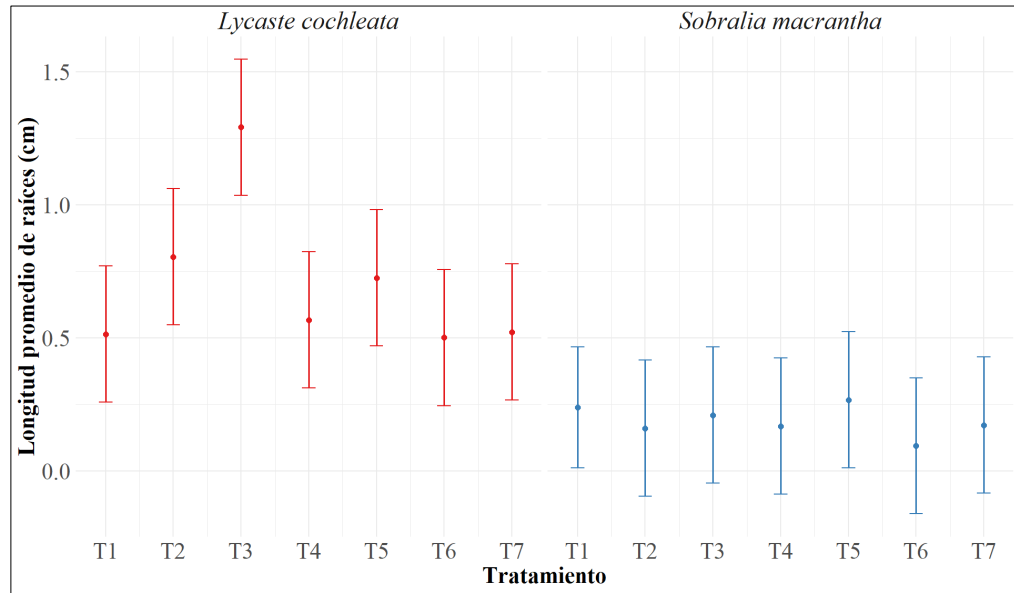
Cuadro 2. Resumen del modelo más parsimonioso para longitud promedio de raíces

Longitud promedio ~ Mes de medición + Especie×Tratamiento + Frasco + Muestra			
Efectos fijos	Coefficientes	IC	Valor-p
Especie			
<i>Lycaste cochleata</i>			
(Intercepto)	0.53	0.43 – 0.63	<0.001***
Tratamiento T2	0.29	0.15 – 0.43	<0.001***
Tratamiento T3	0.78	0.64 – 0.92	<0.001***
Tratamiento T4	0.05	-0.08 – 0.19	0.449
Tratamiento T5	0.21	0.07 – 0.35	0.003**
Tratamiento T6	-0.01	-0.15 – 0.13	0.854
Tratamiento T7	0.01	-0.13 – 0.15	0.913
Especie			
<i>Sobralia macrantha</i>			
(Intercepto)	0.80	0.71 – 0.90	<0.001***
Tratamiento T2	-0.08	-0.22 – 0.06	0.267
Tratamiento T3	-0.03	-0.17 – 0.11	0.684
Tratamiento T4	-0.07	-0.21 – 0.07	0.318
Tratamiento T5	0.03	-0.11 – 0.17	0.690
Tratamiento T6	-0.14	-0.28 – -0.01	0.041*
Tratamiento T7	-0.07	-0.21 – 0.07	0.346

Código de significancia: valor-p 0 = ‘***’ | 0.001 = ‘**’ | 0.01 = ‘*’

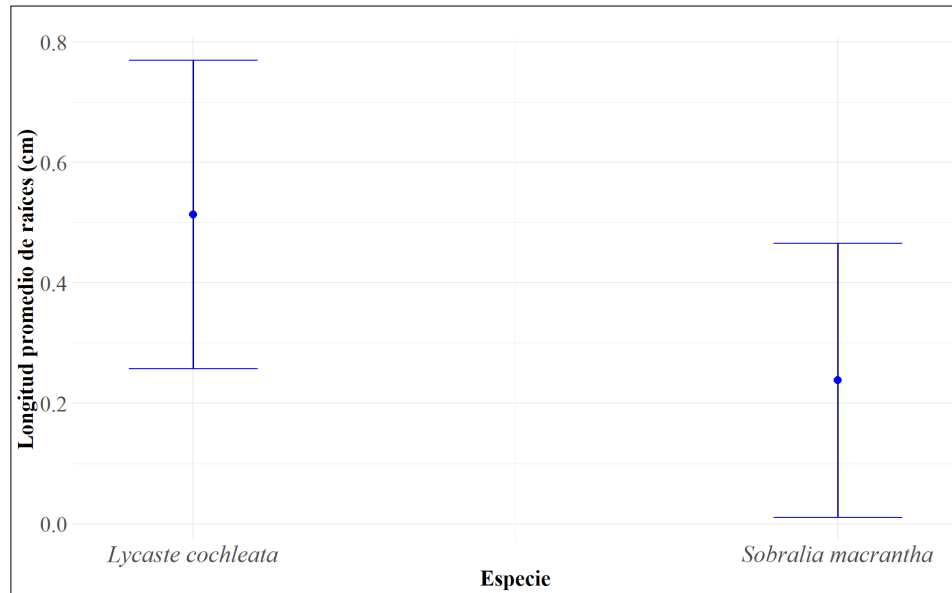
Nota. Se muestran los coeficientes expresados en centímetros de longitud, los intervalos de confianza (IC) y el valor-p para los efectos fijos. Los efectos que son significativos se muestran en **negrita**.

Figura 10. Predicción del modelo para longitud promedio de raíces según el efecto del tratamiento en cada especie.



En segundo lugar, se comprobó que la longitud promedio de raíces difiere significativamente entre especies ($p < 0.001$). Mensualmente las raíces de *Lycaste cochleata* tienden a crecer 0.28 cm más en promedio que las de *Sobralia macrantha* aún en un tratamiento sin hormonas (T1) (Cuadro 3 y Figura 11) Para evaluar de manera más específica cómo varía el efecto de cada tratamiento en función de la especie, se analizó la interacción entre Especie y Tratamiento. Por medio de esto se estableció que en el tratamiento 2 las raíces de *L. cochleata* crecen mensualmente 0.37 cm más que las de *S. macrantha* en este mismo tratamiento y esta diferencia es significativa (0.37, $p < 0.001$). Mientras que en el tratamiento 3 las raíces de *L. cochleata* crecen hasta 0.81 cm más mensualmente (0.81, $p < 0.001$). Por el contrario, en los tratamientos T4 ($p = 0.214$), T5 ($p = 0.066$), T6 ($p = 0.190$) y T7 ($p = 0.457$) el efecto no presentó una variación significativa (Cuadro 3).

Figura 11. Predicción del modelo para longitud promedio de raíces según el efecto de la especie.



Cuadro 3. Efecto de la especie, de la interacción especie×tratamiento y de las variables aleatorias y suavizadas en la longitud promedio de raíces según el modelo más parsimonioso

Longitud promedio ~ Mes de medición + Especie×Tratamiento + Frasco + Muestra			
Predictores	Coeficientes	IC	Valor-p
Especie	0.28	0.14 – 0.41	<0.001***
<i>Lycaste cochleata</i>			
<i>Lycaste cochleata</i> × Tratamiento T2	0.37	0.17 – 0.56	<0.001***
<i>Lycaste cochleata</i> × Tratamiento T3	0.81	0.61 – 1.00	<0.001***
<i>Lycaste cochleata</i> × Tratamiento T4	0.12	-0.07 – 0.32	0.214
<i>Lycaste cochleata</i> × Tratamiento T5	0.18	-0.01 – 0.38	0.066
<i>Lycaste cochleata</i> × Tratamiento T6	0.13	-0.06 – 0.33	0.190
<i>Lycaste cochleata</i> × Tratamiento T7	0.07	-0.12 – 0.27	0.457

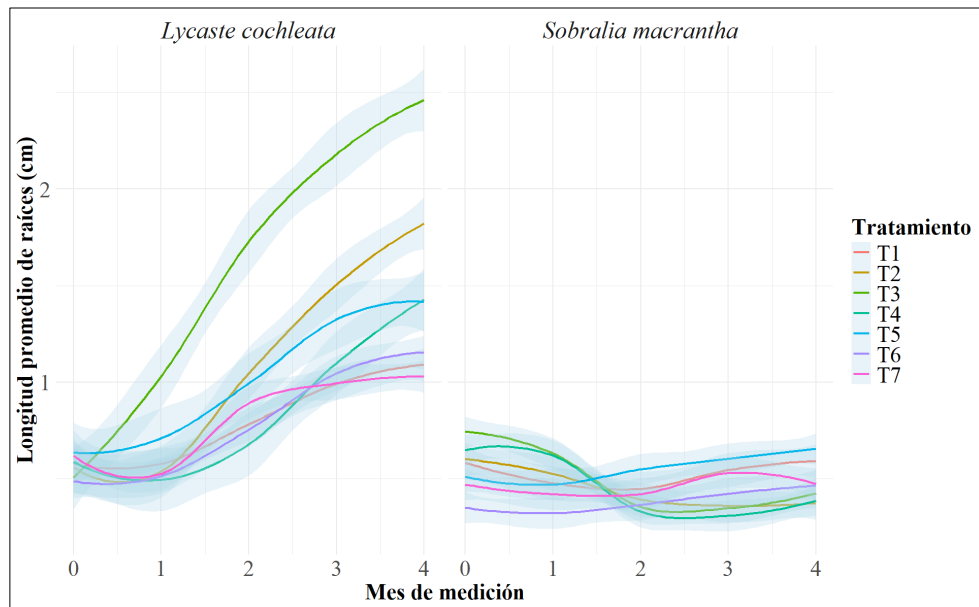
Longitud promedio ~ Mes de medición + Especie×Tratamiento + Frasco + Muestra			
Predictores	Coeficientes	IC	Valor-p
VARIABLES ALEATORIAS			Valor-p
Frasco			<0.001***
Muestra			0.019*
TÉRMINOS SUAVIZADOS			Valor-p
s(Mes de medición)			<0.001***

Código de significancia: valor-p 0 = '****' | 0.001 = '**' | 0.01 = '*'

Nota. Los coeficientes expresados en centímetros de longitud, los intervalos de confianza (IC) y el valor-p se muestran para cada predictor. Para las variables aleatorias y suavizadas se presenta su significancia estadística en valor-p. Los efectos que son significativos se presentan en **negrita**.

Por último, se determinó que sí hubo un efecto específico del frasco ($p < 0.001$) y de las muestras individuales (código de muestra) sobre la longitud promedio de raíces ($p = 0.019$). También se observó que la longitud de las raíces cambió significativamente con el tiempo de una manera que no es del todo lineal ($p < 0.001$) (Cuadro 3 y Figura 25). En la Figura 12 se presenta la tendencia de crecimiento en longitud promedio de raíces a lo largo del tiempo. En *L. cochleata* se observó un crecimiento bastante pronunciado en T3, en el cual se generaron raíces de hasta 2.5 cm al final de estudio. A diferencia de este, en T2 alcanzaron menos de 2 cm de longitud; en T4 y T5 menos de 1.5 cm en promedio. En el resto de tratamientos (T6 y T7) el crecimiento fue muy similar al del control (T1), ya que se generaron raíces de solo 1 cm en promedio aproximadamente y la curva deja de ascender luego de los dos o tres meses. En contraste, *S. macrantha* no presentó tendencias claras de crecimiento con ningún tratamiento y la longitud promedio se ubicó por debajo de 1 cm en todos los casos.

Figura 12. Crecimiento en longitud de las raíces durante los meses de estudio.



Nota. Se presentan las curvas con suavizado *loess*. La banda celeste representa el intervalo de confianza del 95 %.

B. Enraizamiento *in vitro* y su relación con el tiempo

Por medio de la selección de modelos se estableció que el mejor modelo para enraizamiento era el que no incluía la interacción especie×tratamiento. Es decir que tenía las siguientes variables predictoras: mes de medición, especie, tratamiento, frasco y muestra (Cuadro 6). Al igual que en el modelo de longitud promedio descrito anteriormente, el número de frasco y el código de cada muestra se establecieron como efectos aleatorios (Figura 24) y el mes de medición se consideró como una variable continua con efecto suavizado (Cuadro 8).

Con base en el modelo seleccionado, se estableció que la probabilidad de enraizamiento difiere significativamente entre especies ($p < 0.001$). Aún en un tratamiento sin hormonas (T1), la probabilidad de enraizamiento de *Lycaste cochleata* es significativamente mayor (11.03, $p < 0.001$) que la de *Sobralia macrantha*. Por otro lado, al evaluar el efecto de cada tratamiento comparados con el tratamiento control (T1), se puede determinar que T2, T3, T4 y T5 favorecen el enraizamiento de manera significativa

($p < 0.001$). Concretamente, T3 mostró ser el más efectivo porque tiene la probabilidad más alta (9.87, $p < 0.001$), seguido de T2 (5.75, $p < 0.001$), T5 (5.40, $p < 0.001$) y T4 (4.40, $p < 0.001$). Por el contrario, T6 y T7 no fueron significativos, es decir que su efecto sobre el enraizamiento no es diferente del control (T1) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resumen del modelo más parsimonioso para enraizamiento

Enraizamiento ~ Mes de medición + Especie + Tratamiento + Frasco + Muestra			
Predictores	Log-Odds	IC	Valor-p
Especie	11.03	7.85 – 14.22	<0.001***
<i>Lycaste cochleata</i>			
(Intercepto)	-20.02	-24.01 – -16.03	<0.001***
Tratamiento T2	5.75	3.36 – 8.13	<0.001***
Tratamiento T3	9.87	7.32 – 12.41	<0.001***
Tratamiento T4	4.40	2.02 – 6.77	<0.001***
Tratamiento T5	5.40	3.02 – 7.79	<0.001***
Tratamiento T6	1.88	-0.55 – 4.31	0.129
Tratamiento T7	0.28	-2.42 – 2.97	0.840
Variables aleatorias			Valor-p
Frasco			<0.001***
Muestra			0.530
Términos suavizados			Valor-p
s(mes de medición)			<0.001***

Código de significancia: valor-p 0 = ‘***’ | 0.001 = ‘**’ | 0.01 = ‘*’

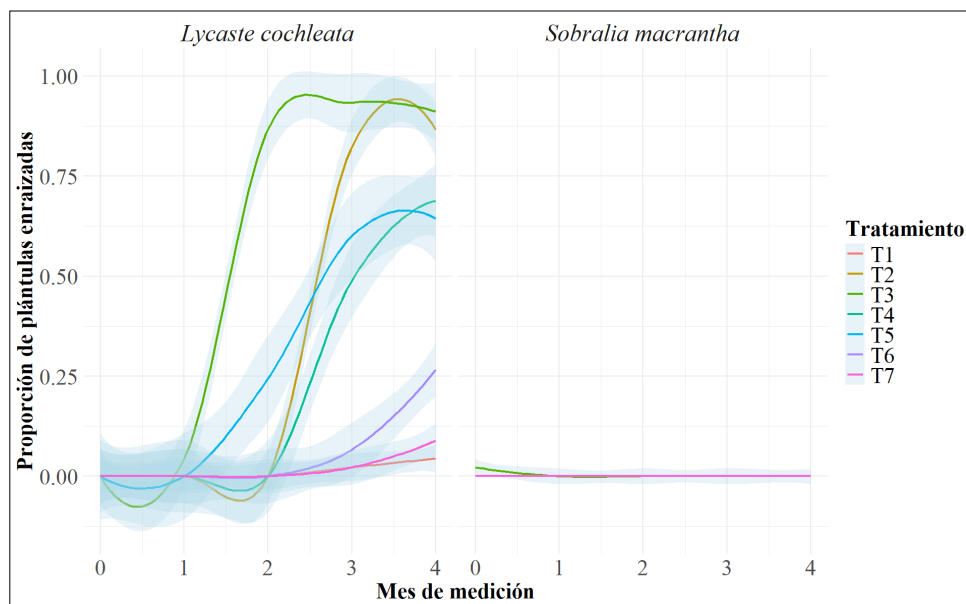
Nota. La probabilidad de enraizamiento expresada en una escala logarítmica (*Log-Odds*), los intervalos de confianza (IC) y el valor-p se presentan para los efectos fijos. Para las variables aleatorias y suavizadas se presenta su significancia estadística en valor-p. Los efectos que son significativos se muestran en **negrita**.

En cuanto a los efectos aleatorios, se determinó que sí hubo una variabilidad significativa entre frascos ($p < 0.001$) y que la variabilidad entre plántulas no fue significativa en el enraizamiento ($p = 0.530$). Por otro lado, se estableció que el tiempo influye significativamente sobre el enraizamiento de manera no lineal ($p < 0.001$) (Cuadro 4 y Figura 26). Para observar esta tendencia, en la Figura 13, se muestra el enraizamiento

a lo largo del tiempo por tratamiento y especie. Se observa que en varios tratamientos la curva de enraizamiento alcanzó un punto máximo y, luego de un tiempo, se estabilizó y empezó a descender, lo cual refleja la tendencia de crecimiento no lineal.

Por medio de esto, se estableció que el tratamiento que indujo el enraizamiento de *Lycaste cochleata* en un menor período de tiempo fue T3, ya que presentó un crecimiento desde el primer mes (4 %) y en el segundo mes el 87 % de las plántulas ya habían enraizado (Figura 27 y Figura 28). En este tratamiento se alcanzó un máximo de 93 % en el tercer mes y luego, en el último mes, se redujo a un 91 %. De manera similar, T2 alcanzó un alto porcentaje de enraizamiento, sin embargo, este crecimiento empezó a registrarse hasta el tercer mes (Figura 29), con un 82 % de plántulas enraizadas y un porcentaje final de 87 % en el cuarto mes. Asimismo, los tratamientos T4 y T5 presentaron un buen crecimiento, pero su porcentaje más alto fue 69 % y 64 % respectivamente. Mientras que en T6 enraizó el 27 % de las plántulas y en T7 solo el 9 %. Por último, en T1 (tratamiento control) apenas enraizó el 4 % después de los cuatro meses y sus raíces eran más delgadas (Figura 30). Por el contrario, *Sobralia macrantha* no presentó enraizamiento en ningún caso según el criterio de enraizamiento establecido para este estudio (Figura 13).

Figura 13. Proporción de plántulas enraizadas durante los meses de estudio.



Nota. Se presentan las curvas con suavizado *loess*. La banda celeste representa el intervalo de confianza del 95 %.

C. Comparación del porcentaje final de enraizamiento entre tratamientos

Dado que *S. macrantha* no enraizó en ninguna de las condiciones evaluadas, la comparación se realizó considerando únicamente los porcentajes finales de enraizamiento de *L. cochleata* en los siete tratamientos. Al analizar estos porcentajes mediante una prueba de Chi-cuadrado, se estableció que sí existen diferencias significativas entre tratamientos de *L. cochleata* ($\chi^2 = 142.38$, $p < 0.001$) (Cuadro 9). Para conocer en qué tratamientos específicos hay diferencias, se hizo una comparación por pares de proporciones. En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro 5. Comparación entre proporciones finales de enraizamiento de *Lycaste cochleata* en los siete tratamientos

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T2	<0.001***	-	-	-	-	-
T3	<0.001***	1.000	-	-	-	-
T4	<0.001***	0.304	0.124	-	-	-
T5	<0.001***	0.164	0.048	1.000	-	-
T6	0.071	<0.001***	<0.001***	0.002**	0.007**	-
T7	1.000	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.268

Código de significancia: valor-p 0 = '***' | 0.001 = '**' | 0.01 = '*' | 0.05 = '.'

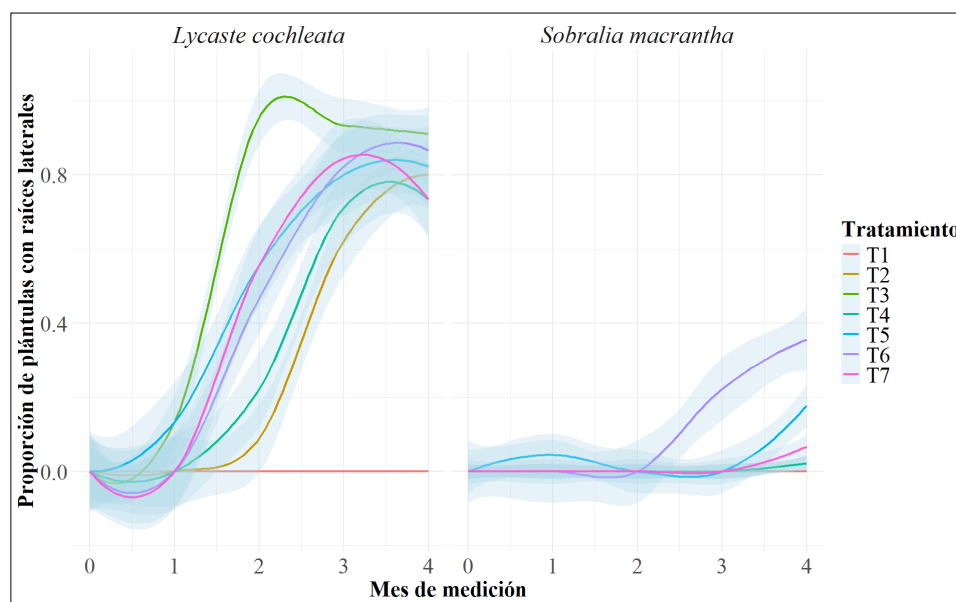
Nota. Los efectos que son significativos se muestran en **negrita**.

El porcentaje de plántulas enraizadas en los tratamientos T2 ($p < 0.001$), T3 ($p < 0.001$), T4 ($p < 0.001$) y T5 ($p < 0.001$) es significativamente diferente al de T1 (control). Al comparar estos cuatro tratamientos, solo se encontró diferencia entre T3 y T5, aunque esta no es tan significativa ($p = 0.048$). Además, es importante resaltar el hecho de que no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos que, en general, demostraron ser mejores para el enraizamiento: T2 y T3 ($p = 1.000$). Es decir que estos no difieren en cuanto al porcentaje final de plántulas enraizadas que alcanzan después de cuatro meses. Por último, al comparar los tratamientos T6 y T7 con el tratamiento control se obtuvo $p = 0.071$

y $p = 1.000$ respectivamente, lo que indica que el enraizamiento en estas concentraciones no difiere de un medio sin hormonas (Cuadro 5).

D. Formación de raíces laterales

Figura 14. Proporción de plántulas que presentaron raíces laterales durante los meses de estudio.



Nota. Se presentan las curvas con suavizado *loess*. La banda celeste representa el intervalo de confianza del 95 %.

Durante el estudio se observó la formación de raíces laterales en las plántulas expuestas a tratamientos hormonales, un fenómeno que no se presentó en el tratamiento control (T1). Desde el primer mes de medición, se empezó a registrar esto en los tratamientos T3 y T5. Con el paso del tiempo, también se fue registrando en los otros tratamientos. Para visualizar posibles tendencias, se elaboró la gráfica que se presenta en la Figura 14. Por medio de esto se puede inferir que el tratamiento 3 promueve una mayor formación de raíces laterales en *L. cochleata*, ya que para el segundo mes ya se presentaba este fenómeno hasta en un 96 % de las plántulas. Esto se redujo hasta un 91 % en el último mes, pero a pesar de esta reducción, se mantuvo como el tratamiento con mayor porcentaje. El segundo tratamiento con mayor porcentaje al final del estudio fue T6 con un 87 %,

seguido de T5 con 82 % y T2 con 80 %. Mientras que los tratamientos T4 y T7 generaron esto en el 73 % de las plántulas. Por otra parte, *S. macrantha* presentó más raíces laterales en T6, con un 36 %, seguido de T5 con 18 % y T7 con solo un 7 %. En el resto de tratamientos (T2, T3 y T4) solo el 2 % de las plántulas presentó esta característica (Figura 14).

IV. Discusión

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*. En función de esto, se determinó la longitud promedio de las raíces y el porcentaje de plántulas enraizadas de ambas especies en cada tratamiento a lo largo del tiempo. En general, los resultados obtenidos reflejan que *L. cochleata* respondió positivamente a varios tratamientos hormonales, mientras que *S. macrantha* no evidenció respuestas significativas en la mayoría de los escenarios.

En el caso de *Lycaste cochleata*, los resultados del modelo para longitud promedio indicaron que en el tratamiento 2 (ANA a 0.2 mg/L), tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L) y tratamiento 5 (AIB a 0.2 mg/L) sus raíces tienen un crecimiento significativamente mayor al de un tratamiento sin hormonas. Específicamente el efecto del tratamiento 3 fue mucho mayor al resto, lo que indica que es el tratamiento más efectivo para aumentar la longitud de las raíces en esta especie (Cuadro 2 y Figura 10). Como prueba de esto, se observó una tendencia de crecimiento más pronunciada y las raíces alcanzaron hasta 2.5 cm de largo en promedio (Figura 12). De manera similar, en *Lycaste skinneri* se reportó que ANA a una concentración de 0.5 mg/L favorece el desarrollo y la propagación de brotes a partir de protocormos (Mata-Rosas y Salazar-Rojas, 2009). Esto sugiere una posible respuesta común entre especies del género *Lycaste* a dicha hormona, incluso en diferentes fases de su desarrollo.

En cuanto al enraizamiento, por medio del segundo modelo se determinó que hay cuatro tratamientos que favorecen de manera significativa. Al igual que en el caso anterior, el tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L) resultó ser el que promueve una mayor probabilidad de enraizamiento, seguido del tratamiento 2 (ANA a 0.2 mg/L) y el tratamiento 5 (AIB a 0.2 mg/L) (Cuadro 4). Además, al evaluar la proporción de plántulas enraizadas de *L. cochleata*

en el transcurso del tiempo, se estableció que el tratamiento 3 induce el enraizamiento antes que el resto de tratamientos. Desde el primer mes enraizó el 4 % de las plántulas (Figura 27) y para el segundo mes el 87 % ya había enraizado, hasta alcanzar un máximo de 93 % en el tercer mes y una pequeña reducción a 91 % en el cuarto mes (Figura 13). Por lo tanto, se puede estimar que el tiempo ideal de exposición a este tratamiento es de tres meses para *L. cochleata*.

De igual forma, con otras especies del género *Epidendrum* y una especie del género *Dendrobium* se han hecho ensayos con AIB y ANA y en general, coinciden en que ANA es más beneficioso para el crecimiento radicular (Vasco, 2020; Mendieta, 2013; Mirani *et al.*, 2017). En primer lugar, para *Epidendrum ibaguense* se incluyó una concentración muy similar de ANA (0.5 mg/L) y se monitoreó su crecimiento, pero se obtuvieron resultados diferentes a los de este estudio, ya que esta fue la concentración menos efectiva para la inducción de raíces a lo largo del tiempo. En cambio, un tratamiento de ANA a 2.0 mg/L y otro de AIB a 1.0 mg/L mostraron un aumento más pronunciado en el número de raíces desde el día 30 hasta el día 80 (Vasco, 2020). En segundo lugar, los estudios realizados con *Epidendrum quinquepartitum* y *Dendrobium nobile* coinciden con el estudio anterior porque también utilizaron concentraciones altas (hasta 2.0, 3.0 y 10.0 mg/L) y establecieron que entre mayor es la concentración de ANA, mayor es la cantidad y longitud de las raíces (Mendieta, 2013; Mirani *et al.*, 2017).

Los estudios descritos anteriormente difieren de este estudio con *Lycaste cochleata*, ya que esta especie presentó raíces más abundantes y más largas en la concentración intermedia (0.4 mg/L) y en la concentración más baja (0.2 mg/L) de ANA. Las concentraciones más altas de hormona, tanto de ANA como AIB, resultaron ser fitotóxicas para esta especie después de unos meses, generando necrosis en sus raíces. Principalmente los tratamientos 6 y 7 (AIB 0.4 mg/L y AIB 0.6 mg/L) generaron un mayor debilitamiento y oscurecimiento en las raíces desde el tercer mes y para el cuarto mes, todas las raíces ya presentaban necrosis. Por otro lado, en el tratamiento 4, que fue la concentración más alta de ANA (0.6 mg/L), este fenómeno se empezó a observar hasta el cuarto mes, al igual que el tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L), pero en este último no fue tan pronunciado (Figura 31 y Figura 32). Esto explica por qué en el tratamiento 3 se presentó un máximo de enraizamiento en el

tercer mes y luego, en el cuarto mes se generó una pequeña reducción por la muerte de algunas plántulas como consecuencia del debilitamiento de sus raíces (Figura 13 y Figura 14). Por último, cabe resaltar que en el tratamiento 2 (ANA a 0.2 mg/L) no se registró necrosis en ningún momento (Figura 29 y Figura 31).

El tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L) también fue el que promovió una mayor formación de raíces laterales. En este se registró que el 96 % de las plántulas presentaban dicho crecimiento desde el segundo mes (Figura 14). Esto es un resultado de la estimulación hormonal que generan las auxinas al activar células del periciclo que, al diferenciarse, originan raíces laterales en las raíces principales. Lo cual es de gran beneficio porque aumenta la superficie de absorción (Mendieta, 2013). También se observó que los tratamientos 2 y 3 incrementan el tamaño de las plántulas, ya que algunas alcanzaron una altura de 3 a 5.5 cm de alto (Figura 32). Una tendencia muy similar se ha registrado en *Lycaste skinneri*, *Brassavola tuberculata* y *Epidendrum quinquepartitum*. A partir de esto se ha establecido que ANA promueve el crecimiento en altura de las plántulas al generar una respuesta de elongación en las hojas (Mata-Rosas y Salazar-Rojas, 2009; Mengarda *et al.*, 2017; Mendieta, 2013).

A partir de lo anterior, se puede inferir que para *Lycaste cochleata* la hormona ANA es muy favorable si se regula cuidadosamente la concentración y no se prolonga tanto el tiempo de exposición. En otros estudios también se ha reportado que una concentración muy alta de auxinas o una aplicación excesiva después de un enraizamiento inicial, puede llegar a inhibir la formación del sistema radicular y perjudicar la salud de las raíces porque altera el equilibrio natural y los procesos celulares (Overvoorde *et al.*, 2010; Zhao, 2010). Aunque los mecanismos de acción del ácido naftalenacético (ANA) aún no se conocen completamente, se ha establecido que esta hormona se caracteriza por una mayor estabilidad y una mayor capacidad de difusión que la del ácido indolbutírico (AIB). ANA se distingue por ser una auxina lipofílica, por lo que puede llegar a transportarse pasivamente a través de las membranas celulares. Además, no se degrada o metaboliza tan fácilmente y, por lo tanto, puede acumularse y llegar a otros tejidos, como el tejido foliar. Estas características pueden provocar que aun en concentraciones relativamente bajas

genere efectos notorios e incluso adversos en el crecimiento (Delbarre, 1996; De Klerk *et al.*, 1997).

En contraste con la primera especie, los resultados de *Sobralia macrantha* indicaron que en cuestión de longitud promedio, sus raíces no crecieron de manera significativa en ningún tratamiento. Asimismo, según el criterio establecido, esta especie no presentó enraizamiento en ninguno de los tratamientos (Figura 13). A lo largo del estudio se observó que, a diferencia de *L. cochleata*, los tratamientos que más parecían favorecer a *S. macrantha* fueron los de AIB. Por ejemplo, el tratamiento 5 (AIB a 0.2 mg/L) mostró crecimiento de raíces desde el primer mes (Figura 33). De igual forma, el tratamiento 6 (AIB a 0.4 mg/L) fue el que indujo una mayor formación de raíces laterales (Figura 14). No obstante, este crecimiento en las raíces no fue suficiente como para que el efecto fuera significativo (Cuadro 2 y Figura 10). También vale la pena mencionar que esta especie nunca mostró necrosis en sus raíces como consecuencia de la exposición a las hormonas, pero sí debilitamiento, principalmente con la hormona ANA (Figura 34, Figura 35 y Figura 36). En cambio, en los tratamientos con AIB, como el tratamiento 5, presentó raíces más verdes y resistentes hasta el final del estudio (Figura 37).

En línea con lo anterior, los dos modelos generados evidenciaron que la respuesta a los tratamientos varía significativamente entre especies, tanto en la longitud promedio de las raíces como en el enraizamiento. Por un lado, el primer modelo incluía la interacción entre especie y tratamiento, lo que permitió evaluar de manera más específica esta variación. Se estableció que los tratamientos 2 y 3 son bastante favorables para *L. cochleata*, mas no para *S. macrantha*. En el tratamiento 2 (ANA a 0.2 mg/L), las raíces de *L. cochleata* crecen al mes 0.37 cm más que las de *S. macrantha* en el mismo tratamiento. Mientras, en el tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L), las raíces de *L. cochleata* crecen mensualmente hasta 0.81 cm más que las de *S. macrantha*. Por otro lado, el efecto del resto de tratamientos hormonales no varía significativamente entre las especies (Cuadro 3).

Ahora bien, el modelo más parsimonioso para enraizamiento no incluía la interacción especie×tratamiento. Es importante mencionar esto ya que el modelo asume que los tratamientos afectan de la misma manera a ambas especies. Sin embargo, esto no

es real, ya que *S. macrantha* mostró claras diferencias con *L. cochleata* al no haber enraizado en ninguna de las condiciones evaluadas. El hecho de que este modelo no incluyera la interacción puede deberse a que solo una especie presentó datos de enraizamiento. Los registros de *S. macrantha* fueron siempre 0, lo que pudo haber provocado que el modelo asumiera que no hay diferencias porque no hay datos informativos de otra especie. Por lo tanto, el modelo final está basado prácticamente en los datos de *L. cochleata*.

En relación con las variables aleatorias de los modelos, se determinó que existe una variabilidad significativa entre los frascos utilizados como unidades de siembra, en los cuales se colocaban las plántulas. Esto puede deberse a que, aunque el medio de cultivo sea el mismo, cada frasco genera un microambiente con ciertas características de humedad, luz, nutrientes y oxígeno (Ribeiro *et al.*, 2019). Esto genera condiciones compartidas por las plántulas que se encuentran dentro del frasco haciendo que no sean completamente independientes entre sí. Además, las características de cada microambiente pueden tener ligeras variaciones. Específicamente en este estudio, es muy probable que se hayan generado microambientes distintos dado que se utilizaron frascos de vidrio y cajas Magenta como recipientes de cultivo, los cuales difieren en el tipo de material y el nivel de transparencia.

En cuanto al efecto de la muestra (cada plántula individual), se determinó que este fue significativo en la longitud promedio de las raíces, mas no en el enraizamiento. Primero, la variación que se presentó para longitud promedio puede deberse a las diferencias que, de por sí, existen entre individuos. Esto se debe a que todas las plántulas estudiadas fueron sembradas a partir de una cápsula, es decir que vienen del mismo germoplasma que contenía varias semillas. Cada una de ellas corresponde a un individuo diferente, por lo que naturalmente existe variabilidad genética entre individuos asociada al proceso de meiosis; no son clones de una planta madre. Esto hace que en las condiciones evaluadas existan ciertas diferencias aún entre plántulas de la misma especie (Betancourt, 2020; Abdelnour y Escalant, 1994).

En cambio, el efecto no significativo de la muestra en el modelo de enraizamiento puede deberse a que en este estudio la variable de enraizamiento considera tanto cantidad como longitud de las raíces. Por lo cual es un crecimiento que depende fuertemente de la presencia de otros agentes como las hormonas, porque toma en cuenta la elongación y la división celular. El hecho de que no haya efecto de la muestra en el enraizamiento indica, de cierta forma, que el individuo no aporta tanto o no resulta ser tan significativo en el crecimiento comparado con el efecto que tiene la acción hormonal u otras variables consideradas en el modelo. Contrario a la longitud por sí sola, en la cual la variabilidad de cada individuo tiene un peso más considerable porque es un proceso dependiente principalmente de la fisiología de la plántula.

Abordando otro aspecto, es importante señalar que se descartó la posibilidad de que la transferencia y manipulación mensual de las plántulas influyera en los resultados. Se estableció que la medición de las raíces y el cambio de medio se realizaría una vez al mes porque coincide con el protocolo establecido por el Iarna. En este se menciona que el período ideal para reemplazar el medio es una vez al mes porque coincide con el tiempo en el que las plántulas tardan en absorber nutrientes disponibles y representa un procedimiento estándar de los cultivos *in vitro* (Iarna-URL, 2018). Por lo tanto, los efectos observados pueden atribuirse con mayor certeza a los tratamientos hormonales aplicados y no a factores relacionados con el manejo o manipulación de las plántulas.

Por último, respecto a la comparación por pares entre porcentajes finales de enraizamiento, es importante mencionar que esta se hizo considerando solo los siete tratamientos de *L. cochleata*, debido a que *S. macrantha* nunca enraizó. Por medio de esto se comprobó que los tratamientos que favorecen el enraizamiento y generan un porcentaje de plántulas enraizadas significativamente diferente al de un tratamiento sin hormonas son: tratamiento 2 (ANA a 0.2 mg/L), tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L), tratamiento 4 (ANA a 0.6 mg/L) y tratamiento 5 (AIB a 0.2 mg/L). Además, el análisis reveló un hallazgo particularmente relevante: el porcentaje de enraizamiento de los tratamientos 2 y 3 no es significativamente diferente entre sí (Cuadro 5). Vale la pena resaltar esto ya que ambos fueron los tratamientos más efectivos para *L. cochleata*. Sin embargo, a pesar de no haber diferencia en el porcentaje de enraizamiento final, es importante notar que el tratamiento 3

indujo raíces dos meses antes que el tratamiento 2 (Figura 13). Este factor del tiempo es de especial interés considerando los costos elevados que implica mantener una especie en condiciones *in vitro* y la necesidad de optimizar estas metodologías para conservación (Muñoz, 2019; Mendieta, 2013).

En síntesis, los resultados de esta investigación evidenciaron que la respuesta a los tratamientos hormonales difiere notablemente entre *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*. Estas diferencias pueden atribuirse a varios factores. En primer lugar, la edad de las plántulas, ya que el registro de *S. macrantha* llevaba nueve años dentro del laboratorio en condiciones *in vitro*, mientras que el de *L. cochleata* tenía seis años de edad y esto podría influir en la capacidad de respuesta hormonal. En segundo lugar, se ha determinado que *S. macrantha* es una especie con requerimientos más específicos en cuanto al medio de cultivo, el complejo orgánico y la concentración de sales dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre. Se ha comprobado que, tanto para germinación como desarrollo, se establece mejor en medios de cultivo más simples en cuanto a composición y concentración de sales, como el medio Knudson C. Este ha demostrado ser más beneficioso porque tiene una menor cantidad de sales comparado con el medio MS. Asimismo, se ha observado un mejor desarrollo al añadir jarabe de maíz como fuente de carbono en el medio, en lugar de sacarosa (Betancourt, 2020).

Tomando en cuenta que *S. macrantha* tiene requerimientos diferentes y más específicos, se puede inferir que haberla cultivado en medio MS durante todos estos años, podría haber limitado su desarrollo adecuado ya que se ha comprobado que este medio no es favorable para esta especie (Betancourt, 2020). Una posible evidencia de ello es que, desde el inicio del estudio, varias plántulas de esta especie tenían una apariencia débil y a pesar de que ya tenían algunas raíces, estas se encontraban bastante frágiles. También se ha establecido que, desde la etapa de germinación, pueden observarse diferencias entre orquídeas terrestres, como *S. macrantha* y epífitas, como *L. cochleata*. Esto debido a que las semillas de especies terrestres tienen una testa más lignificada y por ello, requiere pretratamientos específicos. Si no se aplican estos pretratamientos pueden generarse complicaciones en el proceso de germinación y en el desarrollo desde las primeras etapas (Yeung *et al.*, 2018; Betancourt, 2020).

En cuanto a la concentración ideal de auxinas para enraizamiento, se ha determinado que esta varía según la planta y su genotipo. Aunque este aspecto no se haya comprobado experimentalmente en este estudio, es importante considerar que las diferencias observadas en este estudio también pueden deberse, en parte, al genotipo de cada especie, ya que este define factores fisiológicos y bioquímicos que, a su vez, determinan cómo reacciona cada una a diferentes condiciones. De la misma manera, en otros estudios se ha comprobado que las cantidades de reguladores de crecimiento y sus combinaciones no son las mismas para todas especies porque los genotipos responden de manera diferente (Teixeira *et al.*, 2017; Betancourt, 2020; Quintero *et al.*, 2003).

Por último, se debe tomar en cuenta el hábito de cada especie. *S. macrantha* es una especie terrestre, por lo que sus raíces pueden ser más robustas, adaptadas a una absorción más gradual y a suelos con variabilidad en composición química. Lo cual podría generar una mayor tolerancia a las hormonas o una menor sensibilidad a las concentraciones evaluadas. A diferencia de *L. cochleata* que, al ser una especie epífita, podría estar adaptada a mecanismos de absorción más rápidos o eficaces y esto la hace más sensible a las auxinas sintéticas aún con dosis bajas (Rasmussen, 1995; Universidad Autónoma de Chapingo, 2001).

Aunque *S. macrantha* no haya enraizado según el criterio establecido, es importante considerar la forma y el funcionamiento de sus raíces. El criterio podría no ser igualmente aplicable a esta especie, dado que existen diferencias estructurales en las raíces asociadas al hábito de crecimiento (Schulz *et al.*, 2006). Esto es de especial relevancia considerando que esta especie sí presentó respuestas positivas ante tratamientos de AIB, principalmente en AIB a 0.4 mg/L, que generó un mayor crecimiento de raíces laterales. Esto podría indicar que sí hay un efecto en la división celular, pero menos pronunciado y mucho más lento en comparación con *L. cochleata*, ya que se empezó a observar hasta después de tres o cuatro meses (Figura 14). Comprender estas diferencias en la respuesta de cada especie es fundamental para optimizar protocolos de enraizamiento más precisos, especialmente en aquellas especies con requerimientos muy específicos y en las que aún existen vacíos de información.

V. Conclusiones

- La longitud promedio de raíces difirió significativamente entre especies (valor-p < 0.001), donde las raíces de *Lycaste cochleata* tienden a crecer más que las de *Sobralia macrantha*.
- El tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L) promovió de manera significativa el crecimiento de las raíces de *Lycaste cochleata*, alcanzando una longitud promedio de hasta 2.5 cm al final del estudio (valor-p < 0.001). En contraste, las raíces de *Sobralia macrantha* no presentaron un crecimiento significativo en ninguno de los tratamientos evaluados.
- La probabilidad de enraizamiento difirió significativamente entre especies, donde *Lycaste cochleata* presentó una mayor probabilidad de enraizamiento que *Sobralia macrantha* (11.03, valor-p < 0.001).
- El tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L) indujo el enraizamiento en *Lycaste cochleata* en un menor período de tiempo, logrando un máximo de 93 % de plántulas enraizadas en tres meses.
- *Sobralia macrantha* no presentó enraizamiento en ninguna de las condiciones evaluadas, según el criterio establecido.
- Existen diferencias significativas entre los porcentajes finales de enraizamiento generados por los siete tratamientos en *Lycaste cochleata*, donde los tratamientos 2 (ANA a 0.2 mg/L), 3 (ANA a 0.4 mg/L), 4 (ANA a 0.6 mg/L) y 5 (AIB a 0.2 mg/L)

mostraron un enraizamiento significativamente diferente al de un tratamiento sin hormonas (valor-p < 0.001).

- El porcentaje final de enraizamiento de *Lycaste cochleata* en el tratamiento 2 (ANA a 0.2 mg/L) y el tratamiento 3 (ANA a 0.4 mg/L) no mostró diferencias significativas (valor-p = 1.000). Sin embargo, al considerar el factor del tiempo, el tratamiento 3 resultó ser más efectivo porque indujo el enraizamiento dos meses antes que el tratamiento 2.
- Se determinó que existe un efecto significativo del frasco en la longitud promedio de las raíces y en el enraizamiento. En cambio, el efecto de la muestra fue significativo en la longitud promedio de raíces, pero no en el enraizamiento.
- El tratamiento 3 (ANA a mg/L) generó un mayor porcentaje de plántulas de *Lycaste cochleata* con raíces laterales (96 %), mientras que en *Sobralia macrantha* el tratamiento 6 (AIB a 0.4 mg/L) fue el que generó un mayor porcentaje de plántulas con raíces laterales (36 %).

VI. Recomendaciones

- Se determinó que el ácido naftalenacético (ANA) es más favorable para el enraizamiento de *Lycaste cochleata*. Específicamente, las concentraciones de 0.2 mg/L y 0.4 mg/L fueron las más efectivas. Se recomienda cultivar las plántulas de esta especie en ½ medio MS con ANA a 0.4 mg/L, ya que el enraizamiento se genera en un menor período de tiempo.
- Para *Lycaste cochleata*, el tiempo óptimo de enraizamiento con ANA a 0.4 mg/L es de tres meses. Por lo tanto, se recomienda limitar la fase de enraizamiento a dicho período de tiempo o en cuanto se observen raíces de al menos 2 cm de largo para iniciar el proceso de aclimatación. Esto permitirá evitar posibles efectos fitotóxicos causados por una exposición muy prolongada a la hormona.
- En este estudio, se utilizaron plántulas de seis (*L. cochleata*) y nueve años (*Sobralia macrantha*) de edad. Debido a la limitada respuesta de *Sobralia macrantha* se recomienda iniciar un nuevo cultivo de esta especie a partir de una nueva cápsula y monitorear su desarrollo para luego generar ensayos con material más vigoroso y evaluar si la edad realmente fue un factor que influyó en el enraizamiento.
- Además de la edad de las plántulas, *Sobralia macrantha* demostró tener requerimientos más específicos y diferentes a los de *Lycaste cochleata*. Por ello, se recomienda iniciar un nuevo cultivo de plántulas de *S. macrantha* en medio Knudson C y luego implementar ensayos de enraizamiento con diferentes concentraciones de ANA y AIB para evaluar cómo responde en condiciones distintas al medio MS.

- Este estudio respalda el efecto positivo que pueden tener las auxinas sintéticas sobre el enraizamiento *in vitro* de orquídeas, pero esto varía entre especies. Por lo tanto, se recomienda dar continuidad a investigaciones similares tanto con especies del mismo género que las de este estudio, como con especies de otros géneros, para evaluar tendencias y establecer un protocolo que favorezca el enraizamiento de más registros que se encuentran dentro del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Iarna-URL.
- Además del enraizamiento, en los tratamientos con ANA se observó un aumento en el tamaño de las hojas de *Lycaste cochleata*. En próximas investigaciones, se recomienda complementar los ensayos de enraizamiento *in vitro* con mediciones de las hojas para identificar qué tratamientos favorecen, no solo la formación de raíces, sino también un crecimiento general de las plántulas.
- Se recomienda hacer más investigaciones en las que se relacione el tiempo con el crecimiento de las raíces para establecer períodos óptimos de enraizamiento de diferentes especies. De esta forma, se podría establecer en qué fase de crecimiento de las plántulas aplicar reguladores de crecimiento y en qué momento retirarlos o iniciar la fase de aclimatación.
- Se observó que las hormonas favorecen la formación de raíces laterales en plántulas de *Lycaste cochleata* y *Sobralia macrantha*. De manera específica, en *Sobralia macrantha* se registró este crecimiento principalmente en los tratamientos con AIB. En próximas investigaciones se recomienda considerar la presencia/ausencia de raíces laterales como otra variable de respuesta en los modelos para evaluar si el efecto de los tratamientos realmente es significativo.
- Se identificó variabilidad significativa entre muestras (individuos) en el modelo de longitud promedio de raíces. Por lo tanto, se recomienda complementar los estudios de enraizamiento con análisis moleculares para evaluar con mayor precisión esta variabilidad natural entre individuos, así como la diversidad genética de las plántulas.

VII. Referencias

- Abdelnour, A. y Escalant, J. V. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. CATIE. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/888>
- Ackerman, J. D. y del Castillo, M. (1992). *The Orchids of Puerto Rico and the Virgin Islands*. University of Puerto Rico Press.
- Agvik, E. X. (2011). *Enraizamiento y aclimatación de plántulas de Vanilla planifolia Andrews, provenientes de cultivo de tejidos con fines de conservación*. [Tesis de Licenciatura en Biología, universidad de San Carlos de Guatemala]. <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/B214.pdf>
- Ajú, M. M. (2009). *Las orquídeas: bases generales para su conocimiento y enseñanza*. [Tesis de Maestría en Docencia Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/1621>
- Alcántara-Cortés, J. S., Acero, J., Alcántara, J. D. y Sánchez, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Alfaro, A., McGill, C., Nadarajan, J., Archila Morales, F. y Clavijo McCormick, A. (2023). Seed Morphology of Three Neotropical Orchid Species of the *Lycaste* Genus. *Seeds*, 2(3), 331-339. <https://doi.org/10.3390/seeds2030025>
- Ames, O. y Correll, D. S. (1985). *Orchids of Guatemala and Belize*. Dover Publications.
- Archila, F. L., Lipinska, M. M., Dudek, M. y Szlachetko, D. L. (2023). *Schiedeella bajaverapacensis* (Orchidaceae, Spiranthinae), a New Orchid Species from

- Guatemala. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6).
<https://doi.org/10.3390/ijms24065362>
- Archila, F. y Chiron, G. (2022). Guatemala, diversification center of the genera *Lycaste* and *Selbyana* (Orchidaceae), with a new nothospecies. *Richardiana*, 6, 36-40.
- Báez-Pérez, A., González-Molina, L., Solís, E., Bautista-Cruz, A. y Bernal-Alarcón, M. A. (2015). Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3).
- Banda-Sánchez, L. C., Pinzón-Aiza, Y. H. y Vanegas-Martínez, L. E. (2017). Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea* sp. de la zona andina, Fusagasugá, Colombia. *Biota Colombiana*, 18(1), 80-87.
<https://doi.org/https://dx.doi.org/10.21068/c2017.v18n01a5>
- Barba, A. (2001). *Micropropagación de plantas*. Trillas.
- Bartoń, K. (2023). *_MuMIn: Multi-Model Inference_*. R package version 1.47.5.
<https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Berjak, P. y Pammenter, N. W. (2017). *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Science Direct. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00048-4>
- Bello-Bello, J. J. y Spinoso-Castillo, J. L. (2023). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo nano*, 16(30).
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>
- Betancourt, A. R. (2020). *Germinación asimbiótica in vitro de Sobralia macrantha Lindl. una orquídea terrestre nativa de México*. [Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México].
<https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000804010/3/0804010.pdf>

- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I. y Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 127-135.
- Caponetti, J. D., Gray, D. J. y Trigiano, R. N. (2018). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnología INIA.
- Cetzal, W. y Noguera-Savelli, E. (2014). *Orchidaceae: the largest family of flowering plants*. <https://bit.ly/43MEqWM>
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Van den Berg, C., y Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*, 177(2), 151-174.
- Coello, C. Y., Miceli, C. L., Orantes, C., Dendooven, L. y Gutiérrez, F. A. (2010). Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & WE Higgins. *Gayana Botánica*, 67(1), 19-26.
- Collantes, B., Soto, C. y Koechlin, J. (2007). *Orquídeas de Machu Picchu*. Inkaterra asociación
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas [CONAP]. (2020). *Estrategia nacional contra el tráfico ilegal de vida silvestre en Guatemala 2020-2029*. <https://conap.gob.gt/wp-content/uploads/2020/10/Estrategia-Contra-el-Trafico-de-Vida-Silvestre.pdf>
- Cortes, J. A., Pérez, M. C., y Mora, R. S. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *In vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias (UNAD)*, 1(1).

- De Klerk, G. J., Brugge, J. T. y Marinova, S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant cell, tissue and organ culture*, 49(1), 39-44. <https://doi.org/10.1023/A:1005850222973>
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V. y Guern, J. (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, 198, 532-541. <https://doi.org/10.1007/BF00262639>
- Díaz, I. y Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*, 8(1), 138-149.
- Díaz-Toribio, M. H. (2013). *Manual de cultivo de orquídeas*. Secretaría de Educación de Veracruz.
- Díaz, M. (2015). Orquídeas: sexo, pasión e investigación. *Revista Innovación y Ciencia*, (1), 48-56.
- Dix, M.A & Dix M.W. (2006). *Diversity, Distribution, Ecology and Economic Importance of Guatemalan Orchids*. En E. Cano (Ed.), Biodiversidad de Guatemala. Universidad del Valle de Guatemala.
- Domínguez, M. S., González, M. L., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S. J. y Pérez, E. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53-62.
- Duarte, I. J. (2014). *Germinación in vitro de Barkeria uniflora Lex. Dressler & Halbinger, una orquídea endémica de México*. [Tesis de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México]. https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_duarte_salinas.pdf

- Dressler, R. L. (2005). How many orchid species? *Selbyana*, 155-158.
- Fernández-Fernández, D., Tobar-Suárez, F., Garzón-Santomaro, C., Yáñez-Muñoz, M., Mena-Jaén, J., González-Romero, D. (2018). *Orquídeas y bromelias de la provincia de El Oro: una guía de identificación para los principales géneros y especies del páramo al manglar*. GADPEO-INABIO.
- Flores-Hernández, L. A., Robledo-Paz, A. y Jimarez-Montiel, M. J. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(6), 1315-1328.
- Flórez, V. J. y Aleixo, M. F. (2009). Ácido abscísico acelera el desarrollo floral de solidago en días cortos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4835-4841.
- Freuler, M. J. (2008). *Orquídeas: una guía esencial para el cuidado y cultivo de estas increíbles y sofisticadas epífitas*. Albatros.
- Fukaki, H. y Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 437-449. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9417-2>
- Gaskett, A. C. (2011). Orchid pollination by sexual deception: pollinator perspectives. *Biological Reviews*, 86(1), 33-75. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00134.x>
- Griesbach, R. J. (1986). Orchid tissue culture. En: R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, F. A., R. H. Lawson (Eds.), *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops: current plant science and biotechnology in Agriculture* (Vol. 2). Springer.

- Hartig, F. (2022). *_DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models_*. R package version 0.4.6. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMa>
- Hinsley, A., de Boer, H. J., Fay, M. F., Gale, S. W., Gardiner, L.M., Gunasekara, R. S., Kumar, P., Masters, S., Metusala, D., Roberts, D. L., Veldman, S., Wong, S. y Phelps, J. (2018). A review of the trade in orchids, and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 435–455. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box083>
- Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Tecnología de la Universidad Rafael Landívar [Iarna-URL]. (2018). *Protocolo para el cultivo in vitro de orquídeas con distribución en Guatemala*. [Folleto]. Universidad Rafael Landívar.
- Instituto Nacional de Bosques [INAB]. (2024). *Informe de labores 2023*. https://www.inab.gob.gt/images/memoria_de_labores/MEMORIA%20DE%20LABORES%2023_Final.pdf
- Islam, O. M., Matsui, S. y Ichihashi, S. (1999). Effects of light quality on seed germination and seedling growth of *Cattleya* orchids *in vitro*. *Engei Gakkai Zasshi*, 68(6), 1132–1138. <https://doi.org/10.2503/jjshs.68.1132>
- Jiménez-López, D. A., Solano, R., Peralta-Carreta, C., Solórzano, J. V., y Chávez-Angeles, M. G. (2019). Species richness may determine the income from illicit wild orchid trading in traditional markets in Mexico. *Economic Botany*, 73(2), 171-186. <https://doi.org/10.1007/s12231-019-09460-5>
- Lal, N. y Singh, M. (2020). Prospects of plant tissue culture in orchid propagation: a review. *Indian Journal of Biology*, 7(2), 103-110. <http://dx.doi.org/10.21088/ijb.2394.1391.7220.15>

- Lascuráin, M., List, R., Barraza, L., Díaz, E., Gual, F., Maunder, M., Dorantes, J. y Luna, V. E. (2009). Conservación de especies *ex situ*. *Capital Natural de México*, 2, 517-544.
- Lesar, H., Hlebec, B., Ceranic, N., Kastelec, D. y Luthar, Z. (2012). Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under *in vitro* conditions. *Acta agriculturae Slovenica*, 99(1), 69-75. <https://doi.org/10.14720/aas.2012.99.1.14524>
- López-Selva, M. M. (2016). Orquídeas de Guatemala: características principales, estatus de conservación y generación de conocimiento en la URL. *Revista Eutopía*, 1(2), 205-216.
- Lowman, M. D. y Rinker, H. B. (2004). Chapter 9 – Vascular Epiphytes en Benzing D. (Ed.), *Forest Canopies* (2ª ed., pp. 175-211). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012457553-0/50014-9>
- Lüdecke, D., Ben-Shachar, M. S., Patil, I., Waggoner, P. y Makowski, D. (2021). performance: An R Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3139. <https://doi.org/10.21105/joss.03139>
- Martínez-Villegas, Y. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Vilelgas-Torres, O. G., Castillo-Gutiérrez, A. y Alia-Tejacal, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnia mexicana*, 38(4), 369-374.
- Mata-Rosas, M., y Salazar-Rojas, V. M. (2009). Propagation and establishment of three endangered Mexican orchids from protocorms. *HortScience*, 44(5), 1395-1399. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.5.1395>

- Menchaca, R. A. y Moreno, D. (2011). *Conservación de orquídeas, una tarea de todos*. Universidad Autónoma Chapingo. <https://bit.ly/4muSNG9>
- Mendieta, J. M. (2013). *Inducción al enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de orquídea (Epidendrum quinquepartitum Schltr.) con distintos niveles de ácido naftalenacético y diferentes sustratos*. [Tesis Licenciatura en Ingeniería Agronómica, Universidad Mayor de San Andrés]. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/4302>
- Mengarda, L. H., Cola, G. P., de Oliveira, S. C. y de Freitas, A. (2017). Multiplication, rooting *in vitro*, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae), an orchid endemic to the brazilian atlantic rainforest. *Bioscience Journal*, 33(3), 730-738.
- Merritt, D. J., Hay, F. R., Swarts, N. D., Sommerville, K. D. y Dixon, K. W. (2013). *Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, 175(1), 46-58. doi: 10.1086/673370
- Mirani, A. A., Abul-Soad, A. A. y Markhand, G. S. (2017). *In vitro* rooting of *Dendrobium nobile* Orchid: Multiple Responses to Auxin Combinations. *Notulae Scientiae Biologicae*, 9(1), 84. <https://doi.org/10.15835/nsb919894>
- Mora-Cruz, Y., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E. y Cruz-Huerta, N. (2023). Regeneración *in vitro* de plantas de *Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higging por organogénesis directa. *Revisa fitotecnia mexicana*, 46(1). <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.1.33>
- Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. (2004). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, L. Mroginski (Eds.), *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

- Muñoz, R. (2019). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal de bajo costo para la propagación *in vitro* de plantas bajo el enfoque de una tecnología apropiable. *Tekhné*, 22(2). <https://doi.org/10.62876/tekhn.v22i2.4070>
- Navez, B. (2006). *Vanilla Flower Longitudinal Section*. <https://bit.ly/3Rvevwt>
- Overvoorde, P., Fukaki, H., y Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6). doi: 10.1101/cshperspect.a001537
- Pantoja-Ambriz, J., Pedraza-Santos, M. E., López, P. A. y Apáez, P. (2016). Distribución y caracterización morfológica de genotipos silvestres de *Cuitlauzina pendula* Lex (Orchidaceae). *Interciencia*, 41(12), 819-825.
- Park, S. Y., Murthy, H. N. y Paek, K. Y. (2003). Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science*, 164(6), 919-923. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00019-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00019-0)
- Parra, M. A., Fernández-Escobar, R., Navarro, C. y Arquero, O. (2003). *Los suelos y la fertilización del olivar cultivado en zonas calcáreas*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Pence, V. C. (2010). The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bulletin*, 65(4), 539–547. <https://doi.org/10.1007/s12225-011-9245-4>
- Perea, M. y Tirado, A. (2011). *Cultivo de tejidos in vitro: manual de prácticas de laboratorio*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79882>
- Philips, R. D., Reiter, N. y Peakall, R. (2020). Orchid conservation: from theory to practice. *Annals of Botany*, 126(3), 345-362. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa093>

- Pinedo-Panduro, M., Alves-Chagas, E., Freitas, F., Panduro-Tenazoa, N. M., Cardoso-Chagas, P., Bardales-Lozano, R., Abanto-Rodríguez, C., Paredes-Dávila, E. y Collazos, H. (2022). Efecto de las sales de los medios de cultivo Murashige & Skoog y Knudson sobre el establecimiento *in vitro* de *Epidendrum schomburgkii* Lindl. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(3). https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num3_art:2526
- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A. y Espitia, A. (2003). Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Revista de Biotecnología*, 5(2), 51-56.
- Rasmussen, H. N. (1995). *Terrestrial Orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press. <http://dx.doi.org/10.1017/S0960428600004194>
- Rasmussen, H. N., y Rasmussen, F. N. (2014). Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175(3), 313-327.
- Real Academia Española [RAE]. (2024): *Epífito*. <https://dle.rae.es/epifito?m=form>
- Real Academia Española [RAE]. (2024). *Necrosis*. <https://dle.rae.es/necrosis?m=form>
- Ribeiro, L. M., Sorgato, J. C., Quintao, S. P., Schultz, J. y Souza, I. (2019). Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 14(3), 1-7. <https://doi.org/10.5039/agraria.v14i3a5957>
- Rivera, D. I. y Viquez, H. M. (2010). *Listados actualizados de las especies de fauna y flora incluidas en los apéndices de CITES distribuidas en Centroamérica y República Dominicana*. <https://bit.ly/4dxow5U>
- Sánchez, A. E. y Rodríguez, K. S. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador. *ECOVIDA*, 8(1), 64-83.

- Saravia-Castillo, G., Tapia, L. y Borjas-Ventura, R. (2022). Auxins and Cytokinins elicit a differentiated response in the formatio of shoots and roots in *Cattleya maxima* Lindl and *Phalaenopsis amabilis* (L) Blume. *Scientia Agropecuaria*, 13(1), 63-69. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.006>
- Schulz, B. J., Sieber, T. N. y Boyle, C. J. (2006). *Microbial Root Endophytes*. Springer.
- Scotland, R. W. y Wortley, A. H. (2003). How many species of seed plants are there? *Taxon*, 52(1), 101-104.
- Seaton, P. T., Hu, H., Perner, H. y Pritchard, H. W. (2010). Ex situ conservation of orchids in a warming world. *The Botanical Review*, 76, 193-203. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9048-6>
- Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Editorial de la Universidad de La Plata.
- Siddiqui, M. W. (2018). Khan, A. S. y Ali, S. (2018). Chapter 9 – Preharvest Sprays Shelf Life and Storage Potential of Frutis en Khan, A. y Ali, S. (Ed.), *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality* (pp. 209-255). Academic Press.
- Singer, R. B. (2009). Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta biológica colombiana*, 14(1) 337-348.
- Sinha, R. K. (2004). *Modern plant physiology*. Alpha Science International.
- Swarts, N. D., y Dixon, K. W. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 14(11), 590-598. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.008>

- Teixeira, J. A., Musharof, M., Sharma, M., Dobránski, J., Cardoso, J. C., Songjun, Z. (2017). Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 110-124. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>
- Thorpe, T. (2012). History of Plant Tissue Culture. *Methods in Molecular Biology*, 877, 9-27. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_2
- Thuy, L. T., Thuc, L. V., Dien, D. T., Dien, H. H., Bich, L. T. (2014). Studying the ability of mutation and selection of promising lines of *Brassia verrucosa* Lindl. by gamma irradiation in combination with *in vitro* technique. *VINATOM-AR*, 14(16), 155-160.
- Ticktin, T., Mondragón, D., Lopez-Toledo, L., Dutra-Elliott, D., Aguirre-León, E., y Hernández-Apolinar, M. (2020). Synthesis of wild orchid trade and demography provides new insight on conservation strategies. *Conservation Letters*, 13(2). <https://doi.org/10.1111/conl.12697>
- Tiza, G. (2010). *Propagación in vitro de las orquídeas Dendrobium, Laelia anceps, Phalaenopsis y Sobralia xantholeuca*. [Tesis de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana]. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/677572>
- Universidad Autónoma de Chapingo (2001). *Serie ciencias forestales y del ambiente*. Revista Chapingo.
- Universidad Pública de Navarra [UPNA]. (s.f.). *Morfología de las plántulas*. <https://bit.ly/45tuHWG>
- Vasco, C. A. (2020). *Evaluación del enraizamiento in vitro y aclimatación de plántulas de la orquídea Epidendrum ibaguense*. [Tesis de Tecnología en Gestión y Producción Hortícola, Universidad Militar Nueva Granada]. <https://bit.ly/3VioHd3>

- Vásquez, M. A., Morales, F. J., Rodríguez, P. J. (2021). *Germinación y crecimiento in vitro de especies de orquídeas amenazadas en comunidades aledañas al Biotopo del Quetzal*. <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puirna/INF-2020-76.pdf>
- Velita, N. A. y Vilcapoma, K. (2010). *Estudio de la diversidad y morfología de la familia Orchidaceae en el Pajonal de Chontabamba – Oxapampa*. [Tesis de Ingeniería Forestal y Ambiental, Universidad Nacional del Centro del Perú]. <https://bit.ly/4mT2Mos>
- Véliz, M. E. (2008). Diversidad florística de Guatemala. En C. Azurdia, F. García, M. Ríos (Eds.), *Guatemala y su Biodiversidad: un enfoque histórico, cultural, biológico y económico*. Serviprensa.
- Wood, S. N. (2011) Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society (B)*, 73(1):3-36
- World Flora Online [WFO] (2023). *Brassia verrucosa* Bateman ex Lindl. <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000406871>
- World Flora Online [WFO] (2023). *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.R. Higgins. <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000431334>
- World Flora Online [WFO] (2023). *Lycaste cochleata* Lindl. <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000231226>
- World Flora Online [WFO] (2023). *Sobralia macrantha* Lindl. <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000311526>
- Yalapuspita, D. C., Handini, E., Aprilianti, P., Isnaini, Y., y Semiarti, E. (2024). Improvement of Growth Rate in *In Vitro* Culture of *Paphiopedilum primulinum* M. W. Wood & P. Taylor and *Paphiopedilum glaucophyllum* J. J. Smith using Banana

Enrichment Media. *Tropical Life Sciences Research*, 35(3), 109-120. doi: 10.21315/tlsr2024.35.3.5

Yam, T. W., y Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3, 1-56. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0066-3>

Yeung, E. C., Li, Y. Y., Lee, Y. I. (2018). Understanding Seed and Protocorm Development in Orchids. En Y. I. Lee y E. T. Yeung (Eds.), *Orchid Propagation: from Laboratories to Greenhouses – Methods and Protocols* (pp. 3-26). Springer Protocols Handbooks.

Yuan, S. C., Lekawatana, S., Amore, T. D., Chen, F. C., Chin, S. W., Monge, D. y Wang, Y. T. (2021). The global orchid market. En F. C. Chen y S. W. Chin (Eds.), *The Orchid Genome: compendium of plant genomes* (pp. 1-28). Springer.

Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W. y Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, 40(4), 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>.

Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61(1), 49-64.

VIII. Apéndices

A. Registro fotográfico del proceso de cultivo y medición

Figura 15. Medición y transferencia de plántulas bajo condiciones estériles.



Figura 16. Método empleado para medición de raíces con regla y caja Petri de vidrio.



Figura 17. Método de rotulación y siembra de tres plántulas en cada frasco.



Figura 18. Vista general de los 210 frascos experimentales en el área de crecimiento.



B. Registros de temperatura y humedad relativa en el área de crecimiento

Figura 19. Promedio diario de temperatura y humedad relativa para *Lycaste cochleata*.

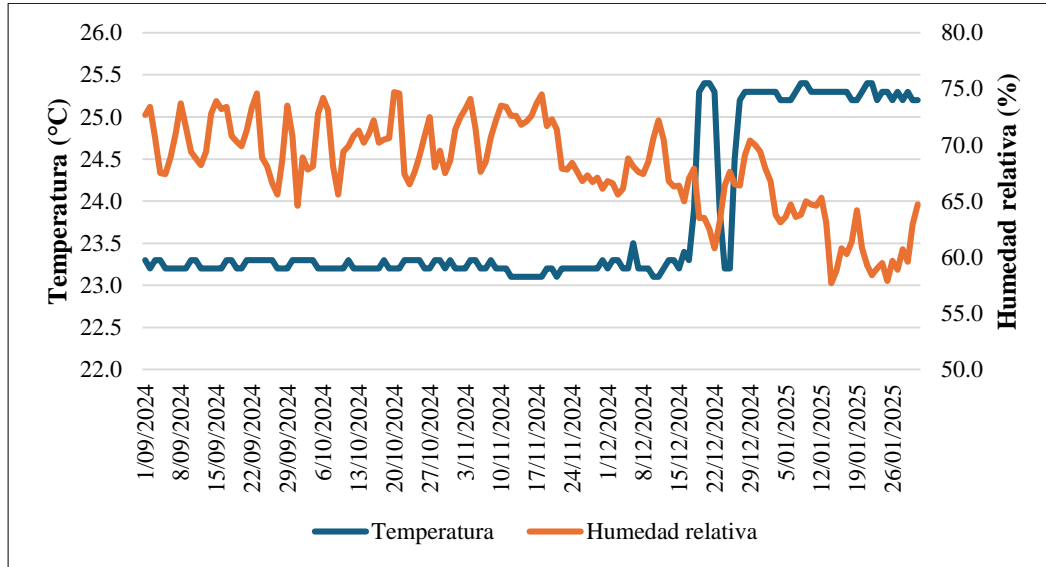
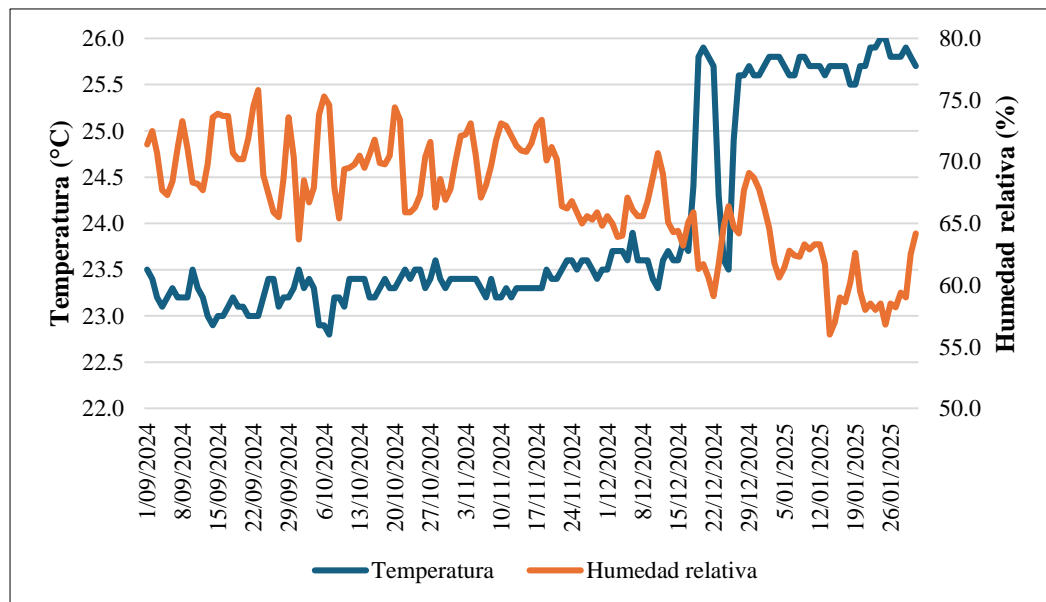


Figura 20. Promedio diario de temperatura y humedad relativa para *Sobralia macrantha*.



Recomendaciones técnicas relacionadas. En la Figura B1 y la Figura B2, se observa el promedio diario de temperatura y humedad relativa registrados en el área donde se

encontraban las plántulas de cada especie. Por medio del uso de *dataloggers*, se observó una diferencia de aproximadamente 1 °C entre la temperatura real registrada por estos dispositivos y la que se muestra en el panel de control del aire acondicionado. Por ejemplo, al establecer la temperatura a 22 °C en el panel de control, los *dataloggers* registraron 23 °C en promedio para ambas especies. Esto puede deberse a la distribución no homogénea del aire en el cuarto de crecimiento. Se recomienda considerar este factor al momento de ajustar la temperatura del aire acondicionado de forma que esté a 1 °C menos de la deseada para compensar la diferencia en el área donde se encuentran las plántulas, especialmente las de áreas más alejadas.

C. Selección y validación de modelos para longitud promedio y enraizamiento

Cuadro 6. Resultados de la selección de modelos candidatos para cada variable de respuesta.

Modelos candidatos	R ²	RMSE	Peso AICc
a) Longitud promedio de raíces			
Longitud promedio = Mes de medición + Especie×Tratamiento + Frasco + Muestra	0.491	0.391	0.999
Longitud promedio = Mes de medición + Especie + Tratamiento + Frasco + Muestra	0.491	0.390	0.001
Longitud promedio = Especie + Tratamiento + Frasco + Muestra	0.385	0.434	< 0.001
b) Enraizamiento			
Enraizamiento = Mes de medición + Especie + Tratamiento + Frasco + Muestra	0.887	0.103	0.999
Enraizamiento = Mes de medición + Especie×Tratamiento + Frasco + Muestra	0.887	0.103	0.001

Nota. Se muestra la proporción de variabilidad explicada (R^2), el error cuadrático medio (RMSE) y el peso del Criterio de Información de Akaike (AICc) de cada modelo

Cuadro 7. Resumen del modelo seleccionado para cada variable de respuesta.

Modelo seleccionado	Total de observaciones	R^2	Desviación explicada
a) Longitud promedio de raíces			
Longitud promedio ~ Mes de medición + Especie×Tratamiento + Frasco + Muestra	3150	0.49	52.6%
b) Enraizamiento			
Enraizamiento ~ Especie + Tratamiento + Mes de medición + Frasco + Muestra	3150	0.89	86.8%

Nota. R^2 corresponde a la variabilidad explicada.

Figura 21. Análisis de residuos DHARMA del modelo seleccionado para longitud promedio de raíces.

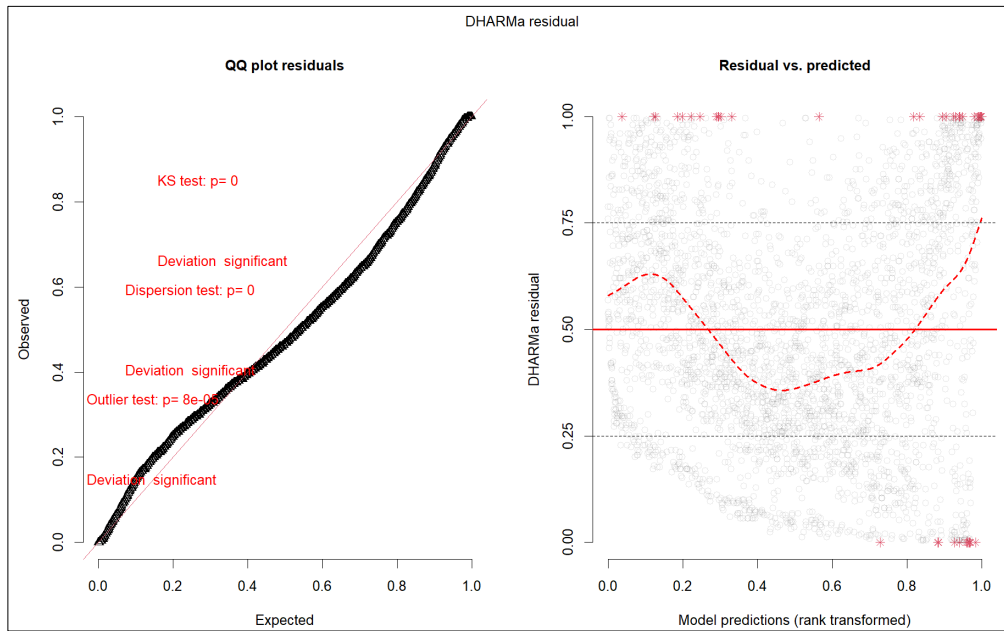


Figura 22. Análisis de residuos DHARMA del modelo seleccionado para enraizamiento.

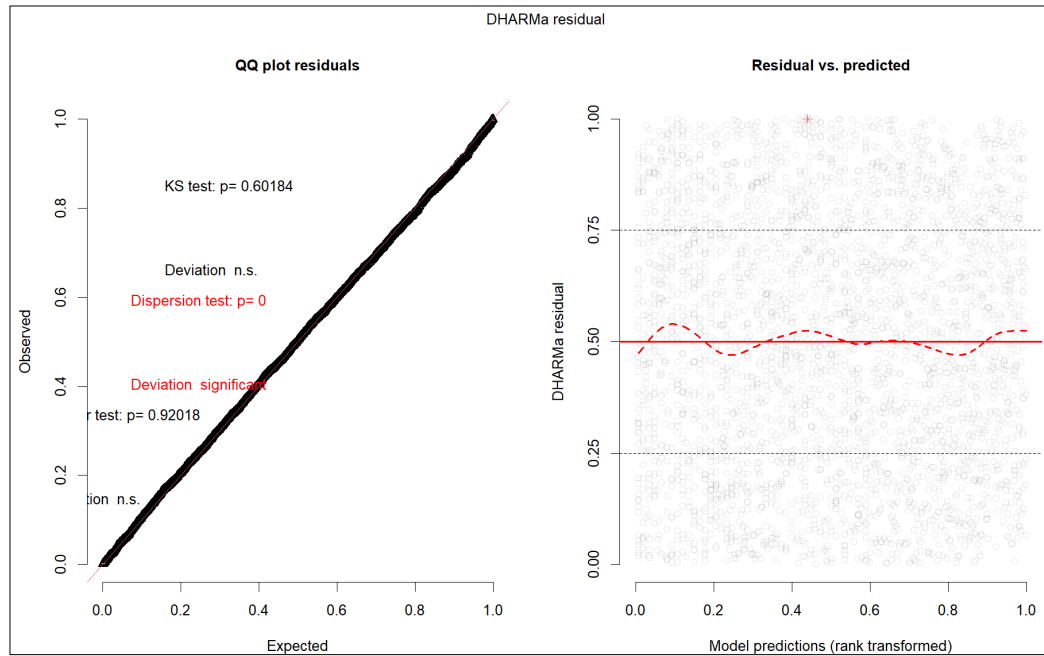
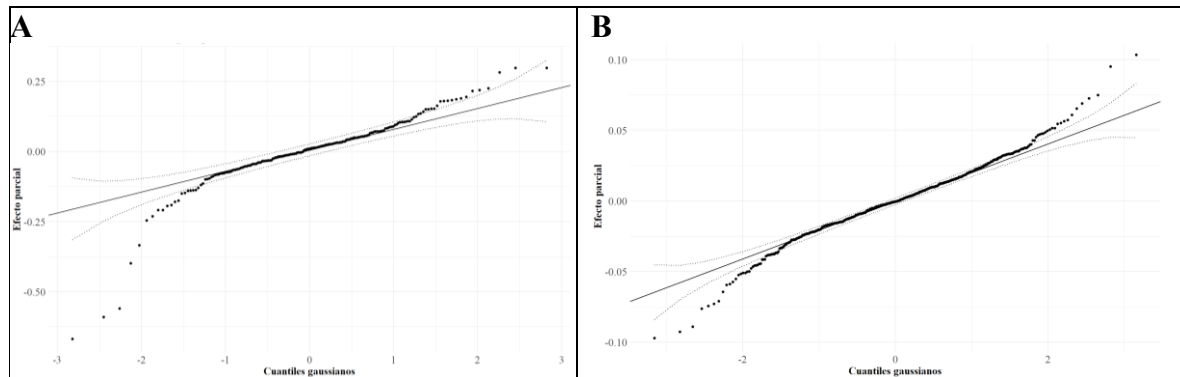
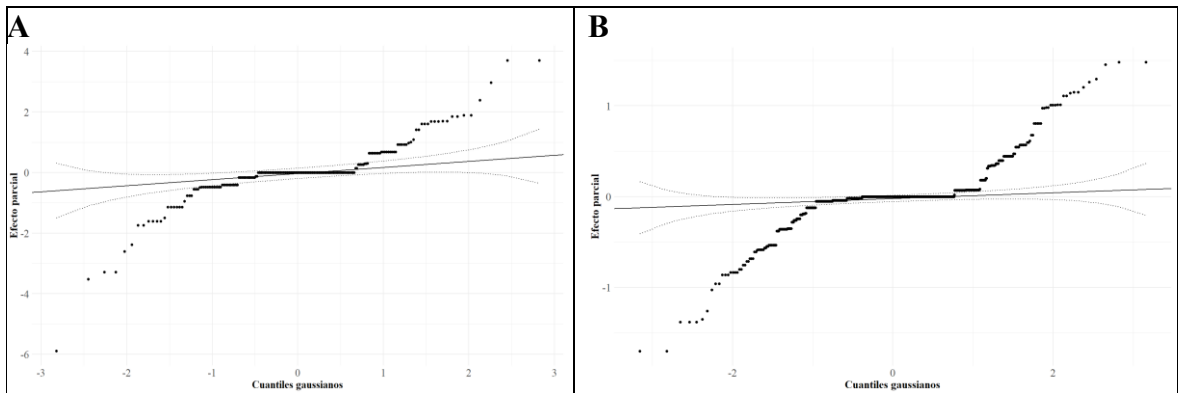


Figura 23. Efecto parcial de las variables aleatorias sobre la longitud promedio de raíces.



Nota. (A) Efecto del frasco; (B) efecto de la muestra

Figura 24. Efecto parcial de las variables aleatorias sobre el enraizamiento.



Nota. (A) Efecto del frasco y (B) efecto de la muestra

Cuadro 8. Evaluación del índice k de los términos suavizados en ambos modelos.

	k'	edf	Índice k	Valor-p
a) Longitud promedio de raíces				
s(Mes de medición)	4.00	3.44	0.52	<0.001
b) Enraizamiento				
s(Mes de medición)	4.00	3.67	0.91	<0.001

Nota. Se presenta el valor de k utilizado (k'), los grados de libertad efectivos estimados (edf), el índice k y el valor-p asociado.

Figura 25. Efecto parcial del tiempo sobre la longitud promedio de raíces.

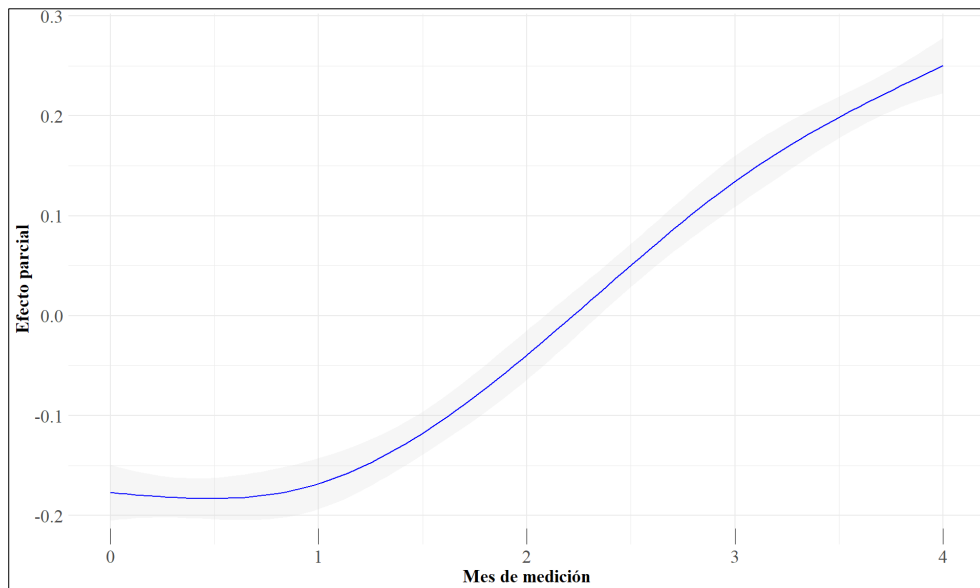
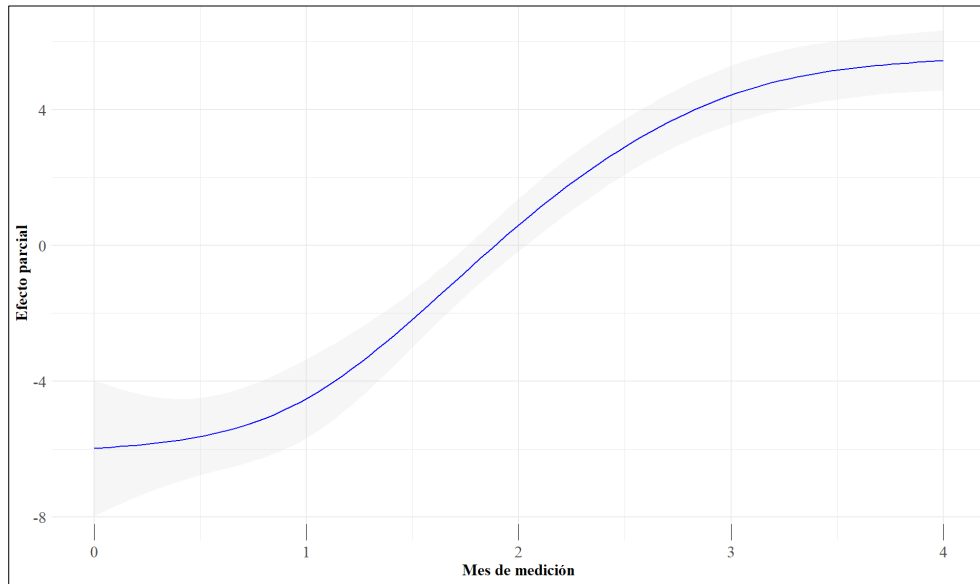


Figura 26. Efecto parcial del tiempo sobre el enraizamiento



D. Prueba Chi-cuadrado para porcentajes finales de enraizamiento

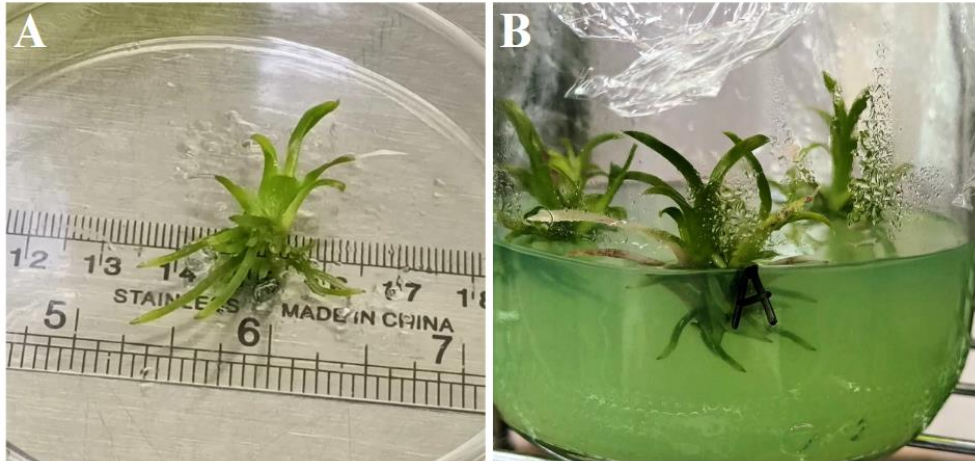
Cuadro 9. Resultado de la prueba estadística Chi-cuadrado entre porcentajes de enraizamiento final de *Lycaste cochleata*

χ^2	df	Valor-p
142.38	6	<0.001

Nota. Se muestra el valor de Chi-cuadrado (χ^2), los grados de libertad (df) y el valor-p obtenido.

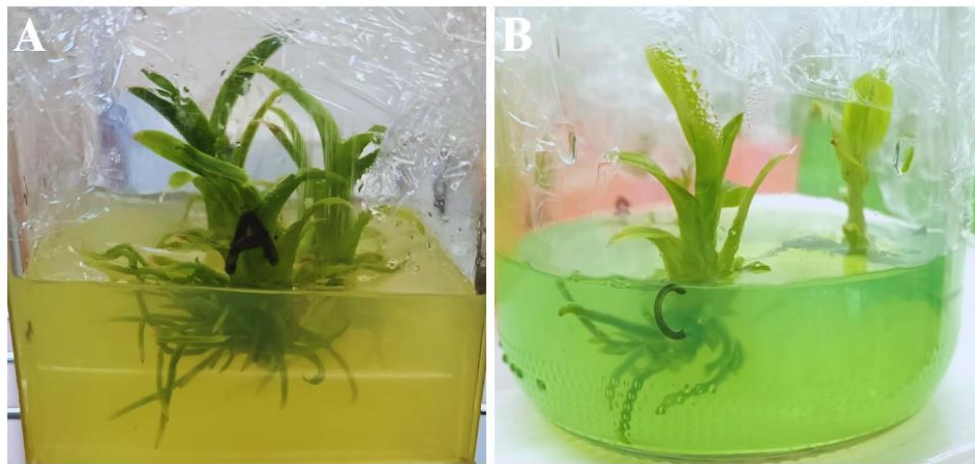
E. Evidencia fotográfica del crecimiento radicular de *Lycaste cochleata*

Figura 27. Ejemplos de plántulas de *L. cochleata* con raíces en el primer mes.



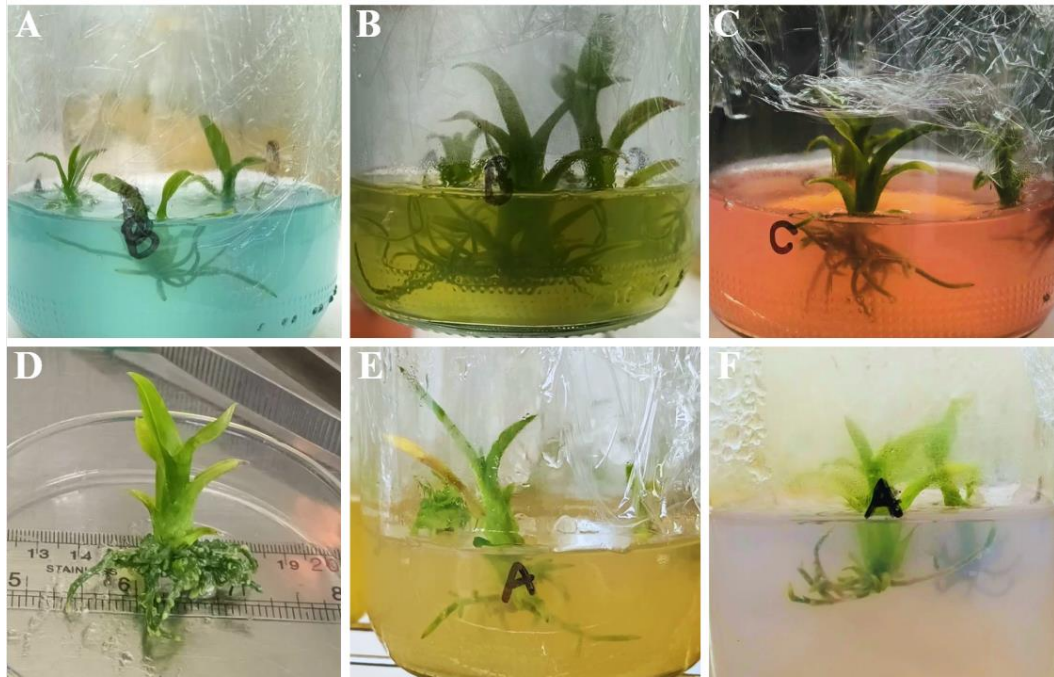
Nota. (A) Plántula 306_T3F12A en ANA 0.4 mg/L; (B) Plántula 306_T5F4A en AIB 0.2 mg/L

Figura 28. Ejemplos de plántulas de *L. cochleata* con raíces en el segundo mes.



Nota. (A) Plántula 306_T3F13A en ANA 0.4 mg/L; (B) Plántula 306_T5F6C en AIB 0.2 mg/L

Figura 29. Ejemplos de plántulas de *L. cochleata* con raíces en el tercer mes.



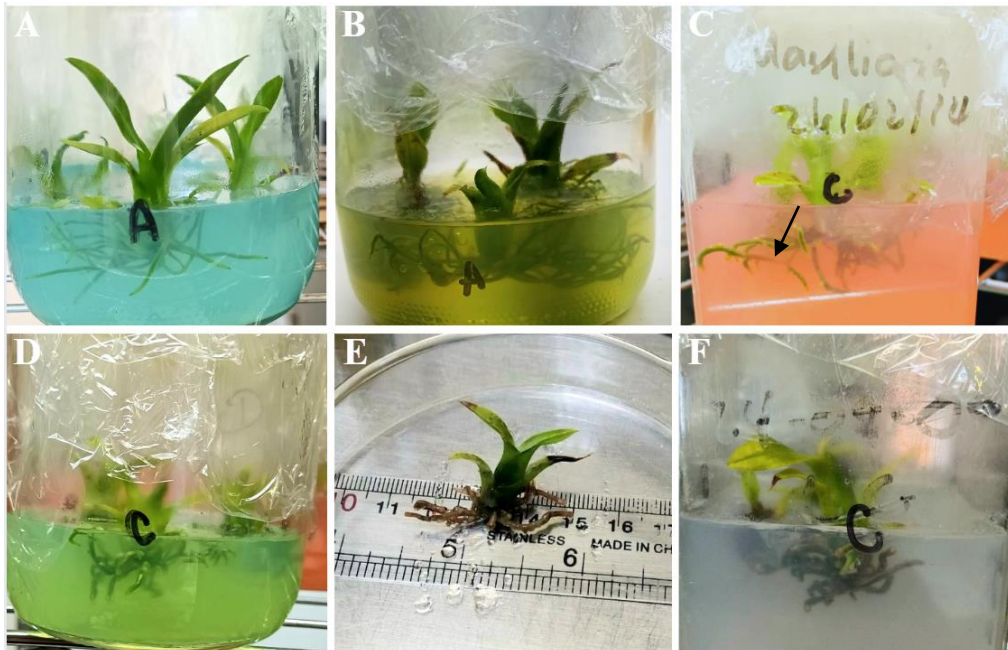
Nota. (A) Plántula 306_T2F13B en ANA 0.2 mg/L; (B) Plántula 306_T3F13B en ANA 0.4 mg/L; (C) Plántula 306_T4F2C en ANA 0.6 mg/L; (D) Plántula 306_T5F2B en AIB 0.2 mg/L; (E) Plántula 306_T6F15A en AIB 0.4 mg/L; (F) Plántula 306_T7F5 en AIB 0.6 mg/L

Figura 30. Ejemplo del crecimiento radicular de *L. cochleata* en el tratamiento control después de cuatro meses.



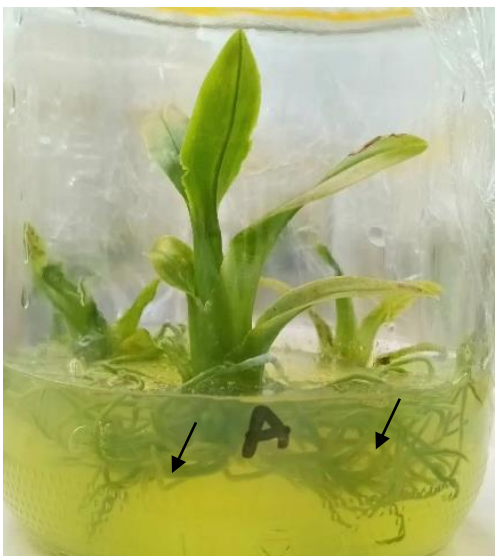
Nota. Plántula 306_T1F3B en $\frac{1}{2}$ medio MS sin hormonas

Figura 31. Ejemplos de plántulas de *L. cochleata* con raíces en el cuarto mes.



Nota. (A) Plántula 306_T2F15A en ANA 0.2 mg/L; (B) Plántula 306_T3F13A en ANA 0.4 mg/L; (C) Plántula 306_T4F6C en ANA 0.6 mg/L con debilitamiento de raíces; (D) Plántula 306_T5F1C en AIB 0.2 mg/L; (E) Plántula 306_T6F4A en AIB 0.4 mg/L con raíces necrosadas; (F) Plántula 306_T7F14C en AIB 0.6 mg/L con raíces necrosadas

Figura 32. Crecimiento de hojas e inicio de debilitamiento de raíces en ANA 0.4 mg/L después de cuatro meses.

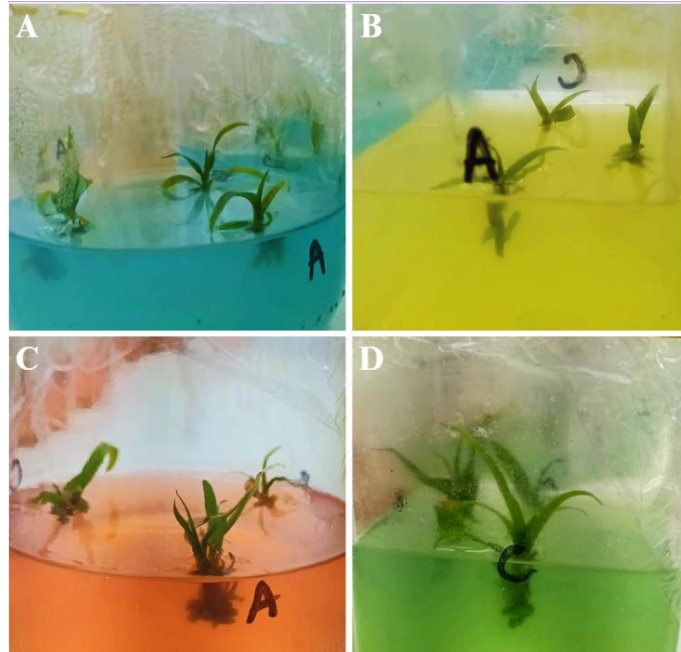


F. Evidencia fotográfica del crecimiento radicular de *Sobralia macrantha*

Figura 33. Crecimiento de raíces en *S. macrantha* después de un mes en AIB 0.2 mg/L.

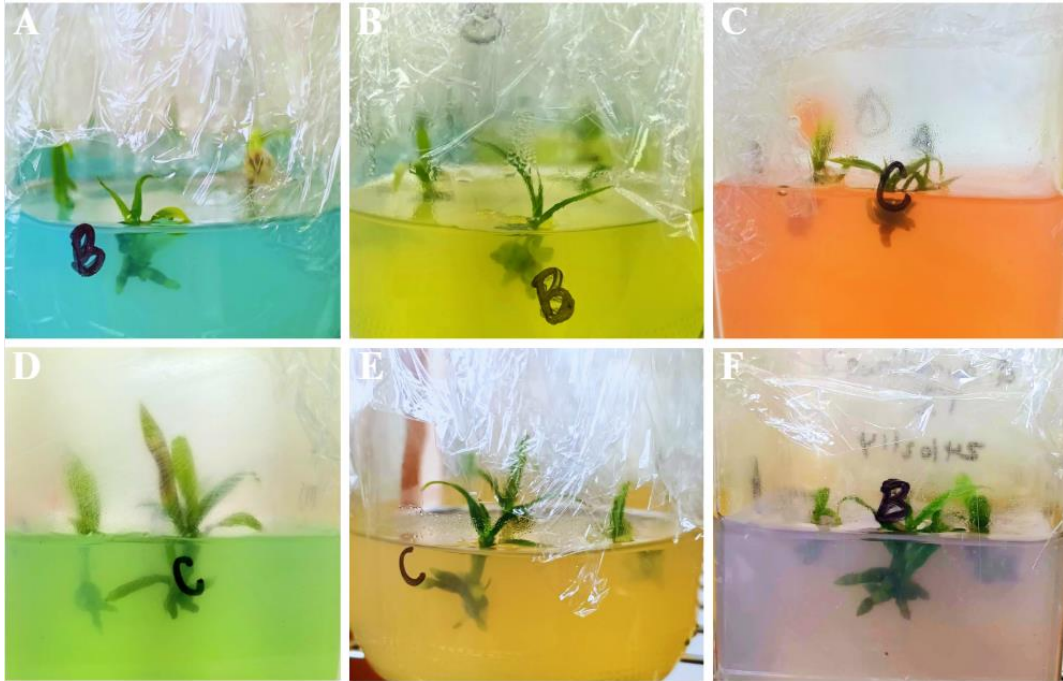


Figura 34. Ejemplos de plántulas de *S. macrantha* con crecimiento radicular en el segundo mes.



Nota. (A) Plántulas del frasco 147_T2F8 con ANA 0.2 mg/L; (B) Plántula 147_T3F6A en ANA 0.4 mg/L; (C) Plántula 147_T4F15A en ANA 0.6 mg/L; (D) Plántula 147_T5F9C en AIB 0.2 mg/L

Figura 35. Ejemplos de plántulas de *S. macrantha* con raíces en el tercer mes.



Nota. (A) Plántula 147_T2F14B con ANA 0.2 mg/L; (B) Plántula 147_T3F2B en ANA 0.4 mg/L; (C) Plántula 147_T4F6C en ANA 0.6 mg/L; (D) Plántula 147_T5F4C en AIB 0.2 mg/L; (E) Plántula 147_T6F12C en AIB 0.4 mg/L; (F) Plántula 147_T7F11B en AIB 0.6 mg/L

Figura 36. Ejemplo del crecimiento radicular de *S. macrantha* en el tratamiento control después de cuatro meses.

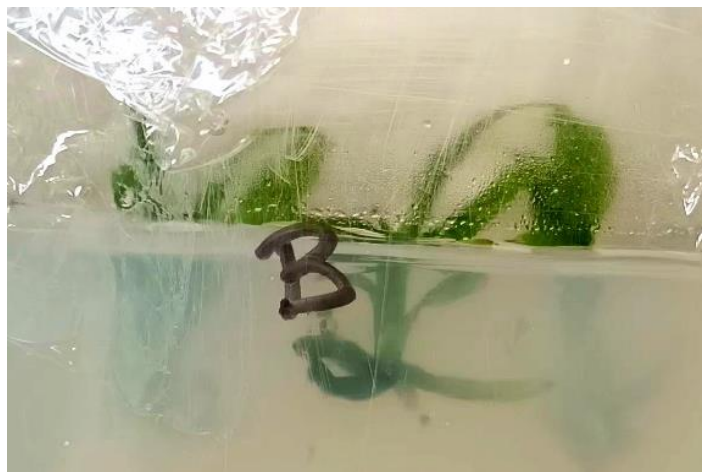
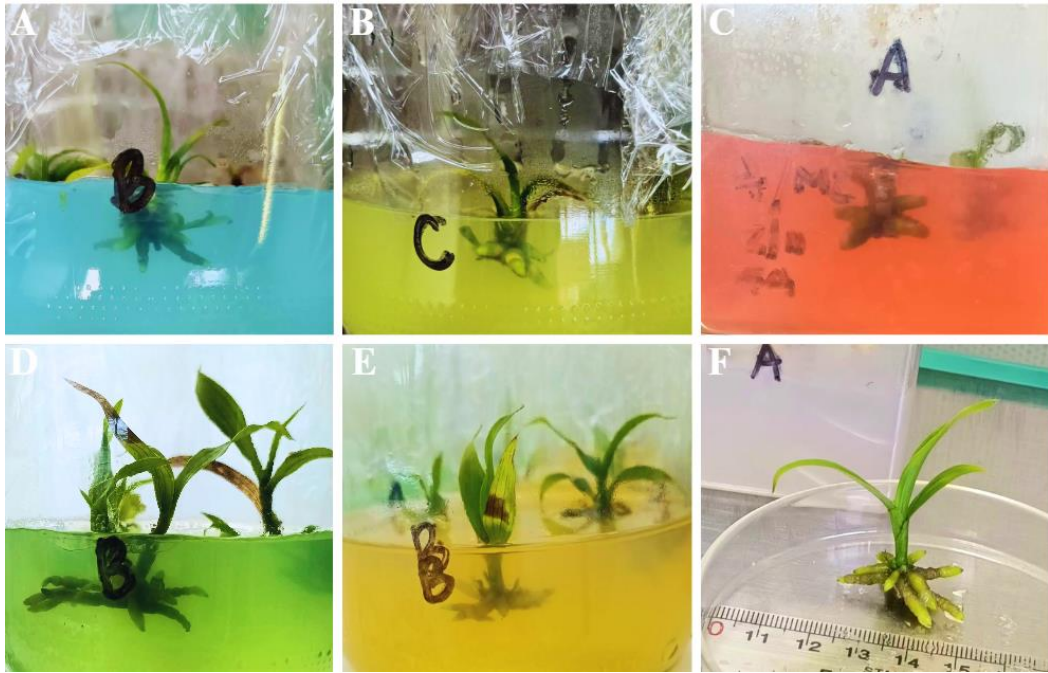
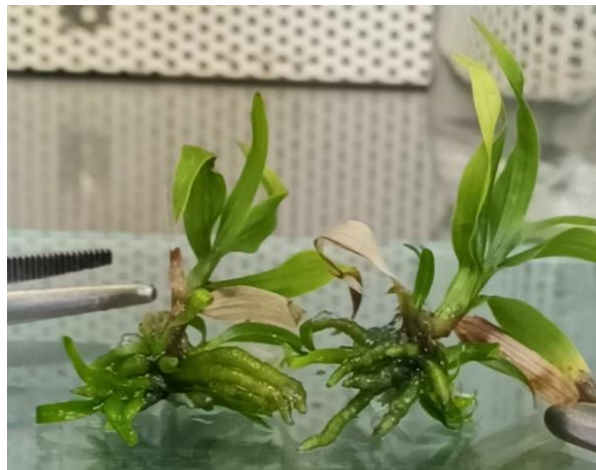


Figura 37. Ejemplos de plántulas de *S. macrantha* con raíces en el cuarto mes.



Nota. (A) Plántula 147_T2F14B con ANA 0.2 mg/L; (B) Plántula 147_T3F13C en ANA 0.4 mg/L; (C) Plántula 147_T4F1A en ANA 0.6 mg/L; (D) Plántula 147_T5F9B en AIB 0.2 mg/L; (E) Plántula 147_T6F12B en AIB 0.4 mg/L; (F) Plántula 147_T7F10B en AIB 0.6 mg/L

Figura 38. Plántulas de *S. macrantha* del tratamiento con AIB 0.2 mg/L dos meses después de haber terminado el estudio.



IX. Glosario

- **Ácido indolbutírico:** es una hormona vegetal sintética del grupo de las auxinas que estimula el enraizamiento y el crecimiento de raíces laterales en plantas (Báez-Pérez *et al.*, 2015).
- **Ácido naftalenacético:** es una hormona vegetal sintética del grupo de las auxinas utilizada principalmente para la propagación vegetativa y la inducción de raíces (Siddiqui, 2018).
- **Epífita:** que vive sobre otra planta, pero que no la parasita nutricionalmente, sino que solo la usa como soporte (Real Academia Española [RAE], 2024).
- **Explante vegetal:** cualquier tejido meristemático extraído de una planta madre que sirve como material de partida para iniciar cultivos *in vitro* (Berjak y Pammenter, 2017).
- **Fitotoxicidad:** cuando un elemento químico supera en las plantas un determinado umbral de concentración o tiempo de exposición generando daños o alteraciones fisiológicas (Parra *et al.*, 2003).
- **Litófita:** una planta que crece en la superficie de rocas o cantos rodados (Lowman y Rinker, 2004).
- **Necrosis:** degeneración de un tejido por muerte de sus células (Real Academia Española, 2024).

- **Plántula:** planta joven, en sus primeros estadios de desarrollo (Universidad Pública de Navarra [UPNA], s.f.).
- **Vial:** recipiente de vidrio que contiene plántulas cultivadas en medio nutritivo.