



**“Evaluación de la dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en explantes de orquídeas silvestres”**

Ponce Flores, Marcelo Gabriel

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ulloa Cortázar, Santiago Miguel PhD.

Agosto 24, 2023

## Reporte de Verificación de Contenido



Tesis Copyleaks.pdf

### Scan details

Scan time:  
August 24th, 2023 at 12:10 UTC

Total Pages:  
49

Total Words:  
12233

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	0.4%	51
● Minor Changes	0%	3
● Paraphrased	0.3%	39
● Omitted Words	0%	0

### AI Content Detection



Text coverage  
● AI text  
○ Human text

### 🔍 Plagiarism Results: (6)

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
SANTIAGO MIGUEL  
ULLOA CORTAZAR

PhD. Santiago Miguel Ulloa Cortázar

C.C.: 1710450584

Director del Proyecto de Investigación



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular **“Evaluación de la dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en explantes de orquídeas silvestres”** fue realizado por el señor estudiante **Ponce Flores, Marcelo Gabriel**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2023**



Firmado electrónicamente por:  
**SANTIAGO MIGUEL  
ULLOA CORTAZAR**

Firma:

**PhD. Ulloa Cortázar, Santiago Miguel**

C.C.: 1710450584

**Director del Proyecto de Investigación**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Ponce Flores, Marcelo Gabriel**, con cédula de ciudadanía N° **1750218792**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular “**Evaluación de la dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en explantes de orquídeas silvestres**” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2023**

Firma:

**Ponce Flores, Marcelo Gabriel**

C.C.: 1750218792

**Estudiante**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de publicación**

Yo, **Ponce Flores, Marcelo Gabriel**, con cédula de ciudadanía N° **1750218792**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular “**Evaluación de la dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en explantes de orquídeas silvestres**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2023**



Firma:

**Ponce Flores, Marcelo Gabriel**

C.C.: 1750218792

**Estudiante**

## **Dedicatoria**

Con gratitud y dedicación, presento este trabajo de investigación como un testimonio de perseverancia y crecimiento. A todos mis amigos, por acompañarme durante tantos momentos. A mis profesores y mentores, cuya sabiduría y guía han enriquecido mi comprensión. Que este logro sea un reflejo de la importancia del esfuerzo constante y la búsqueda del conocimiento. A todos los que creyeron en mí, va dedicado este trabajo.

## **Agradecimientos**

En este momento de culminación y logro, quiero expresar mi sincero agradecimiento a todos aquellos que han sido parte fundamental en este viaje académico. A mis amigos, por ser mi fuente de inspiración y alegría, y por comprender las ausencias que este camino impuso.

Agradezco a mis profesores y asesores, cuya dedicación y orientación han moldeado mi pensamiento crítico y ampliado mis horizontes. Sus enseñanzas perdurarán más allá de estas páginas.

A todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a este proyecto, les extiendo mi reconocimiento. Cada conversación, cada consejo, cada gesto de aliento ha dejado una huella imborrable en este trabajo.

Que este agradecimiento refleje mi profunda gratitud hacia aquellos que iluminaron mi camino hacia el logro de este objetivo. Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible

## Índice de Contenido

Carátula.....	1
Reporte de Verificación de Contenido.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Contenido .....	8
Índice de Figuras.....	12
Índice de Tablas .....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I.....	16
Introducción .....	16
Objetivos.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos .....	18
Hipótesis.....	18
Hipótesis nula .....	18

	9
Hipótesis alternativa.....	18
Capitulo II .....	19
Antecedentes.....	19
Las orquídeas.....	20
Orígenes .....	20
Información Botánica .....	21
Cultivo de orquídeas .....	24
Cultivo de Tejidos Vegetales.....	28
Desarrollo del Cultivo In vitro .....	29
Cultivo in vitro de orquídeas .....	31
Reguladores de Crecimiento .....	33
Auxinas .....	34
Citoquininas .....	36
Otras Hormonas.....	39
Capítulo III.....	42
Ubicación del Área de Investigación .....	42
Ubicación Política .....	42
Ubicación Ecológica.....	42
Ubicación Geográfica.....	42
Materiales .....	44
Equipos .....	44

	10
Materiales e Insumos .....	44
Reactivos .....	45
Análisis estadístico .....	45
Variables .....	45
Niveles y Factores de la Investigación.....	46
Interacción de Tratamientos.....	47
Tipo de diseño.....	48
Tabla de Análisis de Varianza .....	48
Análisis Funcional .....	48
Métodos.....	48
Obtención de las Semillas .....	48
Preparación de Medio de Cultivo Para Germinación .....	49
Desinfección de Semillas de Orquídea.....	49
Introducción de Semillas de Orquídea.....	50
Preparación de Medios de Cultivo con Hormonas.....	51
Selección de Explantes.....	52
Trasplante de Orquídeas .....	52
Toma de Datos.....	53
Tratamiento de datos .....	53
Capítulo VI .....	54
Crecimiento de explantes .....	54

	11
Numero de raíces .....	56
Longitud de raíces .....	57
Número de brotes .....	59
Longitud de brotes .....	61
Longitud de la planta .....	63
Generación de callos .....	65
Capítulo V .....	66
Número y Longitud de Raíces .....	66
Número y Longitud de Brotes .....	67
Longitud de la Planta .....	68
Formación de Callos .....	69
Capítulo VI .....	70
Conclusiones .....	70
Recomendaciones .....	72
Bibliografía .....	74

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Crecimiento monopodial y simpodial del tallo .....	21
<b>Figura 2.</b> Simetría de las flores. ....	22
<b>Figura 3.</b> Esquema de flor del género <i>Ophrys</i> . ....	23
<b>Figura 4.</b> Semillas de orquídea. ....	24
<b>Figura 5.</b> Semillas de orquídeas en medio <i>in vitro</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Biosíntesis del AIA a partir del triptófano.....	35
<b>Figura 7.</b> Citoquininas naturales y sintéticas. ....	38
<b>Figura 8.</b> Mapa de ubicación geográfica del área de investigación.....	43
<b>Figura 9.</b> Explantes seleccionados y utilizados en el proyecto. ....	53
<b>Figura 10.</b> Explantes a las 4 semanas de tratamiento con BAP .....	54
<b>Figura 11.</b> Explantes a las 4 semanas de tratamiento con Kinetina.....	54
<b>Figura 12.</b> Explantes a las 4 semanas de tratamiento con AIA, .....	55
<b>Figura 13.</b> Explantes a las 4 semanas de tratamiento con ANA .....	55
<b>Figura 14.</b> Número de raíces vs Concentración de hormonas. ....	56
<b>Figura 15.</b> Número de raíces vs hormonas. ....	57
<b>Figura 16.</b> Longitud de raíces vs Concentración de hormonas.....	58
<b>Figura 17.</b> Longitud de raíces vs Hormonas. ....	59
<b>Figura 18.</b> Número de brotes vs Interacción. ....	60
<b>Figura 19.</b> Número de brotes vs Hormonas. ....	61
<b>Figura 20.</b> Longitud de brotes vs Concentración de hormonas.....	62
<b>Figura 21.</b> Longitud de brotes vs Hormonas. ....	62
<b>Figura 22.</b> Longitud de la planta vs Concentración de hormonas. ....	64
<b>Figura 23.</b> Longitud de la planta vs Hormonas.....	64
<b>Figura 24.</b> Suma total de callos por hormona.....	65

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Factores y niveles de la investigación.....	46
<b>Tabla 2.</b> Interacción de tratamientos.....	47
<b>Tabla 3.</b> Datos del análisis de varianza. ....	48
<b>Tabla 4.</b> Composición medio de cultivo por litro, para germinación de semillas de orquídea.....	49
<b>Tabla 5.</b> Composición medios de cultivo por litro, para evaluación de hormonas. ....	51
<b>Tabla 6.</b> ANOVA Número de raíces. ....	56
<b>Tabla 7.</b> ANOVA Longitud de Raíces. ....	58
<b>Tabla 8.</b> ANOVA Número de Brotes.....	59
<b>Tabla 9.</b> ANOVA Longitud de Brotes.....	61
<b>Tabla 10.</b> ANOVA Longitud de la planta.....	63

## Resumen

Las orquídeas son una familia de plantas únicas, con más de 28 000 especies distribuidas por todo el mundo, su belleza se ratifica en su estructura floral muy diversa, siendo así de importancia ornamental desde antaño. Su cultivo y cuidados son complejos, lo que eleva su valor aún más, aun así, la limitación de su propagación es un tema importante para la industria, ya que las semillas de estas plantas necesitan condiciones específicas simbióticas o nutricionales para desarrollarse, lo que promueve su cultivo bajo condiciones *in vitro*. En esta instancia, ventajas como el control de factores externos e internos permiten un crecimiento adecuado, además del uso de fitohormonas, como auxinas o citoquininas. Bajo dichas premisas, el presente trabajo busca evaluar dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en orquídeas silvestres, a fin de optimizar el desarrollo de los explantes en etapa de multiplicación. Tomando como muestras cápsulas de semillas del género *Lycaste*, *Catasetum* y *Oncidium*, se formuló un medio de germinación, para su desarrollo por 4 meses previo al trasplante a medios de cultivo con las hormonas mencionadas a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 ppm. Al cabo de 4 semanas, se tomaron mediciones de número y longitud de raíces y de brotes, longitud general de la planta y presencia de callos. Siendo así que, el BAP a 1.5 ppm mostró buena formación de brotes y elongación de la planta, considerándose así ideal para el crecimiento y desarrollo de explantes. La Kinetina, por su parte, a 2ppm tuvo la mejor formación de callos, que podría aplicarse a la obtención de suspensiones celulares. El AIA a 1.5 ppm mostró iniciación y desarrollo radicular, además de la formación de callos, y a 2 ppm la formación de brotes, indicando su buena aplicación para diferenciación celular en fase de multiplicación. Finalmente, el ANA a 1 ppm tuvo gran formación de raíces, y a 2 ppm sirvió para la elongación de estas, siendo así definida como apta para enraizamiento de explantes. Denotando, que todas las hormonas tienen su función, y su aplicación dependerá del objetivo del cultivo.

*Palabras Clave:* Orquídeas, *In vitro*, fitohormonas, concentración, desarrollo.

### Abstract

Orchids are a family of unique plants, with more than 28,000 species distributed throughout the world, their beauty is ratified in their highly diverse floral structure, thus being of ornamental importance since ancient times. Its cultivation and care are complex, which increases its value even more, even so, the limitation of its propagation is an important issue for the industry, since the seeds of these plants need specific symbiotic or nutritional conditions to develop, which promotes culture under *in vitro* conditions. In this instance, advantages such as the control of external and internal factors allow adequate growth, in addition to the use of phytohormones, such as auxins or cytokinins. Under these premises, the present work seeks to evaluate doses of BAP, Kinetin, AIA and ANA in wild orchids, in order to optimize the development of explants in the multiplication stage. Taking seed capsules of the genus *Lycaste*, *Catasetum* and *Oncidium* as samples, a germination medium was formulated, for its development for 4 months prior to transplanting to culture media with the mentioned hormones at concentrations of 0, 0.5, 1, 1.5 and 2. ppm. After 4 weeks, measurements of number and length of roots and shoots, general length of the plant and presence of calluses were taken. Thus, the BAP at 1.5 ppm showed good shoot formation and plant elongation, thus being considered ideal for the growth and development of explants. Kinetin, for its part, at 2ppm had the best callus formation, which could be applied to obtaining cell suspensions. The AIA at 1.5 ppm showed root initiation and development, in addition to the formation of calluses, and at 2 ppm the formation of shoots, indicating its good application for cell differentiation in the multiplication phase. Finally, ANA at 1 ppm had great root formation, and at 2 ppm it served to elongate them, thus being defined as suitable for explant rooting. Denoting that all hormones have their function, and their application will depend on the objective of the crop.

*Key Words:* Orchids, *In vitro*, phytohormones, concentration, growth.

## Capítulo I

### Introducción

En el campo de la biotecnología vegetal, la propagación *in vitro* se ha erigido como una herramienta fundamental para abordar los desafíos asociados con la preservación y propagación de especies vegetales de interés. Entre estas especies, las orquídeas, miembros notables de la familia *Orchidaceae*, han intrigado a científicos, horticultores y entusiastas por su diversidad y complejidad. Sin embargo, la aplicación exitosa de técnicas de propagación *in vitro* en orquídeas sigue siendo un área de investigación en evolución constante.

La optimización de las hormonas vegetales en los medios de cultivo desempeña un papel crítico en la propagación *in vitro*, al influir en el crecimiento, la multiplicación y el desarrollo de los explantes. Entre estas hormonas, el 6-bencilaminopurina (BAP) y la kinetina han demostrado ser elementos clave para inducir la proliferación celular y el desarrollo de brotes en diversos sistemas de cultivo. Además, las auxinas como el ácido indolacético (AIA) y el ácido naftalenoacético (ANA) son esenciales para promover la formación de raíces y la generación de nuevas plantas.

Aunque existen investigaciones previas en el ámbito de la propagación *in vitro* de orquídeas, aún subsisten cuestionamientos en relación con las concentraciones hormonales óptimas. La variabilidad en los resultados obtenidos ha destacado la necesidad de una evaluación precisa y sistemática de las dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en explantes de orquídeas silvestres. La búsqueda de dosis ideales, específicas para cada etapa de desarrollo y especie de orquídea, se ha convertido en un objetivo clave para mejorar la eficiencia de la propagación *in vitro* y, por ende, la conservación de estas especies icónicas.

Esta tesis plantea la evaluación de 5 concentraciones de BAP, Kinetina, AIA y ANA para establecer patrones claros entre las concentraciones de las hormonas mencionadas y las

respuestas fisiológicas de los explantes de orquídeas silvestres, a través de un enfoque riguroso de experimentación y análisis. Los resultados obtenidos no solo prometen enriquecer nuestro entendimiento de las interacciones hormonales en orquídeas, sino que también tienen el potencial de revolucionar las prácticas de propagación *in vitro* en esta familia botánica.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Evaluar dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en explantes de orquídeas silvestres

### ***Objetivos específicos***

- Establecer protocolos para desinfección, introducción y preparación de medios.
- Optimizar las dosis de reguladores de crecimiento en los explantes en la etapa de multiplicación
- Contrastar el desarrollo morfológico y fisiológico de los explantes de orquídeas.

## **Hipótesis**

### ***Hipótesis nula***

H0: Las auxinas y citoquininas adicionadas a los explantes de orquídeas silvestres no tienen efecto alguno sobre su tasa de regeneración.

### ***Hipótesis alternativa***

H1: Las auxinas y citoquininas adicionadas a los explantes de orquídeas silvestres presentan efectos sobre su tasa de regeneración.

## Capítulo II

### Revisión de la Literatura

#### Antecedentes

Las orquídeas son un tipo de plantas muy aclamadas dentro de los ornamentales, puesto que sus flores tienen una belleza y diversidad muy peculiar, razón por la cual siempre ha sido considerada en investigaciones botánicas y hortícolas (Johnston, 2022).

Estas plantas pertenecen a una familia muy amplia y distribuida, sin embargo, sus cuidados y propagación tienen ciertos desafíos debido a la naturaleza de las orquídeas (Sheehan, 1992). Por lo que una herramienta del mundo actual, que es la propagación *in vitro* toma una importancia fundamental para su conservación y multiplicación.

Las técnicas de cultivo *in vitro* tratan de controlar varios factores que pueden afectar a las plantas en su desarrollo, como temperatura, pH, humedad, entre otros (Johnston 2022). Las hormonas vegetales también tienen un efecto directo en las orquídeas, por lo que una optimización de las dosis aplicadas ayudaría a un mejor crecimiento de las plántulas.

Las hormonas se dividen en varios tipos, entre los cuales las citoquininas (como el BAP y la Kinetina) poseen funciones de multiplicación celular y formación de brotes, mientras que, las auxinas (como el AIA y el ANA) participan en la formación de raíces y crecimiento vertical (Kozłowski, & Pallardy, 1997).

Trabajos como el realizado por Kozłowski & Pallardy (1997) se han adentrado en el estudio de los efectos de los reguladores de crecimiento, indicando la historia y funciones atribuidas a dichos compuestos, además de mencionar otras investigaciones relacionadas, junto a los resultados de las mismas.

Hew & Clifford (1993), presentaron un estudio sobre las fitohormonas en las orquídeas, también tomando en cuenta a la industria que se beneficia de estas. En dicho trabajo, adjunta

evidencia sobre los efectos de crecimiento de varias hormonas, cómo AIA, AIB, ANA, 2,4-D, ABA, entre muchas otras, por lo que ha sido tomado cómo una buena fuente referencial para el presente proyecto.

Así mismo, trabajos cómo el realizado por Fu et al. (2015) sobre el AIA, o el de Bozsó & Barna (2021) donde se enfoca en el BAP y Kinetina, e incluso el estudio de Aslam et al (2010) sobre el ANA, fueron considerados en este trabajo cómo estudios previos que pudieron aportar al objetivo de la investigación.

## **Las orquídeas**

### ***Orígenes***

Pertenecientes al reino *Plantae*, estas han sido conocidas desde épocas antiguas, destacando sus fragancias y formas, e incluso sus posibles aplicaciones médicas, sin embargo, su principal interés fue cómo plantas ornamentales, utilizándose cómo regalos exóticos por los colores y figuras diversas que presentaban en su floración (Sheehan, 1992). Siendo así que se empezó a cultivarlas en Hackney, cerca de Londres, siendo uno de los primeros negocios dedicados al comercio de orquídeas, las cuales se vendían en estancia de floración (Johnston, 2022).

Actualmente, el cultivo de orquídeas se da a nivel global, con grandes ingresos para la industria, se tratan diversos géneros de plantas, entre las más conocidas se encuentran las *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Arachnis*, *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Ascocenda*, *Aranda* y *Aranthera*. Aunque inicialmente se vendían únicamente las flores, a día de hoy, se comercian mayormente las plantas completas, ya sea en estancia de floración o no, pues debido a su popularidad y belleza, muchas personas las cultivan en sus hogares o invernaderos. Sin embargo, algunas especies de orquídeas están en peligro de extinción debido a la pérdida de hábitat y la recolección descontrolada (Sheehan, 1992; Johnston 2022).

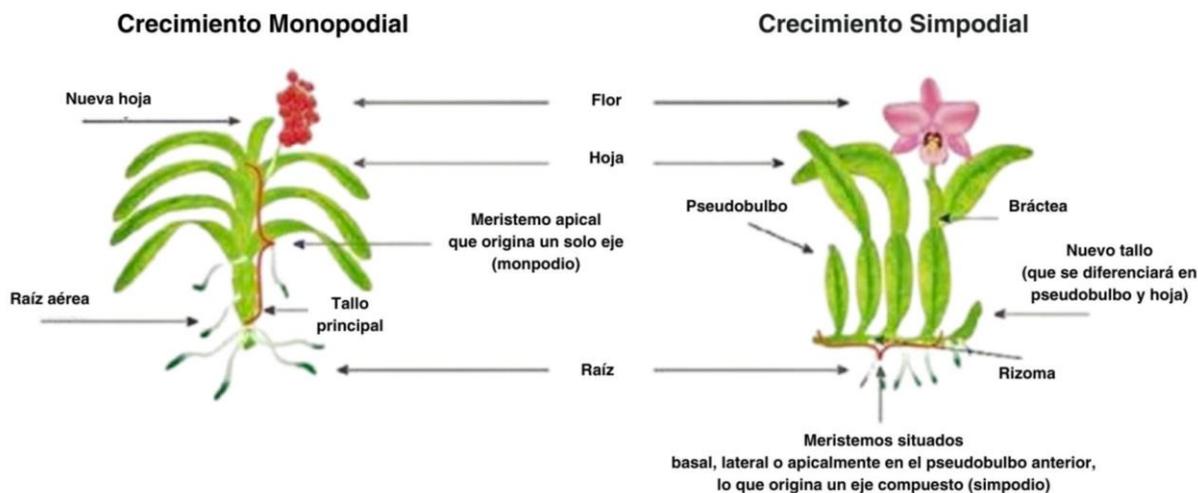
## Información Botánica

Las orquídeas son una familia de plantas monocotiledóneas, bajo el nombre *Orchidaceae* y son un grupo único, son muy variadas vegetativamente, aunque si bien, es gracias a sus flores que se podido clasificarlas correctamente. Se conoce que actualmente existen cerca de 28 000 especies de orquídeas, divididas en aproximadamente 850 géneros (Sheehan, 1992; Delgado, 2019).

Se trata de plantas herbáceas perennes monocotiledóneas, las cuales presentan un crecimiento monopodial o simpodial (Fig. 1.), en su mayoría son epífitas, aunque también se encuentran algunas especies saprofitas, u otras sin hojas. Los tallos pueden presentar entrenudos hinchados a los que se denominan pseudobulbos, que, a diferencia de los bulbos de las orquídeas terrestres, crecen sobre el nivel del suelo (Sheehan, 1992, Johnston, 2022).

**Figura 1.**

*Crecimiento monopodial y simpodial del tallo*



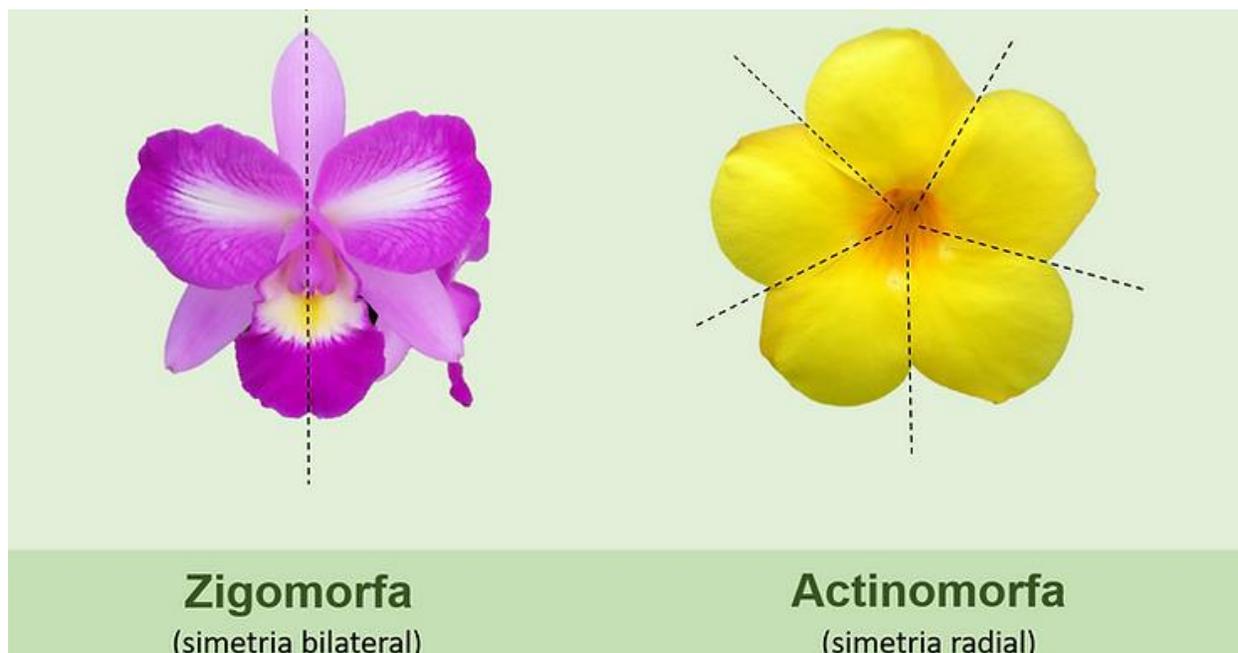
Nota: Tomado de (Delgado, 2019)

Las características más destacadas de las orquídeas están en sus flores, pues son zigomorfas (con simetría bilateral), y el polen que poseen se agrupa en unas masas denominados polinios, los cuales vienen determinados en cantidad de acuerdo a la planta, por

lo que pueden ser tomados en cuenta para la clasificación de las mismas (Johnston, 2022, Filho & Souza, 2021).

**Figura 2.**

*Simetría de las flores.*



**Zigomorfa**  
(simetría bilateral)

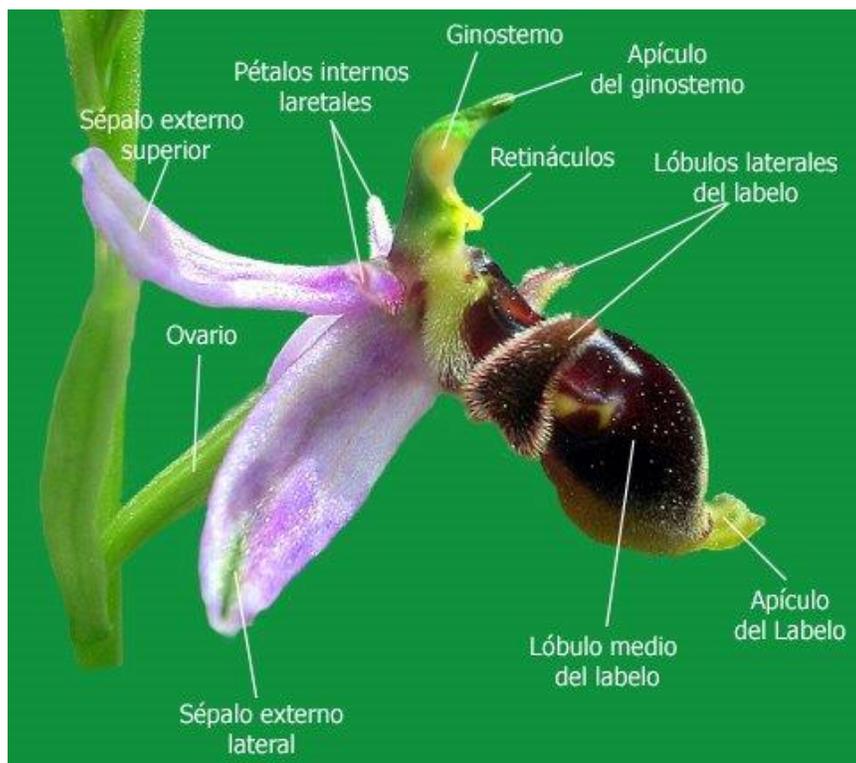
**Actinomorfa**  
(simetría radial)

Nota: Recuperado de: (Filho & Souza, 2021).

Las flores de orquídea además presentan una estructura llamada columna (también ginostemo), la cual es una fusión de los órganos femeninos (pistilos) y masculinos (estambres), se puede encontrar un estambre fértil, notado cómo una antera terminal en el ginostemo, luego, un canal interno de la columna, une el estigma con el ovario (Fig. 3), y entre el estigma y la antera, se encuentra el rostelo, con la función de adicionar un pegamento a los insectos para facilitar el transporte de polen (Díaz, 2008; Sheehan, 1992).

**Figura 3.**

Esquema de flor del Género *Ophrys*.

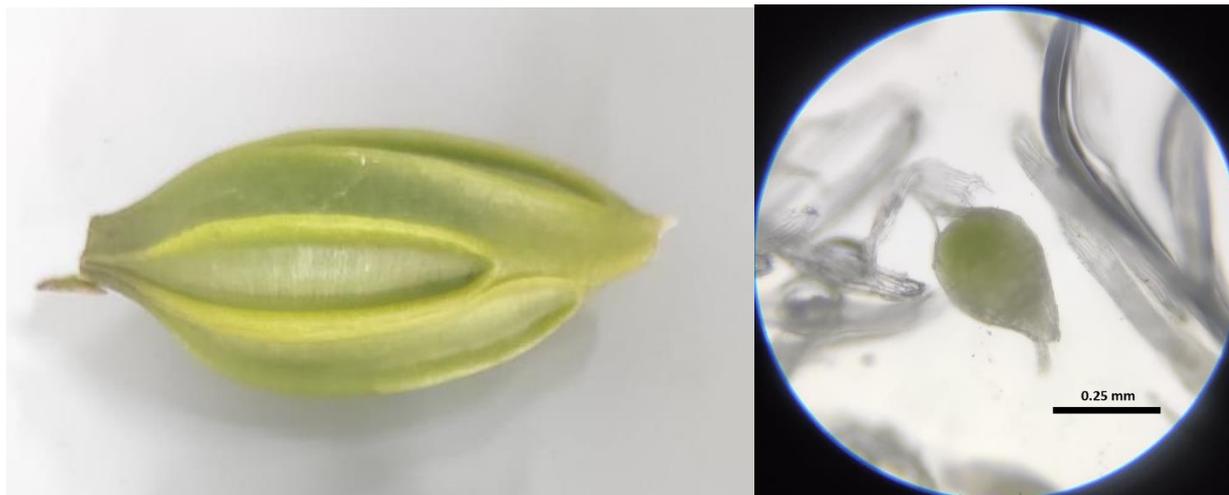


Nota: Tomado de (Díaz, 2008).

Finalmente, las semillas de las orquídeas se producen en volúmenes inmensos, puesto que en una sola vaina pueden existir entre 500 000 a 1 000 000 de semillas, de un tamaño diminuto (Fig. 4.), las cuales contienen un endospermo casi inexistente, por lo que sin ayuda de algún hongo con el cual hacer simbiosis, su germinación en la naturaleza no se puede dar; en el cultivo *in vitro*, esta simbiosis se ve reemplazada por las condiciones óptimas y nutrientes necesarios que tiene la semilla en el medio de cultivo (Johnston, 2022; Delgado, 2019).

**Figura 4.**

*Semillas de orquídea.*



Nota: Izquierda: cápsula de semillas. Derecha: semilla en el microscopio a 250x.

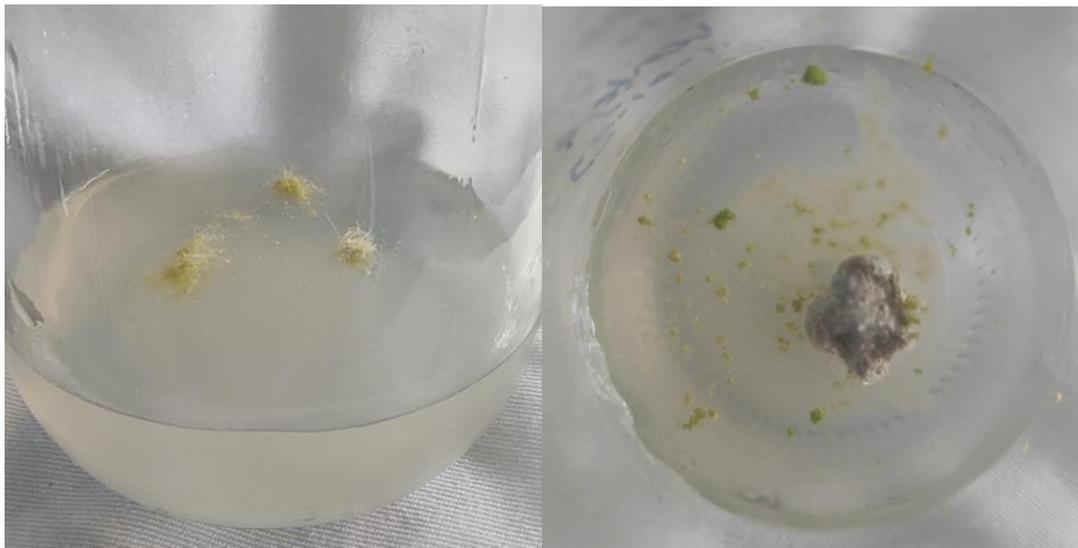
**Cultivo de orquídeas****Propagación**

Su propagación puede ser sexual o asexual, siendo esta última forma la más utilizada, puesto que provee la ventaja de mantener características deseadas entre las plantas, además de la facilidad que presentan las orquídeas a dicho proceso (Sagawa, 1984).

Por otro lado, la simbiosis de las semillas (Fig. 5.) se da porque organismos externos proveen energía hasta que las plantas puedan auto sustentarse al tener suficiente clorofila. Investigaciones previas han evidenciado esto, pues en medios de cultivo los hongos convertían almidones en azúcares, logrando que las semillas se desarrollen, por lo que haciendo un reemplazo directo en la formulación del medio se pudo obtener buenos resultados en cuanto a la germinación *in vitro* (Sagawa, 1984; Delgado, 2019).

**Figura 5.**

*Semillas de orquídeas en medio in vitro.*



Nota: Semillas *in vitro* a las 2 semanas. Izquierda: sin contaminación. Derecha: con presencia de hongos.

La propagación de orquídeas a través de esquejes es característica de las especies monopodiales. Este tipo de reproducción permite que ciertas especies desarrollen raíces aéreas que facilitan el proceso, pudiéndose extraer y plantar directamente. Así mismo, otras orquídeas pueden generar hijuelos que se enraízan aun estando sujetos a la planta madre, y virtualmente son plantas completas, siendo incluso capaces de florar, y son extraídas cuando ya se tiene una buena cantidad de estas crías, las cuales se cultivan aparte, sin embargo, presentan un retardo en su crecimiento (Frowine, s.f.)

También se puede usar bulbos para propagar, tomando aquellos que ya no tengan hojas y colocándolos en un sustrato adecuado. Este proceso tomara varios meses, sin embargo, con los debidos cuidados se empezarán a formar hojas en los bulbos, aunque sean de lento crecimiento (Sheehan, 1992).

Es de mencionar una técnica relativamente nueva, la mericlación (clonación de meristemas, en inglés), que es un proceso de cultivo *in vitro* donde se pueden obtener plantas idénticas en grandes cantidades, Para esto se utilizan brotes pequeños, que se desinfectan y se colocan en medios de cultivo para su desarrollo, además de realizarse diferentes divisiones

del material vegetal para obtener las plantas deseadas, que compartirán características al tratarse de clones, sin embargo, no se realiza una clonación infinita, debido a la estabilidad de los clones, así que se utilizan nuevos meristemas regularmente. Estas plántulas obtenidas, tendrán un efecto negativo en cuanto al tiempo de floración (Sagawa, 1984)

### **Sustratos**

Las orquídeas pueden crecer sobre una amplia variedad de sustratos, de acuerdo a su naturaleza, ya sean terrestres o epífitas, estas últimas encontradas naturalmente creciendo sobre árboles. Para las plantas epífitas, se puede utilizar fibras, como los helechos del género *Osmunda*, que pueden proveer de nitrógeno lentamente. Así mismo, se puede utilizar fibra de helecho arborescente, de coco o corteza de árbol, incluso musgos, además de la posibilidad de otros materiales agregados, que sean de origen mineral, por la ventaja de no descomponerse y mantener la humedad. En estudios realizados por Poole & Sheehan (1977), se encontró que una mezcla de turba y perlita en igual proporción permitió el desarrollo de orquídeas terrestres y epífitas (Johnston, 2022).

### **Factores Ambientales**

El mal riego es una de las principales causas de la muerte de las orquídeas, puesto que sus hábitos de riego dependerán de factores climáticos, tamaño de la planta y el sustrato utilizado. Además, el agua de riego deberá mantener un pH entre 4 a 9, y no presentar una dureza alta (Sheehan, 1992; Delgado, 2019).

La temperatura también puede afectar al crecimiento de las plantas, pues cada especie tendrá sus preferencias, de manera general crecen en hábitats cercanos a los 22°C, pudiendo descender a 10° en la noche, sin embargo, exceder el límite de tolerancia de la orquídea o exponerla por mucho tiempo a una temperatura elevada, causará que no florezca, se desarrolle o en casos mayores la muerte de la misma (Sheehan, 1992; Johnston, 2022).

En cuanto a la fertilización, es ideal agregar concentraciones correctas al sustrato, y que el fertilizante sea de liberación lenta para evitar una sobredosificación en la planta (Johnston, 2022). De manera profesional, para la crianza de orquídeas, de acuerdo a la especie se manejan las ratios de luz solar, teniendo en cuenta las estaciones y la etapa de las plantas.

### **Enfermedades de las orquídeas**

Entre los insectos que pueden afectar a las orquídeas se encuentran varias especies de la familia *Diaspididae*, alimentándose y acumulándose en el envés de la hoja, en tallos, en los pseudo bulbos y grietas de la planta, haciendo que esta tome una coloración amarilla. Otros insectos, perteneciente a la familia *Dactylopiidae* como lo son las cochinillas también pueden ocasionar problemas en la planta, se los detecta como una asociación de insectos blancos, y al secretar melaza pueden atraer hormigas o desarrollar fumagina, una patología ocasionada por un hongo saprófito (Johnston, 2022; Sheehan, 1992).

También se puede tener una infestación por ácaros, denotándose en la presencia de manchas plateadas en las hojas, estos insectos se desarrollan mayormente en climas secos y cálidos. Además de los mencionados, las cucarachas son una gran plaga, debido a su afición de consumir las raíces jóvenes, capullos y flores nuevas, sus hábitos nocturnos hacen que a menudo se las confunda con babosas o caracoles, puesto que se alimentan de las mismas partes de la planta, además de las hojas, sin embargo, estos dejan rastros de limo que se pueden observar cerca al amanecer (Fullaway, 1937; Johnston, 2022).

Insectos como los trips, araña roja, ciertas especies de áfidos, mosca blanca, hormigas, escarabajos del género *Rhynchophorus* y los de *Ambrosia*, ciempiés, milpiés, colémbolos y Psocópteros solo son algunos de los insectos que pueden afectar a las orquídeas (Fullaway, 1937).

No solamente los insectos pueden causar enfermedades, también ciertos hongos atacan a las orquídeas en diferentes estancias de la planta. Una enfermedad frecuente en climas frescos y húmedos es el tizón de los pétalos, causada por *Botrytis cinerea*, que se diferencia al producir manchas marrones en los pétalos y sépalos de las flores. Otros hongos producen un micelio intracelular, como es el caso del género *Pythium*, causando la pudrición de la planta, así como los pertenecientes a *Phytophthora*. Géneros como *Collectotrichum*, *Cercospora*, *Gloesporium* o *Phylostictina*, producen una muerte de las hojas, además del daño estético en las flores (Burnett, 1957).

Sin embargo, lo más difícil de manejar son los virus, ya que no se pueden detectar o tratar adecuadamente, además de ser muy fáciles en su propagación a otras plantas. Uno de los más conocidos es el virus del mosaico de *Cymbidium* (CMV) que se detecta únicamente en la floración, para contrarrestar esto se recomienda mantener estériles las herramientas de trabajo al utilizarlas en diversas plantas (Sheehan, 1992; Fullaway, 1937).

A nivel fisiológico, se conocen dos efectos más comunes, siendo la deficiencia de calcio, con síntomas de ennegrecimiento en hojas, bulbos y tallos jóvenes, llegando a caerse las hojas, también notándose con un amarillamiento en toda la planta. El otro caso a mencionar es el colapso celular del mesófilo, donde la superficie de las hojas tomara una coloración amarilla, marrón o negra, además de realizarse una picadura en la planta, fenómeno ocasionado por las bajas temperaturas (Burnett, 1957).

### **Cultivo de Tejidos Vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales, se conoce también como cultivo *in vitro* o cultivo de células y tejidos, y abarca varias técnicas relacionadas a la investigación científica y la producción de plantas, por lo que tiene una gran acogida en la agricultura.

El cultivo *in vitro* se basa en el crecimiento y desarrollo de células, tejidos u órganos vegetales en un ambiente estéril y controlado. Esto ha provocado una revolución en la forma de propagación y mejora de plantas, pues a partir de una muestra de material vegetal, que pueden ser células, explantes o meristemos, se puede reproducir plantas de forma rápida y eficiente (Thorpe, 2013).

Estas técnicas permiten la obtención de plantas libres de plagas y enfermedades, además de un enfoque ecológico en la conservación de especies amenazadas, e incluso optimización de procesos de obtención de metabolitos secundarios para fármacos (Singh, 2022).

### ***Desarrollo del Cultivo In vitro***

El nacimiento de esta rama se dio en el siglo XX, sabiendo conceptos básicos como lo es la célula, se comenzó la investigación. Gottlieb Haberlandt, considerado el padre del Cultivo de Tejidos Vegetales, pues en 1902, sus investigaciones en células para producir embriones vegetales le llevaron a acuñar el término 'Totipotencia', además de fomentar un cultivo aséptico en una solución con nutrientes para el desarrollo de estas células (Singh, 2022; Thorpe, 2013)

La investigación en el campo tuvo varios personajes con pequeños avances, como el uso de meristemos para el cultivo *in vitro* (Haque et al, 2022).

En 1934, el medio de cultivo líquido que se usaba hasta la fecha fue complementado con agar para conseguir una textura sólida, además de glucosa y clorhidrato de cisteína, posteriormente se complementarían con ácido indol acético (AIA) y vitamina B, así solo dos años después se consiguió germinar semillas *in vitro* (Singh, 2022; Thorpe, 2013).

Entre los años 40 a los 60 el desarrollo de técnicas e investigación del cultivo de tejidos vegetales fue abrumador, llegando a poder diferenciar las células dentro de los medios de

cultivo, utilizando también nuevos nutrientes y sustancias como el agua de coco, la adición de adenina y fosfatos a los medios y demás (Singh, 2022)

Estudios de los efectos de ácidos nucleicos y sus derivados en medios de cultivo llevaron al descubrimiento de una de las primeras citoquininas, la Kinetina, entonces posteriores investigaciones llevaron a la resolución de mantener un balance de auxinas y citoquininas en los cultivos para un mejor desarrollo. Como expresó Thorpe (2013), “un nivel relativamente alto de auxina a Kinetina favoreció el enraizamiento, lo contrario condujo a la formación de brotes y niveles intermedios a la proliferación de callos o tejido parenquimatoso de la herida”

Tiempo después, nació el cultivo nodriza, donde se buscaba producir varias colonias de plantas, lo que se logró tomando callos cultivados y agitándolos para luego colocarlos sobre papel filtro, teniendo callos bien establecidos (Haque et al, 2022)

Cerca de 1960, se logró desarrollar una planta completa en cultivo *in vitro*, y ese mismo año, la investigación de Morel (1960) dio resultados positivos, obteniendo orquídeas libres de virus, gracias a que como lo explica Thorpe (2013), “la eliminación del virus fue posible porque el tejido vascular, en el que se mueven los virus, no se extiende a la raíz ni al ápice del brote”, siendo estos los explantes que se utilizaron en dicho ensayo.

En 1962, un par de investigadores realizarían una investigación muy importante, pues hasta ese entonces, se utilizaban medios básicos para el cultivo *in vitro*, teniendo bajas cantidades de sales minerales, por lo que se dieron a la tarea de crear un nuevo medio de cultivo, con una concentración de sales 25 veces mayor, y gran aporte de nitrógeno (Murashige & Skoog, 1962). Dicho medio de cultivo se usa a día de hoy a nivel global, conocido como Murashige & Skoog (Medio MS), junto a otros medios que ya son más especializados.

Otro hito en este año, fue la polinización y fertilización *in vitro*, donde Kanta et al. (1962) lograron conseguir embriones a partir de óvulos y granos de polen que se colocaron en el medio.

Los protoplastos, descubiertos en 1892, corresponden a células vegetales que no tienen pared celular, y el siglo XX, con las nuevas tecnologías para la obtención de enzimas, se facilitó el proceso de obtención de estas células, resultando en varios investigadores con estudios más profundos sobre los protoplastos, siendo así demostrada en 1970 la capacidad de totipotencia que dichas estructuras tenían (Thorpe, 2013).

En 1941, investigaciones determinaron que *Agrobacterium tumefaciens*, podía producir tumores en las plantas, por lo que los continuos estudios resultaron en un proceso de transformación bacteriana, y en 1965 se averiguó que dicha bacteria podía insertar fragmentos de ADN en la planta infectada (White & Braun, 1941).

Finalmente, el desarrollo del cultivo *in vitro* sirvió para el estudio del comportamiento celular, la modificación y mejoramiento de plantas, la obtención de plantas libres de enfermedades y patógenos, el almacenamiento del germoplasma, la propagación clonal y la formación de productos varios (Singh, 2022)

Estas aplicaciones se pueden dividir convenientemente en cinco áreas amplias, a saber: (a) comportamiento celular, (b) modificación y mejoramiento de plantas, (c) plantas libres de patógenos y almacenamiento de germoplasma, (d) propagación clonal y (e) formación de productos.

### ***Cultivo in vitro de orquídeas***

El cultivo *in vitro* de orquídeas, conocido también como propagación clonal o micropropagación, permite la obtención rápida de plantas idénticas, a partir del material vegetal de una planta seleccionada, denominada planta madre.

Con el desarrollo de estas técnicas, también hubo un amplio interés en el cultivo de ornamentales, pues la micropropagación confiere ciertas ventajas como lo es obtener plantas idénticas a la madre, procurando de esta manera mantener características de color, floración y patrones específicos, algo que no se podría hacer si se propagan las plantas por semillas (Smith, 1992).

La micropropagación se divide en 4 etapas, siendo la primera la fase de establecimiento o introducción de explantes, donde el material vegetal se desinfecta y adecua al cultivo *in vitro*, si bien es el paso más difícil del proceso por posible contaminación y/o oxidación, las plantas que sobrevivan serán aptas para su multiplicación (Gamborg, 1976).

La fase 2 del cultivo tiene como objetivo principal el desarrollar las plantas y su consecuente multiplicación, realizando usualmente cortes en los explantes para la obtención de ápices, en esta etapa se pueden formar callos, que, al tratarse de ornamentales, no son muy bien recibidos, puesto que pueden generar mutaciones, por lo que siempre se opta por obtener clones a partir de crecimiento axilar y apical (Smith, 1992).

La tercera fase, donde se preparan las plantas para su salida del laboratorio e introducción a campo, para lo que es necesaria la adición de auxinas al medio, lo que le da el nombre a esta etapa, de enraizamiento (Haque et al, 2022).

Y la cuarta fase, donde se sustraen a las plantas del medio de cultivo para una aclimatación en sustrato o suelo, con condiciones controladas para su inserción paulatina en el campo o invernadero (Smith, 1992).

Algunos factores que se debe tener en cuenta en el cultivo *in vitro* son las fuentes de contaminación, puesto que los cultivos infectados pueden dañar a otros cercanos, siendo así necesaria una constante revisión de presencia de bacterias u hongos en el medio de cultivo.

También se debe verificar que no haya una oxidación de los explantes o el medio, tornándose de color marrón (Kozlowski & Pallardy, 1997).

Las condiciones de cultivo optimas serán específicas para cada especie, algunos factores cómo humedad, temperatura, exposición a la luz o tipo de luz pueden inhibir o promover el desarrollo de los explantes (Kanta et al, 1962).

La composición de los medios de cultivo dependerá de la etapa en la que se esté trabajando, además del tipo y especie de explante. Sustancias complementarias cómo antioxidantes, antibióticos, antifúngicos, adsorbentes o reguladores de crecimiento pueden ser añadidas en la preparación de estos medios (Murashige & Skoog, 1962).

### **Reguladores de Crecimiento**

Los reguladores de crecimiento, conocidos cómo fitohormonas u hormonas vegetales, son un grupo de compuestos químicos que se producen naturalmente en las plantas superiores, y que se encargan de regular los diversos procesos de su desarrollo. Además de eso, se han visto implicadas en las respuestas a estrés biótico y abiótico (Yan et al, 2023; Fu et al, 2015).

Estas hormonas funcionan a una concentración muy baja, por lo que su extracción es complicada, aun así, su importancia es enorme. Dentro de la planta las interacciones que tienen resultan en los distintos procesos fisiológicos, desde la germinación de semillas hasta la maduración de frutos, además de respuestas a señales ambientales (Yan et al, 2023; Kozlowski & Pallardy, 1997)

Las fitohormonas actúan de acuerdo a la etapa de la planta, por lo que también tienen aplicaciones agrícolas y hortícolas para el crecimiento de los cultivos, mejorando su productividad.

De manera general, existen 5 clases principales de fitohormonas: las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y derivados, y etileno, sin embargo, algunas hormonas relativamente nuevas se adjuntan, las cuales son los brasinoesteroides, estrigolactonas, jasmonatos, compuestos fenólicos, poliaminas y ácido salicílico (Yan et al, 2023; Kozłowski & Pallardy, 1997)

### ***Auxinas***

Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales descubiertas, cerca de 1880, cómo una sustancia que permitía el desarrollo de las plantas, sin embargo, no fue hasta la década de 1930 que se acuñó dicho término, proveniente del griego auxein (αυξειν) cuyo significado es crecer o elongar. En dicha década se descubrió también el ácido indol-3-acético (AIA) siendo la principal auxina hasta la fecha por su función en la planta (Kozłowski & Pallardy, 1997)

El ácido indol-3-acético es un derivado del triptófano, y se conforma de un anillo de benceno con un anillo pirrol y una cadena lateral de ácido acético (Fig. 6).

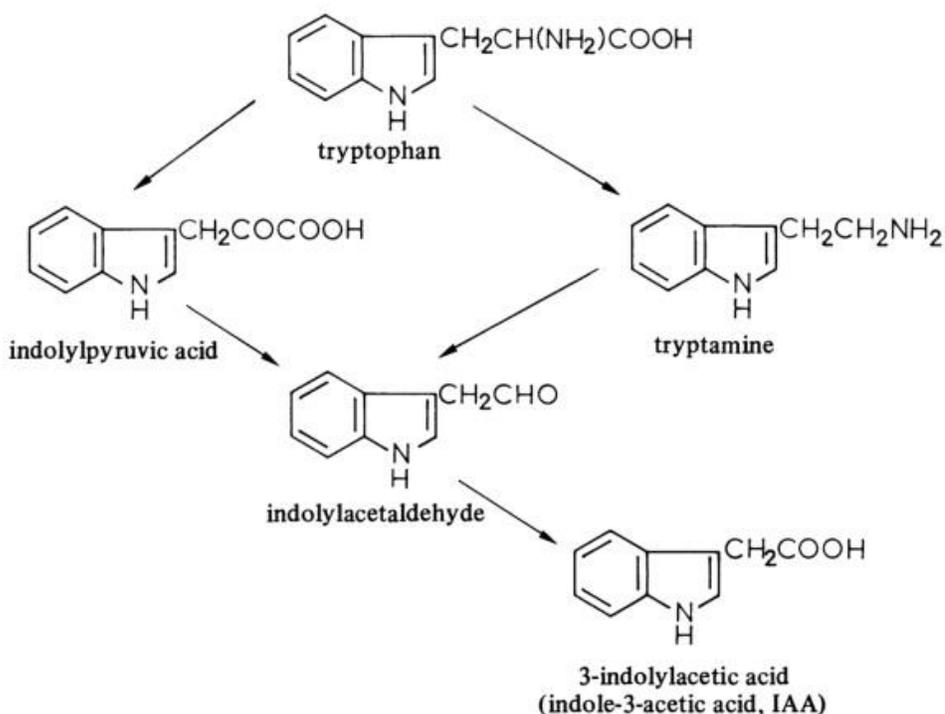
Las funciones en las que participan las auxinas son varias, siendo algunas: la elongación y división de células, dominancia apical, formación de raíces adventicias, iniciación radicular, diferenciación de tejidos vasculares, fototropismo (optimizando la fotosíntesis) y senescencia. Por la importancia de estas fitohormonas ha llevado al desarrollo de hormonas análogas de manera sintética, destacándose el ácido indol-3-butírico (AIB), ácido naftalen-1-acético (ANA) y el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Yan et al, 2023; Kozłowski & Pallardy, 1997)

Las auxinas pueden estar conjugadas e interactuar con otras sustancias, por lo que en las plantas puede ser encontrada con el ácido aspártico o el glutámico, la glicina, azúcares y ciclitoles. Particularmente, el AIA se relaciona con la enzima AIA oxidasa, que a su vez puede

ser inhibida por ortodifenoles y promovida por monofenoles, teniendo un efecto directo en el crecimiento de las plantas (Kozłowski & Pallardy, 1997)

**Figura 6.**

*Biosíntesis del AIA a partir del triptófano.*



Nota: Tomado de (Chemical Book, s.f.)

Las auxinas trabajan a una concentración baja ( $10^{-5}$  M) donde pueden acelerar el enraizamiento de explantes leñosos y herbáceos. Mientras que a concentraciones mayores puede inhibir la elongación, promover el crecimiento de tumores, y causar la muerte de las plantas, actuando como un herbicida selectivo, un ejemplo de esto es el 2.4-D que es particularmente tóxico para dicotiledóneas (Podwyszynska, 2003; Kozłowski & Pallardy, 1997)

Así mismo, se han realizado investigaciones para determinar otros efectos de la adición de auxinas, siendo encontrados efectos en la formación de metabolitos secundarios, como en aceites esenciales con más principios activos y los efectos en la síntesis de alcaloides (Evans & Evans, 2009; Kozłowski & Pallardy, 1997)

### **Ácido Indol-3-acético.**

Esta hormona es considerada cómo la principal en el grupo de las auxinas debido a su participación en varios procesos fisiológicos. En las raíces, cambios en la concentración son percibidos con alta sensibilidad, lo que promueve la iniciación primaria y lateral de raíces en diferentes tipos de tejidos. Provoca dominancia apical, priorizando el crecimiento longitudinal sobre el de las yemas axilares, consecuentemente, también influye en la morfogénesis de la hoja y el desarrollo del sistema vascular (Evans & Evans, 2009).

El AIA también cumple una función en la interacción planta-hongo, ya que sirve para la patogénesis o simbiosis, de acuerdo al caso, evidenciado con la inducción de crecimiento radicular en *Arabidopsis thaliana* al estar presencia de hongos del género *Ustilago esculenta* (Kozlowski & Pallardy, 1997; Fu et al, 2015).

### **Ácido naftalen-1-acético**

Conocida como ANA, la hormona es de origen sintético y actúa como un análogo del AIA. Perteneciendo al grupo de las auxinas, cumple la función de fomentar el desarrollo radicular en plantas jóvenes. Diversos estudios han evidenciado la inducción de la formación de ramificaciones mediante su aplicación. Además, se ha constatado que su uso incrementa la altura de la planta y el peso seco, como se ha observado en el caso de la orquídea híbrida *Mokara Chark Kuan* (Evans & Evans, 2009; Khandaker, 2017; Aslam et al, 2010)

### **Citoquininas**

En la década de los 50, se realizaron descubrimientos relacionados con una sustancia potenciadora de la división celular. Esta sustancia, cuya existencia ya se sospechaba, fue finalmente identificada en el ADN espermático del arenque y se le llamó Kinetina (6-furfurilaminopurina / 6-furfuriladenina). Esta sustancia mostró efectos significativos en el

crecimiento de las plantas, lo cual se alineó con su denominación, en concordancia con el proceso de 'citocinesis' (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997).

Tiempo después, se logró el descubrimiento de la Zeatina (6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purina). Este nombre se asignó debido a su detección durante el análisis del maíz, marcando así la primera vez que una citoquinina se encontraba de manera natural en plantas superiores. Al igual que en el caso de la Kinetina, esta molécula resultó ser un derivado de la adenina con sustitución en la posición 6 (Fig. 7.) (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997).

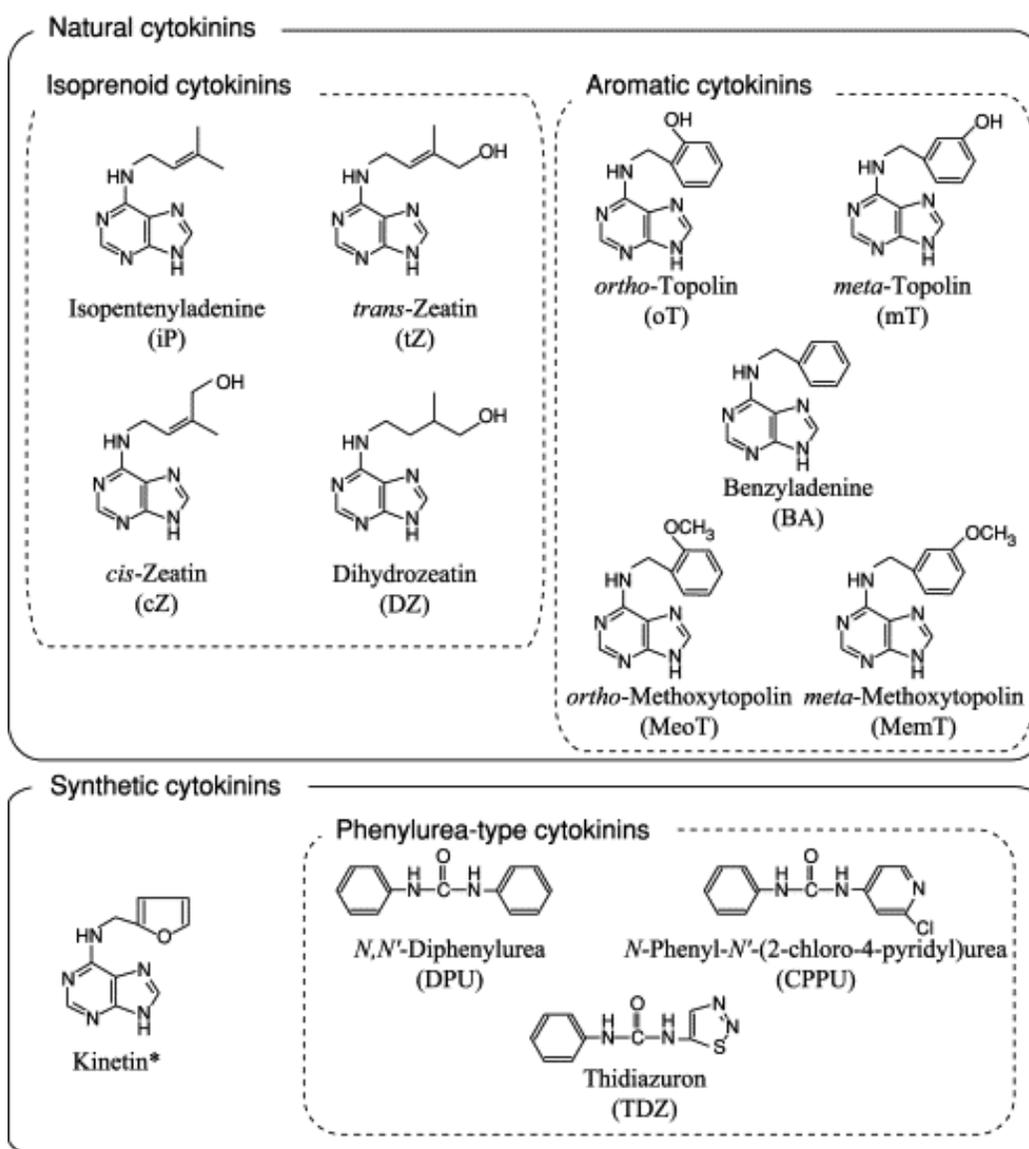
Se descubrió que la hormona se sintetizaba mayormente en raíces, y factores como inundación del suelo, sequía, pH bajo, salinidad y altas temperaturas podían inhibir su producción. Además de mostrar variaciones en su concentración de acuerdo a la etapa de la planta, temporada y condiciones ambientales (Evans & Evans, 2009; Bozsó & Barna, 2021)

Las funciones atribuidas a este tipo de hormonas son principalmente la división celular y la formación de tumores en las plantas, además se ha comprobado su eficacia en formación de brotes adventicios y yemas a partir de células indiferenciadas, y efectos en la síntesis de metabolitos secundarios (Sakakibara, 2005; Hamayun et al, 2015)

También se encontró funcionalidad de las citoquininas en el alargamiento celular, expansión de hojas, regulación en la apertura y cierre de estomas, ruptura de dormancia de semillas fotosensibles, dominancia apical, retraso de la senescencia y promueve el desarrollo de cloroplastos (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997).

**Figura 7.**

Citoquininas naturales y sintéticas.



Nota: Tomado de (Sakakibara, 2005)

**Kinetina**

Se trata de una hormona de origen sintético, y es conocida desde hace bastante tiempo por su rol en el crecimiento vegetal, también se ha estudiado su rol en respuesta al estrés abiótico, siendo así que ayuda a mantener el desarrollo de las plantas y la calidad de alimentos bajo condiciones de salinidad, algo que se atribuyó a su potencial para regular la interacción entre las fitohormonas (Hamayun et al, 2015)

### **Benzil-6-aminopurina**

Llamaba también benziladenina, se trata de otra hormona sintética, del grupo de las citoquininas favorece la multiplicación celular, y particularmente la inducción de brotes a concentraciones moderadas (5 ppm), también se ha encontrado un efecto en la síntesis de proteínas, fotosíntesis y genes relacionados a la defensa de las plantas, declarando que tiene un efecto en la respuesta a estrés (Amelia, 2020; Uchendu et al, 2011)

### **Otras Hormonas**

Cómo ya se había mencionado, existen otros grupos de fitohormonas, que son importantes para la planta y su desarrollo, además de tener funciones relacionadas o similares a las auxinas y citoquininas, también pueden interactuar con estas.

Las giberelinas, que fueron descubiertas al estudiar una enfermedad que causaba el alargamiento anormal del arroz hasta no poder sostenerse, fueron detectadas cómo una sustancia proveniente del hongo *Giberella fugikuroi*, y una década después lograron aislar dicho compuesto. Sin embargo, se encontró que las giberelinas (en referencia al ácido giberélico) existían naturalmente en plantas superiores, tenían un afecto similar a las auxinas, aunque algunas solo participaban como intermediarios en la formación de compuestos, siendo que un grupo pequeño aportaba una actividad hormonal (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997)

Entre sus funciones, se encontró que aporta a la división, elongación y diferenciación celular, por lo que, a nivel de la planta, participaba en el gravitropismo, alargamiento de tallos, expansión de hojas, iniciación floral, expansión de frutas y germinación de semillas, además de mostrar efectos en la síntesis de metabolitos secundarios (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997)

El ácido abscísico (ABA), descubierto en plantas como un inhibidor del crecimiento, fue conocido como Dormina, ya que presentaba efectos en la dormancia de las semillas y la apertura de yemas. Fue hasta después, que, al estudiar la abscisión de hojas, se encontraron las denominadas entonces Abscisina 1 y 2, que presentaban una estructura similar a la Dormina, que eventualmente fue conocida como ácido abscísico (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997; Yan et al, 2023)

Su estructura también presentaba cierto parentesco a los carotenoides, lo que llevó a su investigación, encontrando que ciertas xantofilas inhiben la germinación al tener exposición a la luz (Kozlowski & Pallardy, 1997)

De manera general, el ABA presenta efectos en la abscisión de yemas, hojas, pétalos, flores y frutos, además de ayudar en la dormancia de yemas y semillas, también participando en el crecimiento radicular, maduración de frutas y senescencia. Ha sido considerada una hormona compleja, ya que interactúa con otras sustancias y su función varía de acuerdo al tejido (Evans & Evans, 2009)

El etileno, es un derivado de la metionina y presenta un rol clave en la maduración de frutos, además de aplicaciones para la síntesis *de Novo* de ciertas enzimas y metabolitos secundarios. La presencia de otras hormonas puede inducir a la formación de este compuesto, que adicionalmente se produce en plantas que están libres de estrés (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997)

Presenta efectos en la germinación de semillas, abscisión, dominancia apical, crecimiento de yemas, epinastia, hipertrofia de tejidos, flujo de látex, crecimiento radicular, elongación del tallo, floración (Evans & Evans, 2009; Kozlowski & Pallardy, 1997)

Algunos compuestos fenólicos y sus derivados han sido considerados como hormonas vegetales, ya que presentaban efectos de inhibición del crecimiento, además de interactuar con algunas hormonas (Kozłowski & Pallardy, 1997).

Uno de estos compuestos es el ácido salicílico, que tiene un rol fundamental en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Evans & Evans, 2009).

Las poliaminas, se han evidenciado para regular la división celular, embriogénesis, formación de polen, desarrollo frutal, ruptura de dormancia, elongación de entrenudos, formación de raíces y senescencia (Evans & Evans, 2009)

Mientras que, los brasinoesteroides regulan la división celular, elongación celular, elongación de brotes, inhibición de abscisión de hojas y frutas, impide desarrollo de raíces adventicias y actúan en las respuestas a estrés, se ha evidenciado que este tipo de hormonas tienen una relación a la exposición a la luz (Evans & Evans, 2009; Kozłowski & Pallardy, 1997).

Los jasmonatos, que participan en la senescencia de las hojas y la dormancia de semillas también son considerados como hormonas vegetales ((Evans & Evans, 2009)

Las estrigolactonas, son moléculas derivadas de carotenoides, que actúan como señales moleculares para regular la arquitectura de la planta, la absorción de nutrientes y la interacción con otros organismos (Yu et al, 2022).

Finalmente, es de mencionar que todas las hormonas vegetales están presentes de acuerdo a la estancia de la planta, e interactúan entre ellas y con otros factores, ya sean condiciones climáticas o factores de estrés, y para su acción, se basan en la unión a un receptor, que al formar el complejo Hormona-Receptor, da una respuesta bioquímica que produce los efectos específicos de cada regulador de crecimiento (Evans & Evans, 2009).

## Capítulo III

### Metodología

#### Ubicación del Área de Investigación

##### *Ubicación Política*

País:	Ecuador
Provincia:	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón:	Santo Domingo
Parroquia:	Luz de América
Sector:	Vía Quevedo, Km 24

##### *Ubicación Ecológica*

Zona de vida:	Ecológica
Ecosistema:	Bosque Húmedo Tropical
Temperatura:	~32° / ~22°
Precipitación anual:	~784 mm
Humedad relativa:	~80%
Heliofanía:	~860 horas luz / año
Relieve:	Plano / Ondulado
Suelos:	Alofánicos-pseudo limosos / Limosos / Limosos untuosos

##### *Ubicación Geográfica*

Las Investigación fue realizada en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, específicamente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Latitud: 0° 24' 45" S  
Longitud: 79° 18' 34" W  
Altitud: 295 msnm

**Figura 8.**

*Mapa de ubicación geográfica del área de investigación*



## **Materiales**

### ***Equipos***

- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de crecimiento
- Plancha de calentamiento con agitación
- Potenciómetro
- Refrigerador

### ***Materiales e Insumos***

- Bisturí
- Hojas de bisturí
- Cajas Petri
- Envases de vidrio
- Film Plástico
- Pinzas cuello de cisne
- Mechero de alcohol
- Vasos de precipitación
- Espátulas
- Matraz Erlenmeyer
- Papel Kraft
- Micropipeta
- Puntas de micropipeta
- Pipeta
- Propipeta

- Atomizador
- Magnetos
- Papel aluminio
- Ligas de caucho de colores

### ***Reactivos***

- Medio basal MS
- Ácido indol-3-acético (AIA)
- Ácido 1-naftalenacético (ANA)
- 6-Bencilaminopurina (BAP)
- Kinetina
- Hipoclorito de sodio 10%
- Etanol 96%
- Povidyn Solución
- Sacarosa
- Agar agar

### **Análisis estadístico**

#### ***Variables***

##### **Variables Dependientes:**

- Formación de callos
- Longitud de brotes
- Número de brotes
- Longitud de raíces
- Número de raíces

- Longitud de la planta

### **Variables Independientes**

- Concentración de BAP
- Concentración de AIA
- Concentración de Kinetina
- Concentración de ANA

### ***Niveles y Factores de la Investigación***

**Tabla 1.**

*Factores y niveles de la investigación.*

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>
Hormonas	A0: BAP A1: Kinetina A2: AIA A3: ANA
Concentración	B0: 0 mg/l B1: 0.5 mg/l B2: 1 mg/l B3: 1.5 mg/l B4: 2 mg/l

**Interacción de Tratamientos****Tabla 2.***Interacción de tratamientos*

<b>Trtatamiento</b>	<b>Interacción</b>	<b>Hormona*Concentración</b>
T1	A0B0	BAP 0 mg/l
T2	A0B1	BAP 0.5 mg/l
T3	A0B2	BAP 1 mg/l
T4	A0B3	BAP 1.5 mg/l
T5	A0B4	BAP 2 mg/l
T6	A1B0	Kinetina 0 mg/l
T7	A1B1	Kinetina 0.5 mg/l
T8	A1B2	Kinetina 1 mg/l
T9	A1B3	Kinetina 1.5 mg/l
T10	A1B4	Kinetina 2 mg/l
T11	A2B0	AIA 0 mg/l
T12	A2B1	AIA 0.5 mg/l
T13	A2B2	AIA 1 mg/l
T14	A2B3	AIA 1.5 mg/l
T15	A2B4	AIA 2 mg/l
T16	A3B0	ANA 0 mg/l
T17	A3B1	ANA 0.5 mg/l
T18	A3B2	ANA 1 mg/l
T19	A3B3	ANA 1.5 mg/l
T20	A3B4	ANA 2 mg/l

### ***Tipo de diseño***

La investigación mantiene un diseño bifactorial AxB (ANOVA DCA) para el análisis de los parámetros de desarrollo de los explantes, con un total de 20 tratamientos teniendo 3 repeticiones cada uno.

Además, para el análisis de la formación de callos, al tratarse de una variable cualitativa, se realiza una prueba de Chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ).

### ***Tabla de Análisis de Varianza***

**Tabla 3.**

*Datos del análisis de varianza.*

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>
Hormona	3
Concentración	4
Interacción A*B	12
Error	40
Total	59

### ***Análisis Funcional***

Para las pruebas de significancia, se utiliza la prueba de Tukey al 5%.

### **Métodos**

#### ***Obtención de las Semillas***

Las semillas utilizadas en la investigación fueron obtenidas de manera silvestre en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, siendo obtenidas 3 diferentes cápsulas de especies locales.

Las orquídeas de las cuales se tomaron las cápsulas de orquídeas fueron identificadas cómo pertenecientes a los géneros *Lycaste*, *Catasetum* y *Oncidium*.

### ***Preparación de Medio de Cultivo Para Germinación***

El medio que se utilizó fue el Murashige & Skoog (MS) al 100%, para lo cual se siguió lo indicado en la Tabla 4, posteriormente vertiendo el medio preparado en frascos de vidrio, con alícuotas de 40 ml por envase, se taparon los medios con papel aluminio y se aseguraron con ligas de caucho.

El autoclavado se realizó por 20 minutos a 121°C, luego se dejó enfriar y se almaceno a temperatura ambiente hasta su uso.

**Tabla 4.**

*Composición medio de cultivo por litro, para germinación de semillas de orquídea.*

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Medio MS	4.41 g
Sacarosa	30 g
Glicina	0.25 g
pH	5.7
Agar agar	7 g

### ***Desinfección de Semillas de Orquídea***

La desinfección se llevó a cabo en cámara de flujo, previamente desinfectada. Se tomaron las cápsulas de semillas y se las colocó en un envase de vidrio, se añadió Povidyn y agua destilada estéril, en proporción 1:5, llenando tres cuartas partes del envase, luego se agitó vigorosamente durante 1 minuto, pasado dicho tiempo se sustrajo el agua del primer lavado en un vaso de precipitación, entonces se realizaron 2 enjuagues de 30 segundos con agua destilada estéril antes del siguiente lavado.

A continuación, se agregó hipoclorito de sodio al 10%, llenando la mitad del envase y agitando durante 7 minutos, posteriormente se realizaron 3 enjuagues más.

El último lavado se realizó con alcohol étílico al 70% durante un lapso de 45 segundos, finalmente se realizaron 2 enjuagues más, y se tapó el envase con las cápsulas, manteniendo las condiciones asépticas se llevó el frasco a otra cámara de flujo con los materiales preparados para la introducción.

### ***Introducción de Semillas de Orquídea***

Cómo preparación para el procedimiento:

- Se autoclavaron pinzas, bisturí y cajas Petri.
- La cámara de flujo laminar se limpió y desinfectó con alcohol al 70%, posterior se activó el UV por 15 minutos previo al inicio de la introducción.
- Se introdujo el film plástico, el mechero, y los insumos autoclavados a la cámara de flujo laminar.
- Se mantuvo una desinfección constante del personal, utilizando equipo de protección personal (EPP) (doble mascarilla, cofia, gafas y mandil) y rociándose las manos y brazos con alcohol constantemente.
- El medio de cultivo ya preparado y gelificado, se roció con alcohol y se introdujo en la cámara de flujo laminar.

El procedimiento de introducción comenzó tomando las semillas desinfectadas del envase y colocándolas en una caja Petri, con ayuda del bisturí se cortaron ambos extremos de las semillas (0.5 cm de cada lado), y se realizaron 2 cortes longitudinales superficiales en caras opuestos, luego con las pinzas se abrieron las cápsulas en dos partes iguales.

Haciendo uso de pinzas, se tomó el contenido de las semillas abiertas, y se lo colocó en varios frascos con medio de germinación, luego se taparon los envases herméticamente con el

film plástico. Después, se colocaron los medios sembrados en la cámara de crecimiento y se vigiló su desarrollo, realizando trasplantes de los protocormos a nuevos medios cuando se notaba un exceso de biomasa en los envases. El proceso de germinación y desarrollo de los explantes, hasta la siguiente etapa de la investigación fue de 4 meses.

### ***Preparación de Medios de Cultivo con Hormonas***

Para la adición de las hormonas, se prepararon con antelación soluciones stock, tomando 10 mg de cada una y aforándolas a 10 ml, siendo luego etiquetadas y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

**Tabla 5.**

*Composición medios de cultivo por litro, para evaluación de hormonas.*

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Medio MS	4.41 g
Sacarosa	25 g
Hormona	De Acuerdo al Tratamiento
pH	5.8
Agar agar	6.5 g

Para la evaluación de las hormonas, se siguió lo indicado en la Tabla 5. Preparando volúmenes de 250 ml de cada tratamiento propuesto en la Tabla 2, y dispensando 50 ml de medio en cada envase, las tapas fueron de aluminio y aseguradas con una liga de caucho de color, diferenciándose así las concentraciones usadas.

Blanco: 0 ppm

Amarillo: 0.5 ppm

Rojo: 1 ppm

Azul: 1.5 ppm

Morado: 2 ppm

### ***Selección de Explantes***

Los explantes fueron seleccionados de acuerdo al tamaño, se tomaron aquellos mayores a 1 cm de longitud, y que no tuvieran desarrollo radicular avanzado, no se realizó discriminación de acuerdo a la especie para mantener el diseño aleatorio.

### ***Trasplante de Orquídeas***

Se prepararon los insumos y equipos cómo se describió anteriormente para mantener el ambiente de esterilidad.

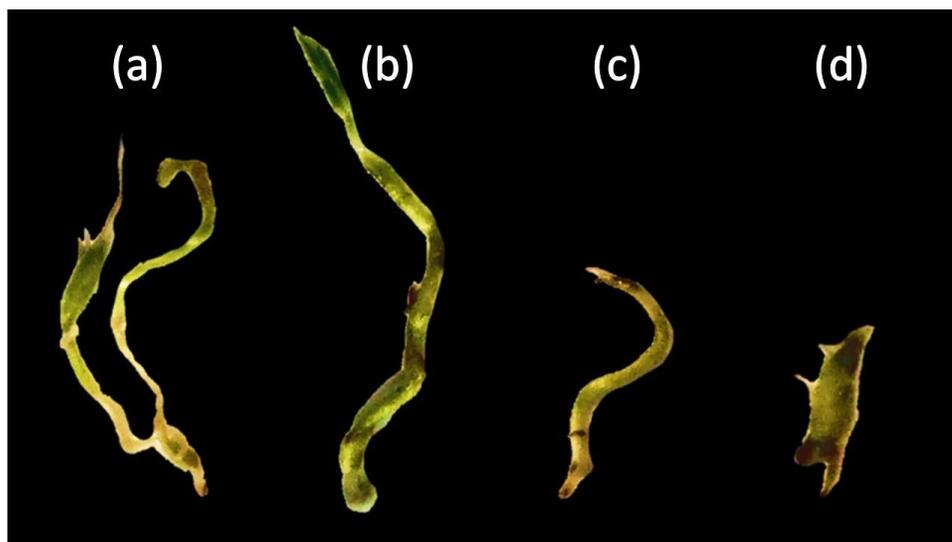
Se extrajeron los explantes en cajas Petri, donde fueron seccionados si tenían una longitud mayor a 2 cm, luego se colocaron en los medios con hormonas, resultando en 2 orquídeas en cada envase.

Se sellaron los envases con film plástico, y se los colocó en la cámara de crecimiento, con fotoperiodo de 11 horas de luz, durante 4 semanas se realizó un seguimiento para evitar contaminaciones.

Los explantes utilizados fueron medidos previamente para su comparación, y se identificaron 4 tipos de explantes (Fig.9.), siendo aquellos que tenían dos o más ápices (a), y los que tenían una longitud mayor a 2 cm (b) seccionados para tener normalidad en los explantes sometidos a los tratamientos, dejándose en una longitud similar a los explantes considerados adecuados (c), también se encontró formación de pseudobulbos (d) que de igual manera fueron utilizados en la presente investigación.

**Figura 9.**

*Explantos seleccionados y utilizados en el proyecto.*



### ***Toma de Datos***

Para la toma de datos, se realizó un trasplante para poder manipular las orquídeas fuera del envase, donde se midieron:

- Número y longitud de raíces generadas
- Número y longitud de brotes generados
- Longitud general de las plantas
- Formación de callos

Posteriormente, se dejaron crecer las orquídeas en medio de enraizamiento, y se las llevó a aclimatación.

### ***Tratamiento de datos***

Los datos fueron tabulados y analizados utilizando los softwares estadísticos IBM SPSS Statistics versión 25 e InfoStat versión 2008.

## Capítulo VI

### Resultados

#### Crecimiento de explantes

Se documentó el crecimiento de los explantes después de 4 semanas en sus respectivos tratamientos.

En los tratamientos con BAP (Fig.10.) se puede observar el crecimiento de acuerdo a las dosis aplicadas, viendo un mayor desarrollo en los tratamientos con fitohormonas.

#### Figura 10.

*Explantes a las 4 semanas de tratamiento con BAP, de izquierda a derecha: 0.5, 1, 1.5, 2 ppm.*



Los tratamientos con Kinetina (Fig.11.) muestran un desarrollo mayor en las plantas conforme se aumenta la dosis de la hormona.

#### Figura 11.

*Explantes a las 4 semanas de tratamiento con Kinetina, de izquierda a derecha: 0.5, 1, 1.5, 2 ppm.*



En cuanto a los explantes con AIA (Fig.12.) también se observaron variaciones en el desarrollo de acuerdo a la concentración de hormona en el medio.

**Figura 12.**

*Explantes a las 4 semanas de tratamiento con AIA, de izquierda a derecha: 0.5, 1, 1.5, 2 ppm.*



Finalmente, los explantes bajo tratamientos de ANA (Fig.13.) también muestran efectos de la hormona sobre su crecimiento.

**Figura 13.**

*Explantes a las 4 semanas de tratamiento con ANA, de izquierda a derecha: 0.5, 1, 1.5, 2 ppm.*



## Numero de raíces

En cuanto al número de raíces generadas, de acuerdo a la Tabla 6 se encontró diferencia significativa entre hormonas, concentración y la interacción entre factores, indicando que la generación de raíces si se ve afectada por ambos factores.

**Tabla 6.**

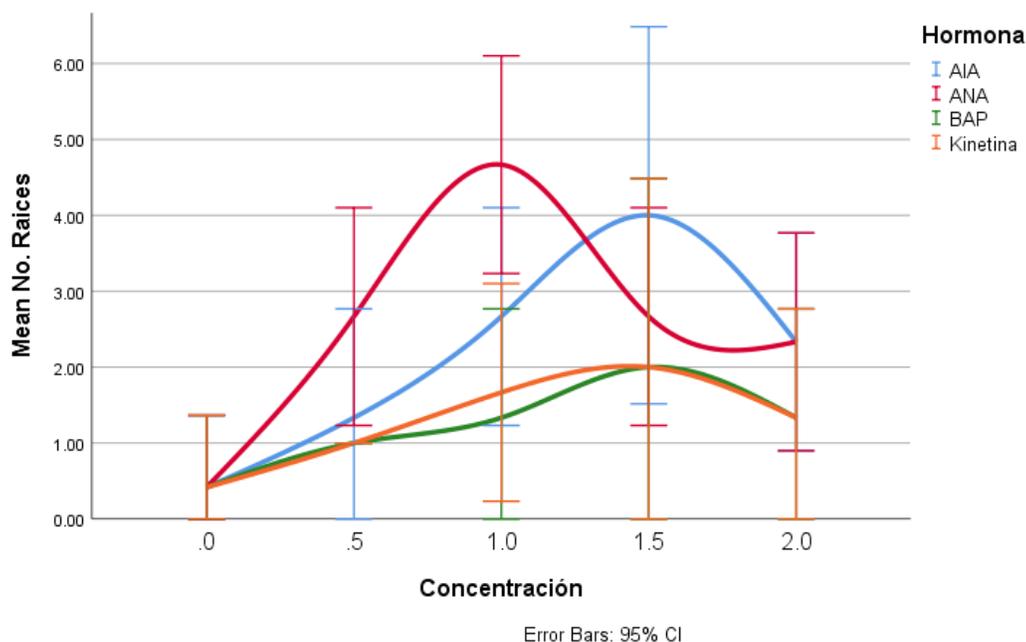
ANOVA Número de raíces.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	74.85	19	3.94	9.09	<0.0001
Hormona	16.98	3	5.66	13.06	<0.0001
Concentración	37.43	4	9.36	21.60	<0.0001
Hormona*Concentración	20.43	12	1.70	3.93	0.0005
Error	17.33	40	0.43		
Total	92.18	59			

En la figura 14 se observa que tanto el ANA cómo el AIA producen mayor cantidad de raíces a comparación de las citoquininas, siendo el mayor pico observable el de ANA a 1 ppm con una generación de raíces de 4.5 unidades.

**Figura 14.**

Número de raíces vs Concentración de hormonas.

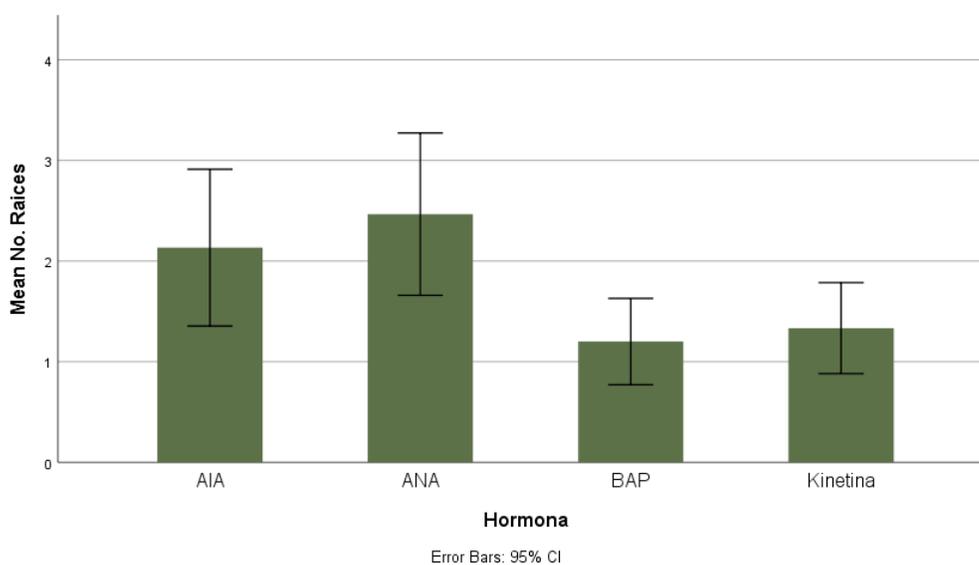


De acuerdo a la prueba de Tukey al 5%, se encontraron 4 grupos homogéneos, sin embargo, destaca el grupo con una media mayor ( $>2.5$  raíces por tratamiento) al resto, y de los cuales AIA a 1.5 ppm y ANA a 1 ppm tuvieron una media mucho mayor ( $>4$  raíces por tratamiento), siendo considerados los tratamientos más efectivos para la formación de raíces.

Entre las hormonas utilizadas, de observó una clara diferencia entre el tipo de hormona, siendo las auxinas las que produjeron más raíces ( $>2$  unidades), mientras que las citoquininas tuvieron una producción baja ( $<1.5$  unidades) cómo se puede apreciar en la Figura 15.

**Figura 15.**

*Número de raíces vs hormonas.*



### Longitud de raíces

De acuerdo a la Tabla 9, se encontró diferencia significativa tanto en hormonas, concentración e interacción entre factores, por lo que se puede indicar que la longitud de raíces se ve afectada por los factores estudiados.

**Tabla 7.**

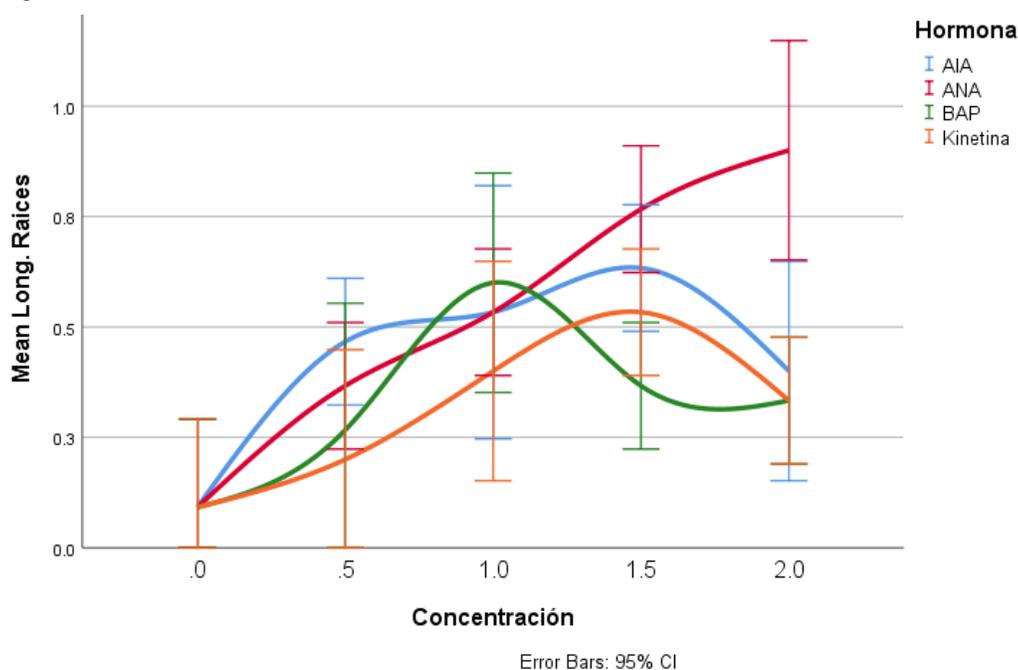
ANOVA Longitud de Raíces.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.98	19	0.16	18.45	<0.0001
Concentración	1.84	4	0.46	54.12	<0.0001
Hormona	0.54	3	0.18	21.18	<0.0001
Concentración*Hormona	0.60	12	0.05	5.88	<0.0001
Error	0.34	40	0.01		
Total	3.32	59			

Respecto a la longitud de las raíces, cómo se observa en la Figura 16, el AIA a 2 ppm tuvo los más altos resultados, mientras que el AIA mostró un buen crecimiento de las raíces hasta llegar a la concentración de 1.5 ppm, igualando al BAP a 1 ppm, mientras que la Kinetina tuvo un pico en 1.5 ppm, con resultados aún por debajo del resto de hormonas.

**Figura 16.**

Longitud de raíces vs Concentración de hormonas.

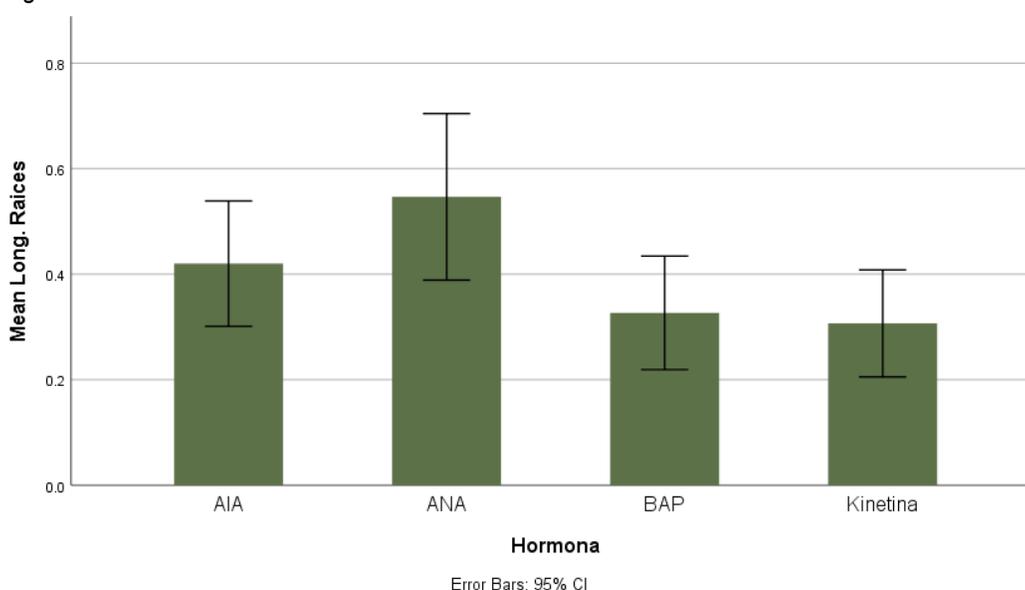


En la prueba de Tukey al 5%, analizando todos los tratamientos se encontró un grupo diferencial, conformado únicamente por auxinas, con un crecimiento de raíz mayor al resto (>0.60 cm por tratamiento) y dentro del cual sobresale el tratamiento de ANA a 2 ppm, llegando a una longitud de raíz promedio de 0.9 cm su evaluación.

Entra las hormonas tratadas, a concordancia con la Figura 17, se determina que las citoquininas tienen un menor desarrollo de raíces, mientras que, de las auxinas, el ANA mostró los mejores resultados para el parámetro estudiado.

**Figura 17.**

*Longitud de raíces vs Hormonas.*



### Número de brotes

En la Tabla 12, se pudo encontrar diferencia significativa en la concentración y la interacción entre factores, sin embargo, muestra que no hay una diferencia significativa ( $>0.05$ ) entre las hormonas, por lo que puede que estas no tengan un efecto directo en la formación de brotes, mientras que las diferencias de concentración si lo tienen.

**Tabla 8.**

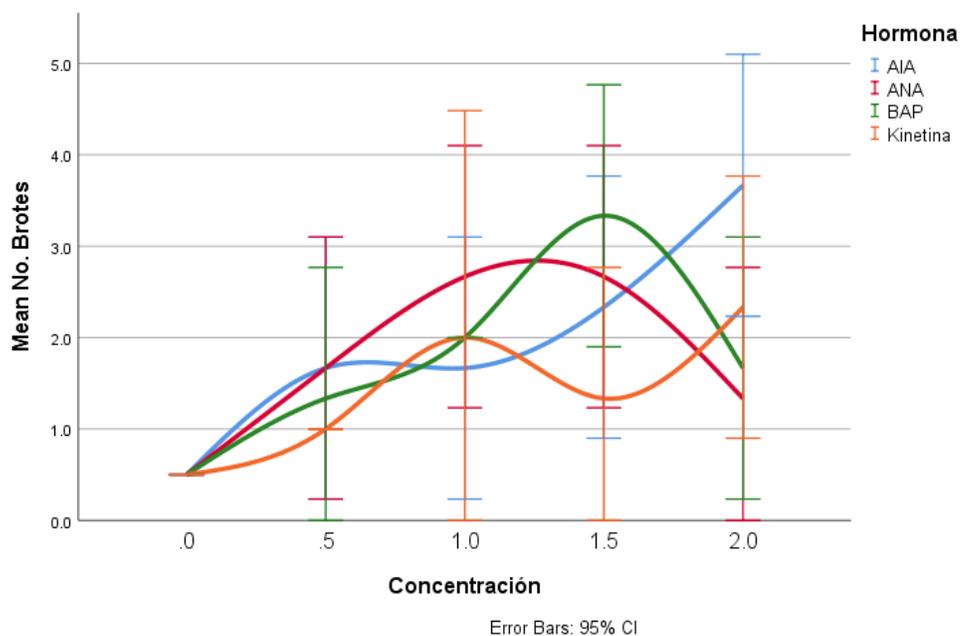
*ANOVA Número de Brotes.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	48.40	19	2.55	6.65	<0.0001
Hormona	2.80	3	0.93	2.43	0.0789
Concentración	29.73	4	7.43	19.39	<0.0001
Hormona*Concentración	15.87	12	1.32	3.45	0.0016
Error	15.33	40	0.38		
Total	63.73	59			

Cómo se observa en la Figura 18, el número de brotes de acuerdo a los tratamientos es similar entre hormonas, aun así, se puede discriminar que el AIA a 2 ppm y el BAP a 1.5 ppm tienen mayor formación de brotes.

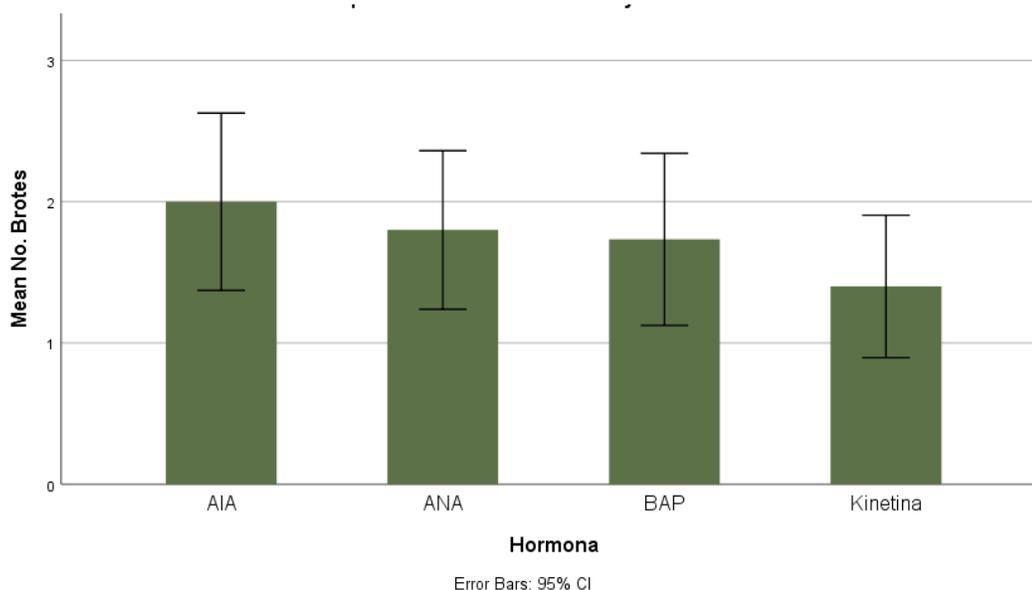
**Figura 18.**

*Número de brotes vs Interacción.*



En la prueba de Tukey al 5%, se encontró un grupo con la mayor formación de brotes (>2 brotes por tratamiento), entre los cuales destacan el BAP 1.5 ppm y el AIA 2 ppm con una media mayor a 3 brotes por tratamiento.

Las hormonas que se utilizaron en este estudio, cómo ya se mencionó y se observa en la Figura 19, no presentaron una diferencia significativa en la formación de brotes, algo que se corroboró con la prueba de Tukey al 5%, que las ubicó dentro del mismo grupo.

**Figura 19.***Número de brotes vs Hormonas.*

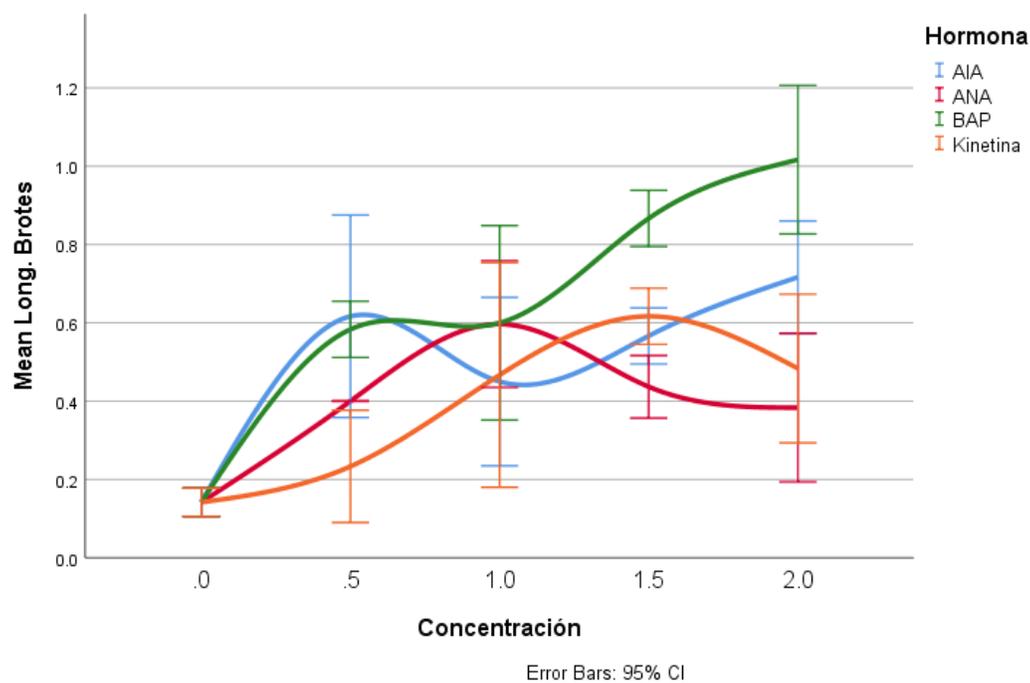
### Longitud de brotes

El análisis de varianza para la longitud de brotes presentado en la Tabla 15 reveló que existe diferencia significativa entre las hormonas, la concentración utilizada y la interacción de estos factores, por lo que se puede discernir que dichos factores e interacción tienen un efecto sobre el desarrollo longitudinal de los brotes de las orquídeas.

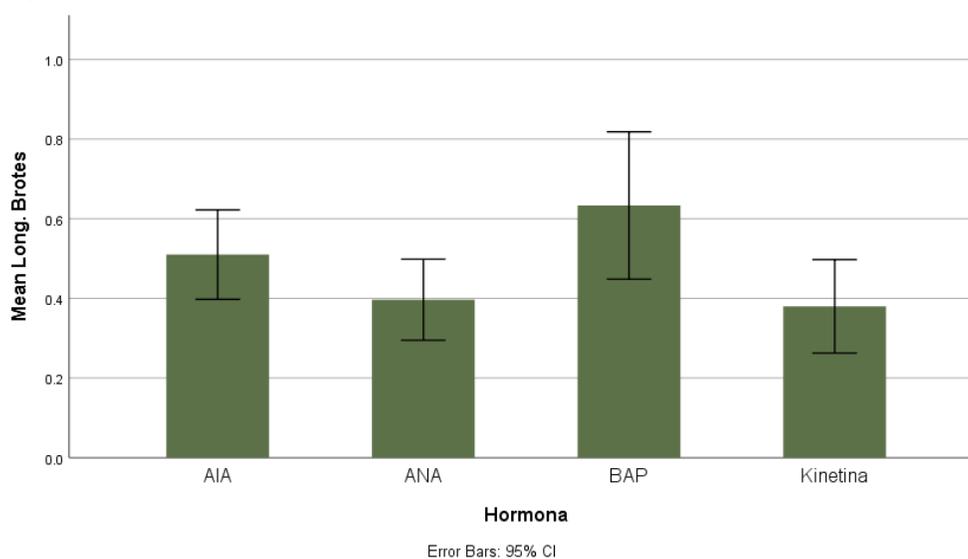
**Tabla 9.***ANOVA Longitud de brotes.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.37	19	0.18	14.30	<0.0001
Hormona	0.62	3	0.21	16.69	<0.0001
Concentración	1.99	4	0.50	40.26	<0.0001
Hormona*Concentración	0.75	12	0.06	5.05	<0.0001
Error	0.50	40	0.01		
Total	3.86	59			

Analizando los tratamientos, se determina de acuerdo a la Figura 20 que el BAP a 2 ppm tuvo el mayor desarrollo longitudinal de brotes, mientras que AIA, ANA y Kinetina tuvieron picos similares a 2ppm, 1 ppm y 1.5 ppm, respectivamente.

**Figura 20.***Longitud de brotes vs Concentración de hormonas.*

En el análisis de los tratamientos por la Prueba de Tukey al 5%, el grupo mayor (>0.7 cm por tratamiento) fue correspondiente al AIA a 2ppm, pero superado por el BAP a 1.5 ppm y 2 ppm sucesivamente.

**Figura 21.***Longitud de brotes vs Hormonas.*

Mientras, en la prueba de Tukey al 5% de las hormonas, se determinó que la Kinetina y ANA fueron los menos efectivos para el crecimiento de los brotes, AIA se encontró en un grupo separado, con una media de longitud de brote de 0.51 cm, y finalmente, BAP con una media de 0.63 cm, siendo por lo tanto la hormona que permite un mayor desarrollo longitudinal de brotes, cómo se evidencia en la Figura 21.

### Longitud de la planta

La longitud final de la planta se vio afectada por la hormona aplicada, la concentración y la interacción entre estos factores, información reflejada en el análisis de varianza que se encuentra en la Tabla 18.

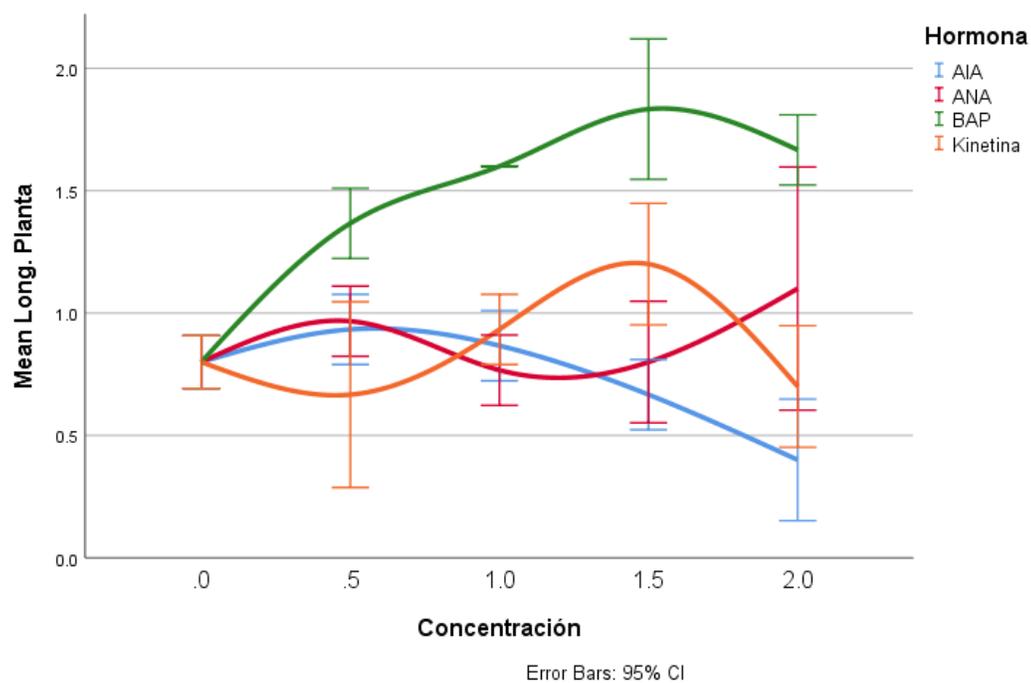
**Tabla 10.**

*ANOVA Longitud de la planta.*

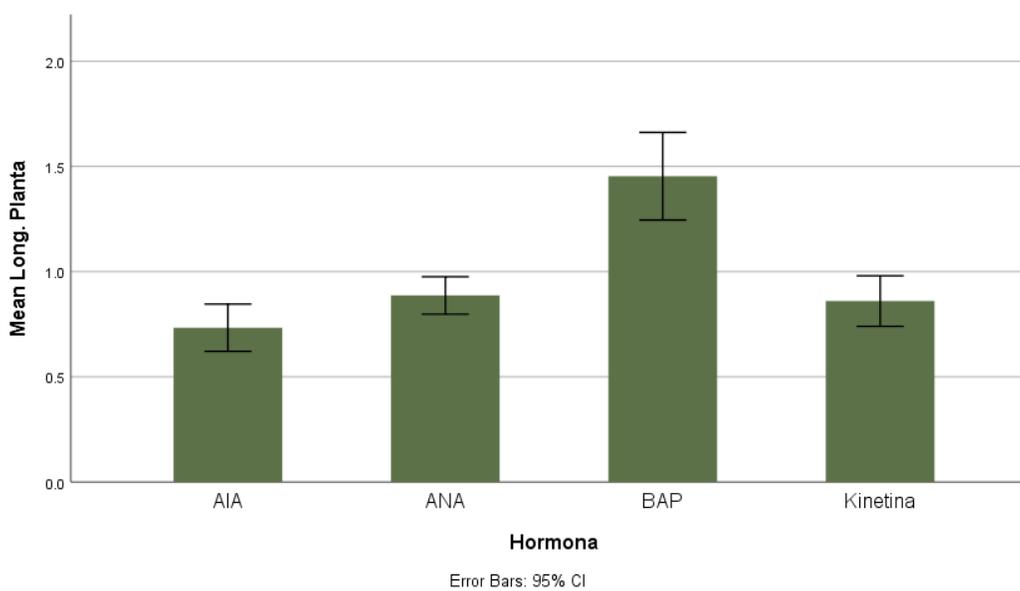
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8.07	19	0.42	56.66	<0.0001
Hormona	5.21	3	1.74	231.73	<0.0001
Concentracion	0.62	4	0.15	20.63	<0.0001
Hormona*Concentracion	2.24	12	0.19	24.90	<0.0001
Error	0.30	40	0.01		
Total	8.37	59			

El análisis de los tratamientos individualmente indica, de acuerdo a la Figura 22, que el BAP promueve un crecimiento mayor en las orquídeas, siendo su concentración a 1.5 ppm la que dio mejores resultados.

La prueba de Tukey al 5% para tratamientos mostró varios grupos homogéneos, donde el de mayores resultados (>1.6 cm por tratamiento) correspondió a varias concentraciones de BAP, recalando la información previa.

**Figura 22.***Longitud de la planta vs Concentración de hormonas.*

Las hormonas también fueron analizadas por la prueba de Tukey al 5%, encontrándose 2 grupos homogéneos y 1 heterogéneo, este último correspondiendo al BAP, con una media total de 1.49 cm de crecimiento longitudinal, hecho comprobable en la Figura 23.

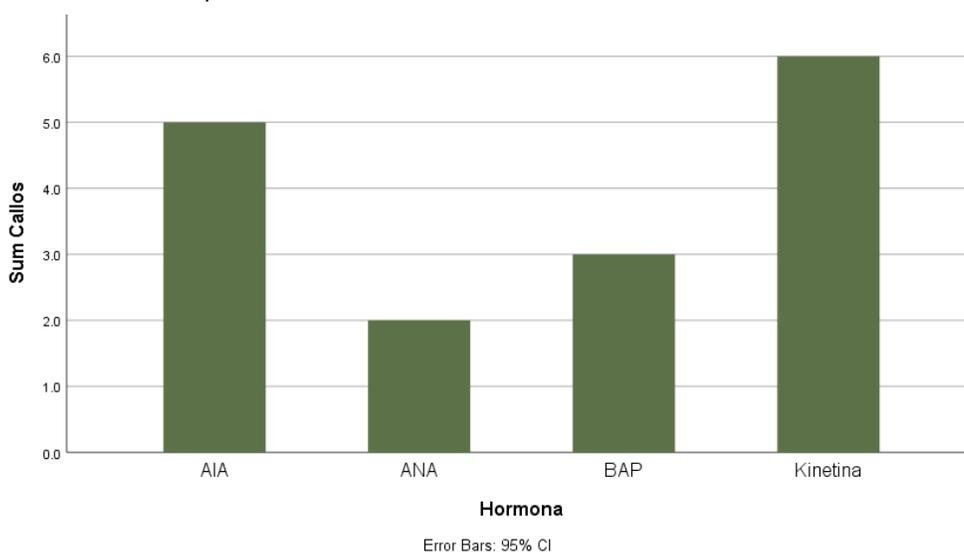
**Figura 23.***Longitud de la planta vs Hormonas.*

## Generación de callos

La presencia de callos en la investigación se analizó de forma cualitativa, únicamente determinando si se formaron o no en los diferentes tratamientos, por lo que se realizó una Prueba de Chi-Cuadrado, resultando que de manera general no existe una diferencia significativa entre las hormonas al momento de la generación de callos, sin embargo, dentro de la Kinetina, se encontró que la concentración de dicha hormona si tenía un efecto sobre la formación de callos.

**Figura 24.**

*Suma total de callos por hormona.*



Cómo se puede observar en la figura 24, la Kinetina tuvo el mayor número de muestras con presencia de callos, teniendo casos positivos en 6 de 15 muestras, siendo la mitad de estos a una concentración de 2 ppm.

## Capítulo V

### Discusión

#### Número y Longitud de Raíces

De acuerdo a diversos autores como Fu et al (2015) y Kozłowski & Pallardy (1997) las hormonas que participan en el desarrollo radicular son las auxinas (AIA y ANA), varias investigaciones se han realizado sobre ello, y particularmente en orquídeas se ha demostrado que los efectos pueden variar entre las especies con las que se trabajan, además de presentar interacción con otras hormonas y factores intrínsecos, como la señalización y transporte de las hormonas por parte de las proteínas. De manera general, se han encontrado resultados positivos en la formación de raíces y rizoma, iniciación radicular, germinación, formación de brotes y dominancia apical.

En la investigación realizada, se determinó que los tratamientos con auxinas han tenido un mayor efecto en la formación de raíces, aunque en ciertas especies, se ha dicho que las auxinas AIA y AIB son las más efectivas, también se ha encontrado efectos positivos del ANA, como en el género *Cymbidium*, donde favorece la formación de rizoma en pseudobulbos. En cuanto al AIA, aunque tiene gran potencial para la formación de raíces, se ve superada por el ANA, lo que puede atribuirse a la facilidad del AIA para interactuar con otras sustancias que pueden inhibir su acción en las plantas, algo que no sucede de manera tan drástica con el ANA, cualidad que se le puede atribuir a su naturaleza sintética. Como mencionan Hew & Clifford (1993) la presencia de citoquininas endógenas puede suprimir la formación de raíces laterales en ciertos géneros, así mismo, presencia de bacterias u hongos que sintetizan AIA de manera natural pueden inhibir la generación de raíces. Las citoquininas por su lado tienen una baja generación de raíces, que concuerda con lo obtenido por Boszó & Barna (2021).

La longitud de raíces también se ve asociada a la presencia de auxinas, pues no solo ayudan a la iniciación radicular, sino también a su crecimiento. En esta variable se observó que todas las hormonas presentaban cierto efecto en la elongación de raíces, por lo que se puede decir que en las citoquininas se dio gracias a la función de división celular. Aunque si bien, el ANA también demostró tener el mayor efecto en el crecimiento de las raíces, lo que concuerda con el estudio de Fu et al (2015) que comprobó un efecto mayor en las raíces a concentración de 3 ppm, que puede incluso presentar mejores resultados con la adición de agua de coco al medio de cultivo. Lo observado lleva a cuestionarse la posible interacción del AIA con otros agentes que inhibieron su efecto, además de la consideración de Novak et al (2014). sobre los efectos del AIA de acuerdo al tipo de tejido en el que trabaja, pudiendo promover la iniciación radicular primaria, lateral y de raíces adventicias, aunque también es de mencionar que tiene un efecto directo en la dominancia apical, que puede inhibir el crecimiento de brotes laterales, por lo que es adecuado determinar que, si bien no tuvo el mayor efecto en desarrollo radicular entre las auxinas tratadas, puede haber participado en el desarrollo longitudinal de la planta.

La concentración tiene un papel importante en la planta, por el mecanismo de transporte de las hormonas, es por ello que en ANA la mayor formación de raíces se encuentra a 1 ppm, mientras que la mayor longitud de raíces está a 2ppm, lo que demuestra lo mencionado por Hartati et al (2017) y Aslam et al (2010), si bien las hormonas participan en varios procesos de la planta, no lo hacen de la misma manera todo el tiempo y que la presencia de la hormona será dirigida por la planta de acuerdo a sus necesidades y la naturaleza de los tejidos. El AIA, tuvo su mayor efecto para ambos factores medidos a una concentración de 1.5 ppm, lo que implica una participación activa en la iniciación y desarrollo radicular en dicho tratamiento.

### **Número y Longitud de Brotes**

La formación de brotes puede verse afectada por diversas hormonas, pues se sabe que las auxinas también pueden participar en la diferenciación celular, mientras que las citoquininas

tienen efectos sobre la división celular. Todas las hormonas que se utilizaron tuvieron resultados similares a cierta concentración, lo que de acuerdo a Saravia et al (2022) puede verse este efecto en las auxinas, ya que favorecen la formación de brotes laterales, el AIA a 2 ppm tuvo un mayor efecto que el ANA a 1 y 1.5 ppm debido a su participación baja en el desarrollo radicular. En cuanto a las citoquininas, el BAP tuvo mejores efectos en la formación de brotes a 1.5 ppm, algo que concuerda con Royani et al (2021) que demostró que, a concentraciones altas, se reduce el número y longitud de brotes generados.

Lo mencionado se evidencia al revisar la longitud de los brotes generados, pues el BAP a 2 ppm tuvo los mejores resultados, aunque cómo expresó Royani et al (2021) En su investigación, el BAP y la Kinetina no deberían tener mucha diferencia en la formación de brotes, pero se encontró que su eficiencia fue similar a las auxinas. Esto se puede atribuir a la concentración de la Kinetina, puede ser muy baja, puesto que a la concentración mayor estudiada se mostró su mejor efecto, lo que implica que una dosis más alta puede presentar mayores resultados. Al igual que el resto de hormonas, la Kinetina puede interactuar con otras sustancias que inhiban su acción en la planta, además de tener funciones de acuerdo al tejido al que ha sido aplicado.

### **Longitud de la Planta**

La longitud de la planta se vio afectada por el crecimiento apical y radicular de los explantes, por ello en esta investigación se encontró que el mejor desarrollo lo provocó el BAP, teniendo mejores resultados a todas las concentraciones observadas, esto debido a su función en la división celular, tal como mencionan Bing et al (2020) y Amelia et al (2020). Por otro lado, la Kinetina, tuvo buenos efectos a 1.5 ppm, algo que se espera por ser una citoquinina.

Las auxinas también tuvieron un efecto en la longitud de la planta, el ANA de mayor manera, que puede ser atribuido a la longitud de las raíces estudiado previamente, en cambio el AIA, demostró tener un efecto bajo en la elongación de la planta a dosis más altas, algo que

se ha demostrado previamente con otras auxinas, que a mayor concentración tienen una acción herbicida. De acuerdo a Fu et al. (2015) y Novak et al (2014) la adición de auxinas en el medio también puede promover el desarrollo de hojas, algo que no se observó en las orquídeas estudiadas, que puede conferirse a la naturaleza de las plantas, debido a que tienen cuidados especiales que, en su ausencia, pueden haber retrasado el crecimiento foliar, y si bien en ciertos explantes se observó la formación de hojas, fueron estas muy delgadas.

### **Formación de Callos**

En esta variable medida, se encontró el mayor número de tratamientos con presencia de callos en aquellos que tenían Kinetina, especialmente a concentración alta, además, con AIA a 1y 1.5 ppm también se encontró incidencia en la formación de callos, esto va de acuerdo a lo mencionado por Dar et al (2021) que mostró la formación de callos y callos embrionarios en presencia de auxinas y citoquininas. Si bien la interacción entre los dos tipos de hormonas tiene mejores resultados, estas deben mantener una ratio moderada, ya que el aumento de concentración de una hormona por encima de otra puede resultar en el desarrollo de raíces o brotes.

Cómo mencionan Dar et al (2021) y ,Boszó & Barna (2021) las citoquininas han sido documentadas cómo promotoras para la formación de callos, debido a que debilita la lignificación de la pared celular. Estas aglomeraciones se encuentran inicialmente en la zona que está en contacto con el medio de cultivo y eventualmente cubren toda la planta, y cómo se mencionó, la concentración de hormonas tiene un papel fundamental en la inducción de callos, a bajas concentraciones no hay mucho efecto, y si son demasiado altas tienen un efecto inhibitorio.

## Capítulo VI

### Observaciones Finales

#### Conclusiones

La primera etapa del cultivo *in vitro* es el establecimiento de los explantes en el medio, la cual presenta varias dificultades como la contaminación y oxidación de explantes, que son las principales causantes de la pérdida de explantes. Por ello, en la presente investigación se analizaron las especies a utilizar, con el fin de realizar una correcta introducción de las semillas. Estas últimas, al estar contenidas en cápsulas, no tuvieron mayor problema en la desinfección, pues al estar protegidas por esta estructura, el material interno podría sobrevivir fácilmente a la aplicación de químicos fuertes en el proceso de lavado, que se realizó con Povidyn, hipoclorito de sodio al 10% y etanol al 70%.

La formulación y preparación de los medios de cultivo también fue una consideración para este trabajo, sin embargo, se optó por utilizar el medio MS ya preparado, y teniendo claro las necesidades de las orquídeas para su germinación, se agregó sacarosa para que dichas semillas tengan una fuente de energía, y por experimentación previa, la glicina se agregó al medio debido a la oxidación que se provocaba al cabo de un par de semanas, el pH fue determinado de acuerdo a literatura sobre el crecimiento de orquídeas, y el Agar agar se agregó tomando un estándar de 7 g/l.

Las hormonas que se estudiaron tenían funciones similares y complementarias, por lo que se puede determinar que el regulador de crecimiento y su concentración dependerá del objetivo del cultivo, y cómo ya se ha mencionado varias veces en el trabajo, de la especie con la que se esté trabajando.

Para los géneros tomados en esta investigación, ha sido considerado que las hormonas y dosis ideales para la formación y desarrollo de raíces son: ANA a 1 ppm para la formación de

raíces únicamente, ya que, al estar en un proceso de multiplicación, el crecimiento longitudinal radicular podría ser inducido en fase de enraizamiento, donde dosis de ANA a 2 ppm podrían ser muy útiles. Sin embargo, la adición de AIA a 1.5 ppm debe ser tomada en cuenta, pues si bien no tiene el mayor efecto en la iniciación y desarrollo, a dicha concentración tiene un buen efecto en ambas variables, lo que convendría para un enraizamiento más rápido. Sobre las citoquininas, cómo se sabe, tienen un efecto inhibitorio sobre las raíces, por lo que para generar raíces nuevas es poco recomendable usarlas, y el crecimiento longitudinal de las raíces se debe a la elongación celular de dichas hormonas.

La generación de brotes puede ocasionarse tanto por auxinas cómo por citoquininas, entre las cuales el AIA a 2 ppm y el BAP a 1.5 ppm tienen mejores resultados, por encima apenas del ANA a 1 o 1.5 ppm, por lo que si se necesita promover la formación de brotes laterales dichas dosis de hormonas pueden ser ideales. Sin embargo, se debe considerar que la longitud de brotes también presenta variaciones de acuerdo al tratamiento, siendo así que, en caso de buscar elongación, el BAP es la hormona más adecuada, a una concentración de 1.5 ppm puede inducir la formación y el crecimiento de los brotes. El AIA por su parte, tiene una menor elongación de brotes, similar al ANA y la Kinetina, por lo que no habría diferencia entre estas hormonas. En la etapa de multiplicación, si se tiene como objetivo generar brotes para escisiones posteriores, el uso de BAP a 1.5 ppm es óptimo.

Al analizarse la longitud de la planta, se encontró que el BAP tuvo los mejores resultados de lejos, con un pico en 1.5 ppm, va de la mano con lo ya estipulado, siendo este tratamiento el mejor para la etapa de multiplicación en caso de necesitar brotes grandes y crecimiento longitudinal de la planta, lo cual es ideal para cierto tipo de orquídeas con tallo monopodial, y en orquídeas simpodiales favorecería el crecimiento lateral también.

La formación de callos también debe ser considerada, pues su utilidad para generar gran cantidad de plantas es muy beneficiosa, teniendo en cuenta que esto puede ocasionar

cambios entre las plantas hijas y la planta madre. Para ello, se ha determinado que la adición de Kinetina y AIA a concentraciones moderadas tiene buenos efectos para la callogénesis. Así que, en caso de buscar dicho fenómeno en los explantes, los mejores tratamientos corresponderían a Kinetina a 2 ppm, y AIA a 1 y 1.5 ppm.

En conjunto, las diversas hormonas tratadas tienen funciones en la fase de multiplicación que confieren buenos resultados, y su aplicación dependerá del objetivo de la multiplicación, pues si se busca micropropagación clonal, el BAP tiene muy buena acogida por su facilidad de generar brotes y promover el crecimiento de la planta. Así mismo, si el objetivo es obtener una gran cantidad de células para su posterior crecimiento o multiplicación, la formación de callos que induce la Kinetina o el AIA son de mucha utilidad. Y si en la fase de multiplicación, se busca un crecimiento de la planta para su posterior enraizamiento, el AIA demostró ser ideal por su generación de raíces y crecimiento moderado de la planta. El ANA, puede ser utilizado de igual manera en la multiplicación, por generar raíz y pocos brotes, y complementado en desarrollo radicular en la fase de enraizamiento, donde se consideran están sus mayores efectos.

Si bien se ha mencionado el efecto de las hormonas por separado, la mayoría de investigaciones y aplicaciones son con la adición de 2 o más reguladores de crecimiento, que de acuerdo a la literatura, presentan interacciones entre sí, es por ello que el presente trabajo se limita a mencionar los tratamientos óptimos por hormona, y no se hace énfasis alguno en los efectos que pueden tener juntos, ya que factores ambientales, tipos de explante, dosis, presencia de patógenos y especie van a tener influencia directa en los resultados, pudiendo ser que dosis óptimas por sí solas, sean inhibitorias en presencia de otras hormonas.

### **Recomendaciones**

Al tratarse de un cultivo *in vitro*, la principal precaución que se debe tener es la contaminación, pues puede arruinar todo un cultivo si se propaga de manera incontrolable, por

lo que siempre se debe mantener el ambiente de asepsia previo y posterior a cada proceso, además de mantener orden y limpieza en las instalaciones, especialmente en las áreas donde los explantes se mantendrán para su crecimiento.

Las consideraciones para el desarrollo de las plantas, cómo se ha mencionado, van de acuerdo a la especie con la que se trabaja, por lo que la experimentación e investigación permitirán optimizar el proceso del cultivo *in vitro*, y no se debe considerar cómo adecuados los tratamientos aplicados a otras especies hasta su debida comprobación.

Los medios de cultivo pueden ser modificados, no solamente en pH, agar, sacarosa, sino también en la composición nutricional para la planta, ya sean vitaminas o macro o micronutrientes, para ello, la preparación de stocks específicos podría mejorar la producción de orquídeas a través de la micropropagación.

Las fases de las plantas también tienen un efecto sobre las hormonas y sus funciones fisiológicas, ocasionando que puedan promover o inhibir ciertos procesos, por lo que la aplicación de dichas sustancias debe ir acompañada de las debidas consideraciones, cómo tipo de hormona, tipo de explante, dosis aplicada, objetivo establecido, contaminación, condiciones ambientales, estancia del explante y especie.

Investigaciones posteriores podrían complementar la información establecida en este trabajo, controlando otros factores del crecimiento *in vitro*, evaluando otras hormonas vegetales, tomando otro tipo de explantes, con especies particulares de orquídeas, y las interacciones de hormonas con otras de su tipo y factores externos.

## Bibliografía

- Amelia, Z., & Wulandari, A. (2020). Effect of 6-BAP application on shoot production of *Melealeuca alternifolia*. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 528 012063.
- Aslam, M., Ahmad, E., Saguu, A., Hussain, K., Ayaz, M., Ullah, I., . . . Himayatullah. (2010). Effect of plant growth regulator (NAA) and available soil moisture depletions on yield and yield components of chickpea. *Sarhad Journal of Agriculture*, 26, 325-335.
- Bing, H., Than, D., Vinh, T., Hoi, Q., Cong, V., & Van Duy, N. (2020). In vitro propagation of the new orchid *Dendrobium trankimianum* T. Yukawa. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 16, 649-657. doi:10.15625/1811-4989/16/4/11155.
- Bozsó, Z., & Berna, B. (2021). Diverse effect of two cytokinins, kinetin and benzyladenine, on plant development, biotic stress tolerance, and gene expression. *Life*, 11(12), 1404. doi:https://doi.org/10.3390/life11121404
- Burnett, H. (1957). *Orchid Diseases*. Gainesville, Florida: State Plant Board Of Florid.
- Chemical Book. (s.f.). *Indole-3-acetic acid*. Obtenido de Chemical Book: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8783347.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8783347.htm)
- Dar, S., Nawchoo, I., Tyub, S., & Kamili, A. (2021). Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. *Biotechnology reports*, 32. doi:https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00688
- Delgado, D. (2019). *Evaluación de germinación y desarrollo de dos especies del género Epidendrum (Orchidaceae)*. Universidad Militar Nueva Granada, Cundinamarca, Colombia. Obtenido de <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/35949/DelgadoCastroDianaPaola2019.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

- Díaz, J. (05 de enero de 2008). *La Flor de las Orquídeas*. Obtenido de Granada Natural:  
[https://granadanatural.com/blog.php?pag=2&&codigo\\_blog\\_categoria=1](https://granadanatural.com/blog.php?pag=2&&codigo_blog_categoria=1)
- Frowine, S. (s.f.). *Two Four Six Eight Let your Orchids propagate*. Obtenido de What When How: <https://what-when-how.com/orchids/two-four-six-eight-let-your-orchids-propagate-multiplying-your-orchids/>
- Fu, S., Wei, J., Chen, H., Liu, Y., Lu, H., & Chou, J. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant signaling & behavior*, 10, 8. doi:<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Fullaway, D. (04 de noviembre de 1937). Orchid Insects. *Board of Agriculture and Forestry*.  
Obtenido de  
<https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/server/api/core/bitstreams/eaef0e1d-2a1b-437c-bc4e-c01371d0e003/content>
- Gamborg, O., Murashige, T., Thorpe, T., & Vasil, I. (1976). Plant Tissue culture media. *In Vitro Cell.DEV.Biol.-Plant*, 12, 473-478. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02796489>
- Hamayun, M., Hussain, A., Khan, S., Irshad, M., Khan, A., Waqas, M., & Lee, I. (2015). Kinetin modulates physio-hormonal attributes and isoflavone contents of Soybean grown under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 6. doi:[doi:doi:10.3389/fpls.2015.00377](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00377)
- Haque, I., Kumar, P., Ghuge, S., Kumar, A., Chandra, A., Kumar, A., & Modi, A. (2022). A general introduction to and background of plant tissue culture: Past, current, and future aspects. En *Advances in Plant Tissue Culture* (págs. 1-30). Academic Press.  
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00019-9>
- Hartati, S., Arniputri, R., Soliah, L., & Cahyono, O. (2017). Effects of organic additives and naphthalene acetic acid (NAA) application on the in vitro growth of Black orchid hybrid (coelogyne pandurata Lindley). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23, 951-957.

- Hew, C., & Clifford, P. (1993). Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. *Plant Growth Regulation*, 13, 231-239. doi:doi:10.1007/bf00024843
- Johnston, E. (28 de febrero de 2022). *Exploring the orchid family tree*. Obtenido de Kew Royal Botanic Gardens: <https://www.kew.org/read-and-watch/orchid-family-tree#:~:text=Around%2028%2C000%20species%20of%20orchids,groups%2C%20each%20called%20a%20genus>
- Kanta, K., Rangaswamy, N., & Maheshwari, P. (1962). Test-tube fertilizing in flowering plants. *Nature*, 194, 1214-1217.
- Khandaker, M., Rasdi, M., Naeimah, N., & Mat, N. (2017). Effects of naphthalene acetic acid (NAA) on the plant growth and sugars effects on the cut flowers Mokara chark kuan orchid. *Bioscience Journal*, 33, 19-30. doi:<https://doi.org/10.14393/BJ-v33n1a2017-34908>
- Kozłowski, T., & Pallardy, S. (1997). Plant hormones and other endogenous growth regulators. *Physiology of Woody Plants*, 309-319. doi:doi:10.1016/b978-012424162-6/50030-2
- Morel, G. (1960). Producing virus-free cymbidium. *American Orchid Society Bulletin*, 29, 495-497.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Novak, S., Luna, L., & Gamage, R. (2014). Role of auxin in orchid development. *Plant signaling & behavior*, 9. doi:<https://doi.org/10.4161/psb.32169>
- Podwyszaynska, M. (2003). CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE | Rooting of Micropropagated Shoots. *Encyclopedia of Rose Science*, 66-76. doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00127-0>

- Royani, J., Chotimah, S., Utami, R., Fatma, W., Susiyanti, & Fatmawaty, A. (2021). Effect of Benzilaminopurine and kinetin for shoot multiplication of Indigofera (Indigofera zollingeriana Miq.) by in vitro culture. *IOP. Conf. Ser.: Earth Environ. Sci* 637 012053. doi:10.1088/1755-1315/637/1/012053
- Sagawa, Y. (1984). Clonal Propagation: Orchids. *Laboratory Procedures and Their Applications*, 61-67. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715001-7.50015-9>
- Sakakibara, H. (2005). Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitamins & Hormones*, 271-287. doi:doi:10.1016/s0083-6729(05)72008-2
- Saravia C, G., Tapia, L., & Borjas, R. (2022). Auxins and Cytokinins elicit a differentiated response in the formation of shoots and roots in *Cattleya maxima* Lindl and *Phalaenopsis amabilis* (L) Blume. *Scientia Agropecuaria*, 13, 63-69. doi:<https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.006>
- Sheehan, T. (1992). Orchids. *Introduction to Floriculture*, 113-142. doi:doi:10.1016/b978-0-12-437651-9.50010-5
- Singh, A. (10 de noviembre de 2022). *Historical Timeline of Tissue Culture*. Obtenido de Plant Cell Technology: <https://www.plantcelltechnology.com/bloghistorical-timeline-of-tissue-culture/>
- Smith, R. (1992). In Vitro Propagation for Commercial Production of Ornamentals. *Plant Tissue Culture*, 99-125. doi:doi:10.1016/b978-0-12-650340-1.50015-8
- Thorpe, T. (2013). History of plant tissue culture. *Plant Tissue Culture*, 1-22. doi:doi:10.1016/b978-0-12-415920-4.00001-3
- Uchendu, E., Shukla, M., Reed, B., Brown, D., & Saxena, P. (2011). Improvement of Ginseng by In Vitro Culture. *Comprehensive Biotechnology*, 317-329.

White, P., & Braun, A. (1941). Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science*, 94, 239-241. doi:10.1126/science.94.2436.239

Yan, H., Yang, Z., Chen, S., & Wu, J. (2023). Exploration and development of artificially synthesized plant growth regulators. *Advanced Agrochem*. doi:https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.07.008.

Yu, H., Yang, L., Long, H., Su, X., Wang, Y., Xing, Q., . . . Chen, L. (2022). Strigolactone signaling complex formation in yeast: A paradigm for studying hormone-induced receptor interaction with multiple downstream protein. *Methods in Enzymology*, 674, 519-541. doi:https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.05.006.