

EVALUACIÓN DEL ENRAIZAMIENTO *in vitro* Y ACLIMATACIÓN DE
PLÁNTULAS DE LA ORQUÍDEA *Epidendrum ibaguense*.

CLARET ANTONIO VASCO AVILA.

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
TECNOLOGÍA EN GESTIÓN Y PRODUCCIÓN HORTÍCOLA
CAJICÁ CUNDINAMARCA
2020

EVALUACIÓN DEL ENRAIZAMIENTO *in vitro* Y ACLIMATACIÓN DE
PLÁNTULAS DE LA ORQUÍDEA *Epidendrum ibaguense*.

CLARET ANTONIO VASCO AVILA.

Trabajo de grado en la modalidad de Proyecto de Experimentación presentado
como requisito para optar al título de Tecnólogo en Gestión y Producción
Hortícola.

Directora
Diana Constanza Gómez.

CAJICÁ
UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
2020

“PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SIN LA AUTORIZACIÓN EXPRESA DEL
AUTOR(ES)”.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Inducciones totales de raíces con regulador de crecimiento ANA..	15
Gráfica 2: Brotes de raíces totales a través del tiempo por cada concentración de la hormona ANA.....	16
Gráfica 3. N° de raíces totales por tratamiento con regulador de crecimiento ANA	16
Gráfica 4: Inducciones totales de raíces con regulador de crecimiento IBA. ..	17
Gráfica 5: Brotes de raíces totales a través del tiempo por cada concentración de la hormona IBA.	17
Gráfica 6: N° de raíces totales por tratamiento con regulador de crecimiento IBA	18
Gráfica 7: Inducciones totales de raíces con regulador de crecimiento AIA. ..	19
Gráfica 8: N° de raíces totales a través del tiempo por cada concentración de la hormona AIA.	19
Gráfica 9: N° de raíces totales por tratamiento con regulador de crecimiento AIA	20
Gráfica 10: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Turba 1:1. Días de aclimatación de las plántulas durante 40 días con un porcentaje de supervivencia de 80%.	21
Gráfica 11: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Turba: Compost. 1:1:0, 2 Se obtuvieron resultados de 70% de supervivencia de las plantas en ex vitro.	22
Gráfica 12: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Turba: Compost. 1:1:0,5 Se obtuvieron resultados de 64% de supervivencia de las plantas en ex vitro.	22
Gráfica 13: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Cascarilla de arroz quemada. 1:1 En el eje X se observan los días de adaptación de las orquídeas E. ibaguense teniendo una mortalidad con un promedio de 10 plántulas cada 5 días.	23

SIGLAS.

ANA: Ácido Naftalenacético.

IBA: Ácido Indolbutírico.

AIA: Ácido indol-3-acético.

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. MARCO DE REFERENCIA	7
3.2. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	9
3.3. Cultivo <i>in vitro</i> en orquídeas.....	9
3.4. Hormonas.....	10
3.5. Reguladores de crecimiento.....	11
3.6. Auxinas.....	11
4. Objetivo General.....	11
5. METODOLOGÍA.....	12
5.1 Material vegetal	12
5.2. Inducción de raíces <i>in vitro</i>	12
5.3. Evaluación de sustratos en endurecimiento.....	12
6. RESULTADOS y discusión.....	13
6.1. Inducción de raíces <i>in vitro</i>	13
6. 2. Regulador de crecimiento ANA.....	14
6. 3 Regulador de crecimiento IBA.....	17
6.4. Regulador de crecimiento AIA (ácido indol-3-acético).....	18
6.5. Regulador de crecimiento 2,4-D.....	20
7. Evaluación de sustratos en endurecimiento.....	21
8. CONCLUSIONES	23
9. BIBLIOGRAFIA.....	25

1. RESUMEN.

La orquídea *Epidendrum ibaguense* es una especie endémica de Colombia la cual se encuentra en peligro de extinción, debido a su extracción ilegal y la pérdida de hábitat de la especie. La técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta para la propagación de especies, donde puede mejorarse la eficacia de la germinación, el crecimiento y desarrollo con fines de investigación y conservación. En este trabajo, se determinó el regulador de crecimiento más apropiado para inducir la formación de raíces en *E. ibaguense* cultivado *in vitro*. Para esto se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento ANA, IBA, AIA, 2,4-D. El regulador que produjo la mayor inducción de raíces fue ANA en concentraciones de 1.0 5.0 y .0 2 mgL⁻¹, seguido de IBA en concentración de 1.0 mgL⁻¹. Adicionalmente, se evaluó el efecto de cuatro mezclas de sustratos en el desarrollo de estas plántulas sin raíz. Las mezclas fueron: fibra de coco: turba 1:1, fibra de coco: turba: compost 1:1: 0,2, fibra de coco: turba: compost 1:1: 0,5, fibra de coco: cascarilla de arroz quemada 1:1. Se obtuvo 80% de sobrevivencia de las plántulas sembradas en su fase de endurecimiento con la mezcla fibra de coco: turba 1:1.

Palabras clave: hormonas vegetales, micropropagación, orquideaceae, cultivo *in vitro*.

2. INTRODUCCIÓN.

Colombia es catalogada como uno de los países más diversos en flora silvestre y el mayor exportador en el mundo de orquídeas, con un aumento en sus exportaciones del 14,1% en el año 2018 (Jiménez H, 2018). El país cuenta con 4.270 especies distribuidas en todo el territorio, una de las regiones que más especies de orquídeas posee es la región andina con 78% de especies endémicas. Entre los géneros que ocurren en Cundinamarca, se encuentra *Epidendrum* representado por 527 especies (Plan-orquídeas 2015).

Actualmente se enfrenta la pérdida de especies por factores inducidos por el ser humano, como la tala de bosques, agricultura, ganadería y la extracción ilegal de

plantas de su hábitat, los llamados materos (Castellanos y Castro, 2018). Además, las orquídeas presentan factores intrínsecos que limitan su propagación sexual relacionada con el tamaño de su semilla y la poca reserva de alimento, lo cual la obliga a establecer asociaciones micorrízicas para lograr desarrollarse (Pérez et al, 2016).

La conservación de especies endémicas de Colombia ha sido objeto de diferentes estudios, los cuales incluyen la propagación masiva de plantas de orquídeas evaluando técnicas *in vitro* en especies como *Cattleya trianae* (flor nacional), *Comparettia macroplectron*, *Oncidium alexandrae*, *Oncidium bifolium* “pétalos amarillos”, *Oncidium bifolium* var. “federal”, *Oncidium longicornu*, *Oncidium luteopurpúream* y *Oncidium ornithorhynchum*, *Phalaenopsis* sp, resultando en un alto éxito en propagación a partir de la germinación de semilla en *in vitro* (Salazar et al, 2013; Billard et al, 2014; Castellanos y Castro, 2018).

Sin embargo, sobre *Epidendrum* se encuentran pocos estudios de propagación *in vitro*. Los estudios que se han reportado se concentran en la de germinación de semillas e incluyen propagación exitosa de las especies *Epidendrum chioneum*, *E. noturnum*, *E. oxisealum*, *E. radicans*, *E. viviparum*, además para las especies *Cirtochilum revolutum* y *Oncidium pyramidale* (Ávila et al, 2006; Pérez et al, 2016; Hunhoff et al, 2017)

Entre el grupo INQUIBIO y Programa Tecnología en Gestión y Producción Hortícola de la UMNG se han desarrollado investigaciones en la especie *E. ibaguense* induciendo la germinación de semillas maduras e inmaduras bajo condiciones de cultivo *in vitro*, alcanzando porcentajes mayores al 90% de germinación, sin embargo las plantas obtenidas no desarrollan raíz.

Las plántulas de orquídeas para asegurar una alta supervivencia, deben lograr una etapa de crecimiento con un número apropiado de follaje y sistema radicular, considerando el número de raíces y longitud (Díaz et al, 2010). El enraizamiento exitoso de los brotes, y el número de raíces por brote, son los factores clave para climatización de las plántulas. El enraizamiento *in vitro* es un paso crítico en la micropropagación de orquídeas, por ello la optimización del desarrollo y condiciones

de enraizamiento facilitará la producción de un mayor número de raíces y plántulas saludables que tendrán una mayor supervivencia al transferirlas a condiciones *ex vitro* (George y Debergh, 2008. citado por Hassan et al, 2015)

En orquídeas se reporta inducción de raíces en condiciones *in vitro* utilizando hormonas como ANA/IBA, ANA/GA₃, ANA/BA/GA₃ en diferentes concentraciones dentro de rangos que van desde 0.1 hasta 10mg L⁻¹. Se ha comprobado que la adición de auxinas, en la mezcla de ANA/GA₃, promueve la generación de raíces con velamen (Ávila et al, 2006). Mohanty et al, 2012, reportaron que la auxina más efectiva promoviendo el enraizamiento en *Cymbidium mastersii*, fue IBA en una concentración de 10 µM (Mohanty et al, 2012). Por su parte, Coello et al, 2010 encontraron que para la propagación *in vitro* de *Oroxylum indicum*, el uso de MS complementado con 8,87 µM de 6-BA y 2,85 µM de ácido indol-3-acético AIA produjo los resultados más deseables (Coello et al, 2010).

Con base en lo anterior, este trabajo tuvo el propósito de evaluar el efecto de reguladores de crecimiento para lograr inducir el desarrollo de raíz en plántulas de *E. ibaguense*. Adicionalmente, evaluar la fase de endurecimiento utilizando diferentes mezclas de sustratos, estimando el porcentaje de supervivencia de las plántulas en invernadero.

3. MARCO DE REFERENCIA

El estudio de las orquídeas en Colombia comenzó a finales del siglo XVIII y el siglo XIX con la expedición botánica, liderada por José Celestino Mutis y otros exploradores europeos. Gracias a su trabajo, al inicio del siglo XX ya se contaba con la descripción de 1000 especies de orquídeas en el país, destacándose a nivel mundial por su tamaño de flor, sus diversos colores y formas (Castelanos y Castro, 2018).

3.1. *Epidendrum ibaguense.*

Las orquídeas son un grupo de plantas que poseen características morfológicas únicas del reino vegetal. En cuanto a su morfología, su raíz presenta una capa blanquecina llamada velamen, que tiene la función de proteger los tejidos internos del ambiente externo y retener humedad del ambiente, su tallo es caulescente, no engrosado, crece indefinidamente terminando en vara floral en una inflorescencia, sus hojas son lisas, carnosas y alternas, forma inflorescencias en forma de racimo con un solo eje central de la flor es el órgano más distintivo de la familia con características únicas del reino vegetal, son hermafroditas y zigomorfas con un solo plano de simetría, trímeras pues presentan tres pétalos y tres sépalos, uno de sus pétalos se encuentra modificado con una apariencia distintiva recibiendo el nombre de labelo (Figura 1), sus frutos son cápsulas que producen miles de semillas (Giraldo et al, 2011).



Figura 1: Morfología general de *E. ibaguense*. Foto tomada en los invernaderos de propagación UMNG.

3.2. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

Del latín en vidrio, corresponde a un cultivo aséptico de tejidos, células y órganos. Llamado *in vitro* por realizarse en frascos de vidrio o plástico transparente, cultivando un inóculo con potencialidad de diferenciación en condiciones asépticas, utilizado para la micro propagación presentando ventajas como el incremento de plantas, reduciendo el tiempo de multiplicación, y mejoramiento genético (Abdelnour, et al, 1994). Se ha utilizado en investigaciones de micropropagación de orquídeas.

3.3. Cultivo *in vitro* en orquídeas.

Conociendo los peligros que amenazan a las especies de orquídeas, se promueve la investigación por medio de propagación con la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* sobre las especies en peligro de extinción con uso potencial como ornamentales.

Estas técnicas de cultivo desempeñan un papel importante en los programas de conservación, preservación y mejoramiento genético de las especies, principalmente de aquellas que se encuentran en alguna categoría de amenaza o con capacidades limitadas de reproducción. Comprendiendo cuatro estrategias complementarias para conservar la biodiversidad: reducción de la presión antropogénica, recuperación de las especies en peligro de extinción, y conservación *in situ* y *ex situ* (Bramwell, 1990; Singh et al. 2006; Bapat et al, 2008; Benson 2008,). Citado por (Castellanos y Castro, 2018).

Así podemos definir la propagación *in vitro* como la multiplicación de un genotipo a gran escala, a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. Siendo una herramienta fundamental en los programas de propagación y mejora de especies vegetales, por su potencial para producir plantas de alta calidad a escala comercial, a partir de genotipos selectos y con amplias tasas de multiplicación. Por otra parte, estas técnicas de cultivo se basan en la totipotencialidad de las células vegetales, en consecuencia las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos (Castellanos y Castro, 2018).

En el caso de las orquídeas, la germinación *in vitro* ha sido reportada como una alternativa eficiente para su producción y se ha convertido en una herramienta importante para la conservación y reintroducción de especies amenazadas o en peligro de extinción. La implementación de dicha tecnología ha permitido la propagación de especies de gran interés comercial desarrollando un aprovechamiento sostenible por medio de propagación de las especies por medio de semillas permitiendo germinar más de un 90% de plántulas con una sola capsula.

3.4. Hormonas.

Las hormonas se han definido como compuestos naturales que regulan procesos fisiológicos en cantidades muy por debajo de las de otros compuestos como nutrientes y vitaminas y, adicionalmente en dosis muy altas lo afectarían. Son sintetizadas en ciertos lugares de las plantas desde donde se desplazan a los sitios

donde actúan y producen su acción, por ejemplo crecimiento de órganos como raíz, frutos y hojas (Montoya et al, 2008).

3.5. Reguladores de crecimiento.

Es el concepto más amplio de hormonas, para incluir otras sustancias, como las poliaminas y el ácido salicílico, que no cumplen con la característica de ejercer efecto a distancia propia de las hormonas vegetales, pero que pueden regular y alterar tanto el crecimiento como el desarrollo vegetal provocando en numerosos casos respuestas fisiológicas similares a las hormonas vegetales.

3.6. Auxinas.

Se denominan auxinas los compuestos caracterizados por su capacidad de inducir elongación en células de vástagos. La auxina natural de mayor distribución es el ácido 3-indolacético (AIA), aun cuando el ácido 4-cloroindol-3-acético ha sido aislado de plantas superiores. En general este grupo de hormonas afecta otras características fisiológicas, además de la elongación.

Son numerosos los ejemplos de auxinas sintéticas utilizados en cultivo de tejidos vegetales, fundamentalmente porque su acción es más prolongada que la de sus análogos naturales y su costo inferior, como ejemplo tenemos a IBA, 2,4-D, ANA (Taiz L y Zeiger E, 2010).

4. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento sobre el enraizamiento de plántulas de *Epidendrum ibaguense* en cultivo *in vitro* y sobrevivencia en condiciones de aclimatación

4.1. Objetivos específicos.

- Inducir la formación de raíces en plántulas en cultivo *in vitro* con el uso de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento: ácido

naftalenacético (ANA), ácido indol butírico (IBA), ácido indol acético (AIA) y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D).

- Determinar los porcentajes de sobrevivencia de plántulas provenientes de cultivo *in vitro* en mezclas de turba, fibra de coco y compost en condiciones *Ex vitro*.

5. METODOLOGÍA.

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio química biorgánica, laboratorio de cultivo de tejido y en los invernaderos de la UMNG ubicada en el municipio de Cajicá kilómetro 2 vía Zipaquirá.

5.1 Material vegetal

Las plántulas se obtuvieron de la inducción de semillas a cultivo *in vitro* en medio Murashige-Skoog por el grupo de investigación INQUIBIO. Se utilizaron plantas de un año de edad, mantenidas en medio Murashige-Skoog completo.

5.2. Inducción de raíces *in vitro*

El experimento se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar, y se evaluaron los diferentes reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones ANA, IBA, AIA, 2,4-D (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mgL⁻¹), se sembraron 30 plantas por cada tratamiento, en frascos de vidrio (compota) con 6 repeticiones cada tratamiento, y réplicas de 5 plántulas (ver fig. 2). El montaje fue incubado en el cuarto de propagación de tejidos con un régimen de horas luz de 16/8 y temperatura promedio de 22°C. Las evaluaciones se realizaron cada 8 días contando del número de raíces generadas en ese período de tiempo. Los resultados, por ser datos de conteo, se trabajaron acumulativamente es decir sumatorias de los conteos cada vez.

5.3. Evaluación de sustratos en endurecimiento.

Se realizó la evaluación de aclimatación de plántulas provenientes de cultivo *in vitro*, que no presentaban raíces, en diferentes mezclas de sustratos: fibra de coco-cascarilla de arroz quemada 1-1, fibra de coco-turba 1-1, fibra de coco-turba-compost 1-1-0,2, fibra de coco-turba-compost 1-1-0,5, en cada tratamiento se utilizaron 50 plántulas. El uso de compost fue utilizado buscando complementar los sustratos existentes en la región y de bajar costos en la propagación de las orquídeas.

Antes de la siembra, cada planta fue lavada con agua para eliminar los restos de agar. Inmediatamente, se sembraron cada una en un recipiente con el sustrato correspondiente, posteriormente fueron cubiertas con vasos plásticos transparentes invertidos, y se aplicó riego manual cada 3 días, con 5mL de agua por vez. Pasados 10 días, se perforó un orificio a la tapa para permitir un mayor intercambio de gases con el ambiente y, 20 días después se procedió a descubrir la plántula y llevarla a condiciones de invernadero. Allí se determinó el porcentaje de sobrevivencia pasados 20 días.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Inducción de raíces *in vitro*

La aclimatación de las plántulas desarrolladas en *in vitro*, es el paso más crítico de la propagación de orquídeas y afecta negativamente el porcentaje de supervivencia *ex vitro*, una de las razones es la falta de raíz de la plántula y la utilización de un sustrato inadecuado.

En este estudio se ha observado la inducción de raíces con diferentes concentraciones de auxinas en plántulas de orquídeas propagadas *in vitro* (Figura. 2).



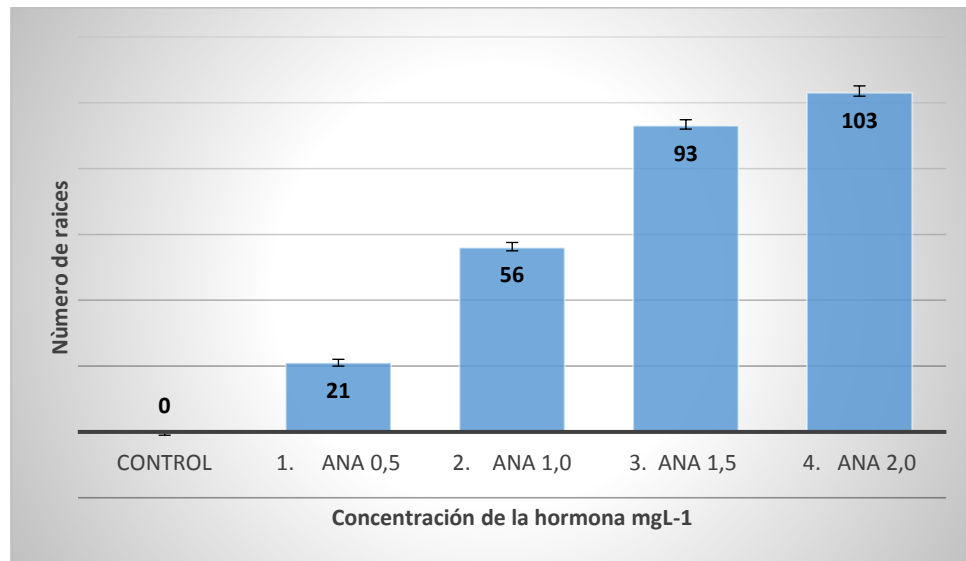
Figura 2: Plántulas con raíces inducidas en cantidad suficiente para iniciar el proceso de aclimatación

El regulador que más raíces indujo fue el ANA en todas sus concentraciones, siendo la más eficaz la concentración de 2 mgL^{-1} . El siguiente fue IBA en todas sus concentraciones, donde la inducción de raíz se dio en la concentración 1 mgL^{-1} , con promedio de 3 raíces por planta en un tiempo de 78 días. El control no presentó generación de raíces en las plántulas.

6. 2. Regulador de crecimiento ANA.

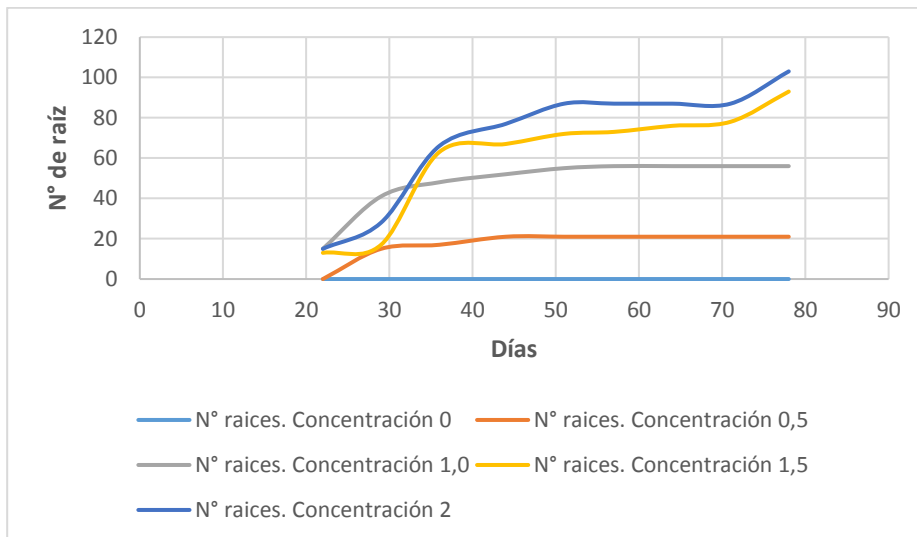
Los tratamientos con ANA arrojaron como resultado un promedio de 3 raíces por planta, con un total de raíces de 103 en el tratamiento de 2 mgL^{-1} de ANA. Este resultó el tratamiento que arrojó el número mayor de raíces en todo el trabajo. Nuestros resultados son contrarios a los resultados reportados por Mohanty et al, 2012, en el caso de las orquídeas medicinales *Vainilla planifolia* y Péndulo de *Cymbidium*, quienes reportan al IBA seguido por el ANA en dosis de $15 \mu\text{M}$, como los reguladores que inducen el crecimiento más eficazmente. Sin embargo, Hassan et al, 2014, reportaron que el regulador de crecimiento más adecuado para inducir raíces en brotes de explantes de *Geodurum densiflorum* fue ANA. (Sheelavanthmath et al, 2000). Citado por (Hassan Dewir Et al, 2014). En la gráfica 1 se observa que, a

medida que se aumenta la cantidad de hormona se incrementa la cantidad de raíces brotadas, comenzando con el tratamiento de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA con un resultado de 21 raíces inducidas y alcanzando 103 raíces brotadas con el tratamiento 2 mgL^{-1} de ANA.



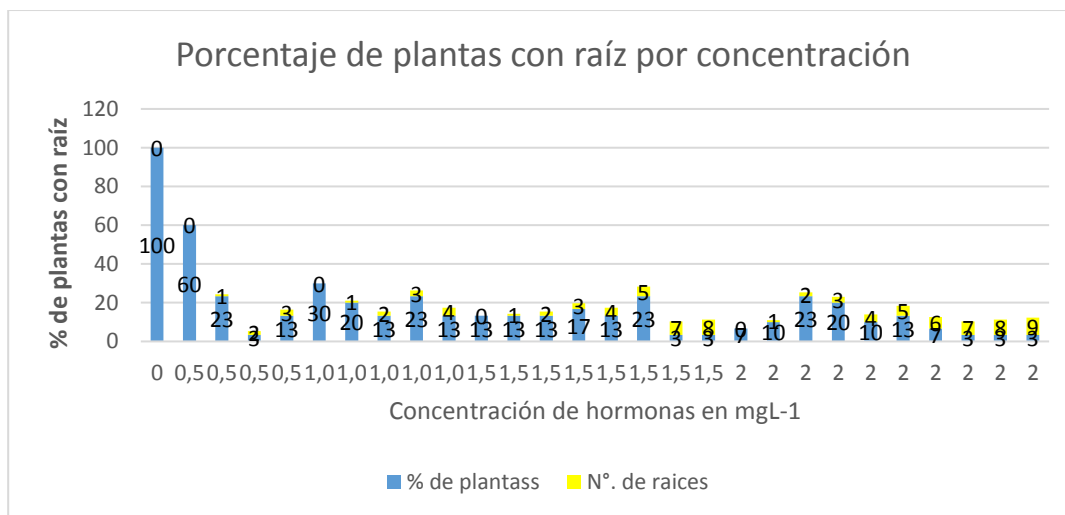
Gráfica 1: Inducciones totales de raíces con regulador de crecimiento ANA.

Se puede observar que el regulador de crecimiento ANA en las concentraciones $1,5$ y 2 mgL^{-1} los efectos sobre las plántulas, a través de los días, fueron aumentando la brotación de raíces sin alcanzar a estabilizarse aun a los 78 días después de la inducción (Gráfica 2). La respuesta aumentó significativamente la inducción de raíz a partir del día 30, y tendió a estabilizarse a los 10 días.



Gráfica 2: Brotes de raíces totales a través del tiempo por cada concentración de la hormona ANA.

En cuanto a la inducción de raíces por planta, (Gráfica 3), para el caso del regulador ANA, se observó que el número de raíces aumentó a medida que la concentración de ANA incrementó a concentraciones bajas (0,5-1,0 mg L⁻¹) el rango estuvo entre 0 y 4 raíces por planta mientras que en las concentraciones más altas (1,5 y 2,0 mg⁻¹L) se observó que, en algunas plantas, se indujeron 7, 8 y hasta 9 raíces, sin embargo no en muchas de ellas. Esta representa una alta variación en la respuesta.

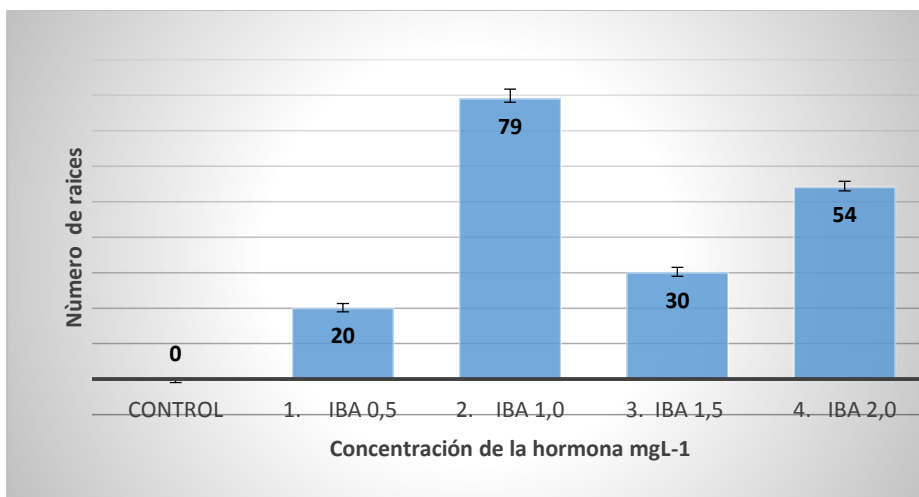


Gráfica 3. N° de raíces totales por tratamiento con regulador de crecimiento ANA

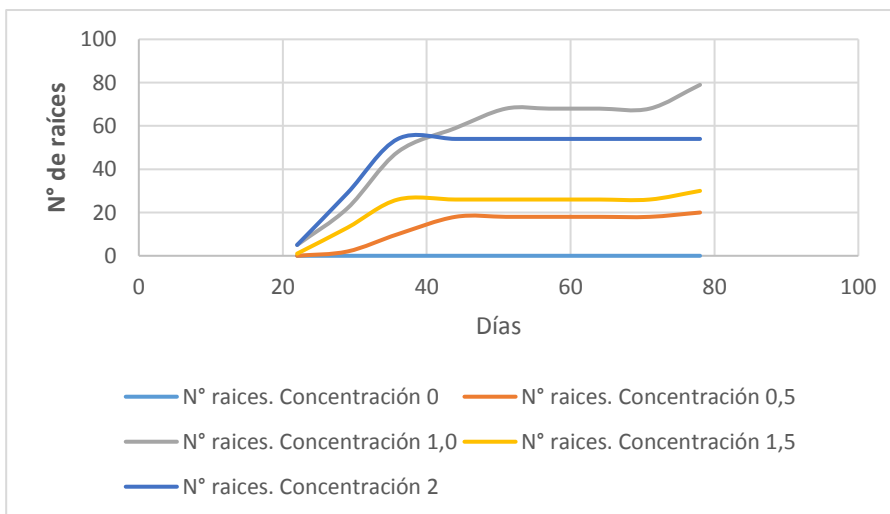
6. 3 Regulador de crecimiento IBA.

El uso de IBA fue el segundo más eficaz en la inducción de raíz, a todas sus concentraciones. Destacando la concentración 1 mgL⁻¹, donde se indujeron en total para todas las unidades experimentales 79 raíces, la mayor cantidad de raíz en todas las concentraciones del regulador de crecimiento IBA (Gráfica 4). Este resultado resulta similar al de Mohanty et al, 2012, donde la auxina más efectiva con la promoción de raíces fue IBA a 1.0 mgL⁻¹.

Notándose un aumento de inducción de raíz a partir del día 20 estabilizándose la brotación a los 40 días, (Gráfica 5).

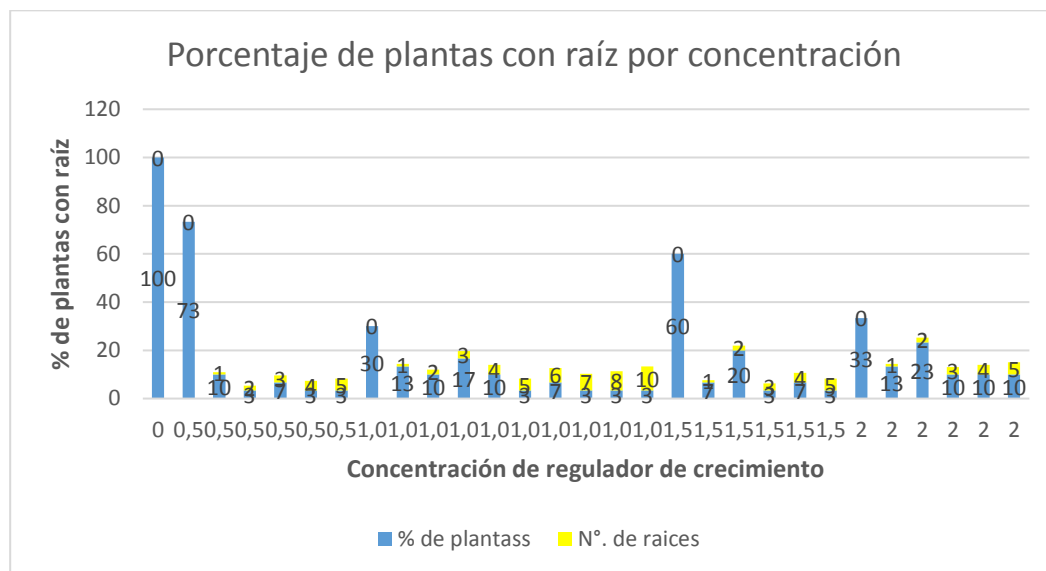


Gráfica 4: Inducciones totales de raíces con regulador de crecimiento IBA.



Gráfica 5: Brotes de raíces totales a través del tiempo por cada concentración de la hormona IBA.

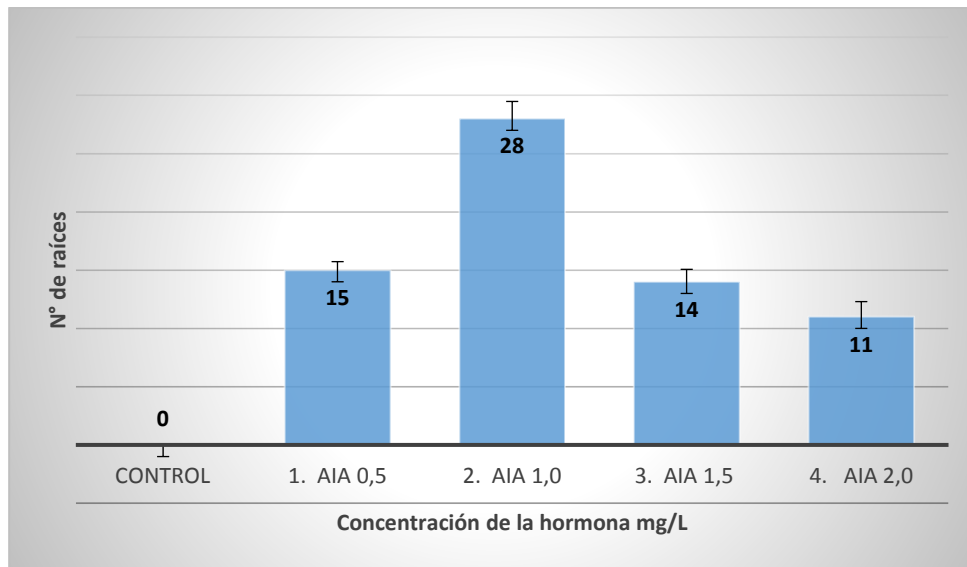
En el desarrollo de los brotes de raíz se observa una alta variación en los tratamientos, se observó por ejemplo que aún en la concentración más baja (0,5 mgL⁻¹) una planta alcanzó a desarrollar 5 raíces y las demás entre 1 a 4, en los otros tratamientos se observa un comportamiento similar. En la concentración de 1 mgL⁻¹ por ejemplo, se observó la más alta inducción, donde una de las plantas desarrolló 10 raíces (Gráfica 6).



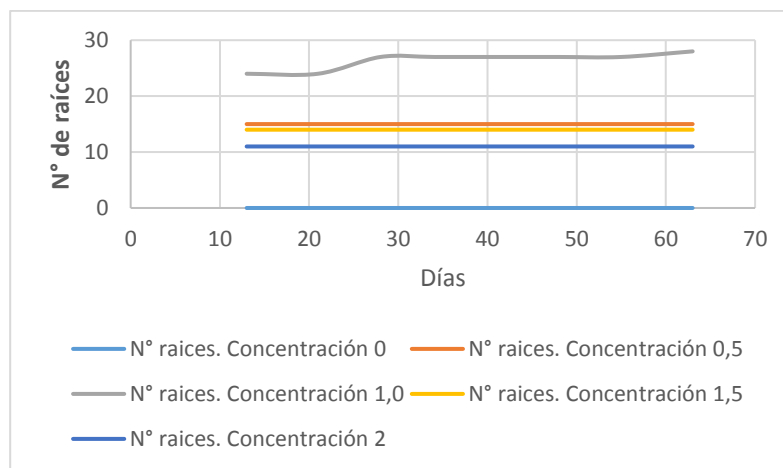
Gráfica 6: N° de raíces totales por tratamiento con regulador de crecimiento IBA

6.4. Regulador de crecimiento AIA (ácido indol-3-acético).

A todas las concentraciones del AIA se obtuvo raíces aun cuando esporádicas y, además, en la mayoría de las plántulas no se generaron raíces. Se obtuvo un promedio de 1 raíz con la mayor inducción a la concentración de 1,0 mgL⁻¹ con una raíz por planta (Gráfica 7). Se ha reportado inducción de raíces por GA₃ y AIA, las más importantes en el enraizamiento de las plantas *in vitro* de la especie *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins. (Coello et al, 2010). En cuanto a la frecuencia, e inicio de formación, no se observaron cambios en los 60 días de seguimiento, es decir la inducción no aumentó con el tiempo (Gráfica 8).

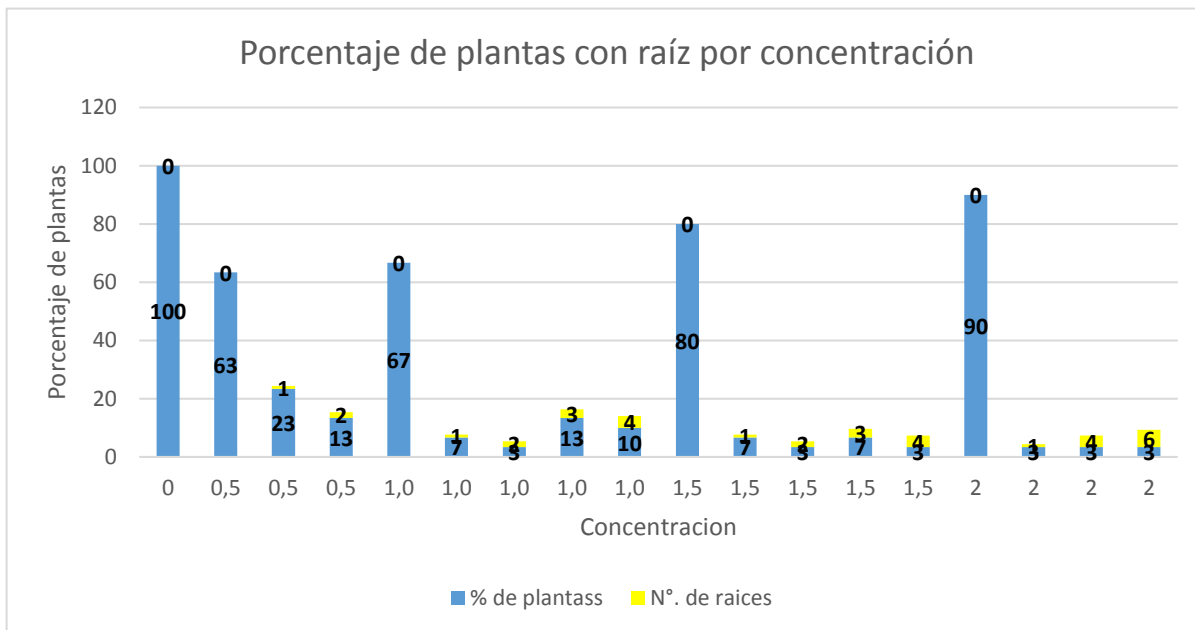


Gráfica 7: Inducciones totales de raíces con regulador de crecimiento AIA.



Gráfica 8: Nº de raíces totales a través del tiempo por cada concentración de la hormona AIA.

La inducción por el AIA por planta fue muy baja comparada con los resultados obtenidos con ANA e IBA, el máximo rendimiento se observó en la concentración de $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ con una planta que desarrolló hasta 6 raíces. En los demás tratamientos se observaron entre 1 y 4 raíces por planta pero en pocos individuos (Gráfica 9).



Gráfica 9: N° de raíces totales por tratamiento con regulador de crecimiento AIA

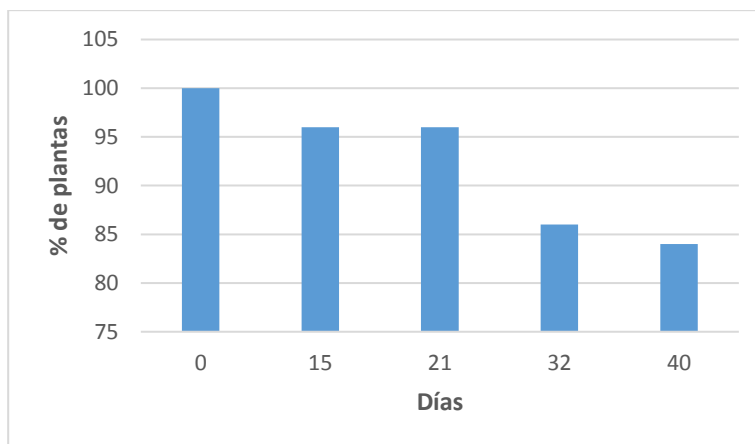
6.5. Regulador de crecimiento 2,4-D

Un 90% de las plántulas murieron en el transcurso del experimento a todas las dosis menos el control. Recordemos que el 2,4-D es más conocido por su acción herbicida, aun cuando a dosis muy bajas actúa como promotor de enraizamiento de algunas especies (Mesén, 1998).

Poca bibliografía se encuentra para este género, sin embargo, existen reportes para una gran diversidad de especies de uso más ornamental, donde las auxinas y las citoquininas se han usado ampliamente como *Barkeria obovata*, *Catasetum intergerrimun*, *Cattleya x Esbetts*, *Cuitlauzina pendula*, *Dendrobium sp.* *Epidendrum veroscriptum*, *Laelia anceps*, *Lycaste skinneri*, *Mormodes tuxtlensis*, *Oncidium tigrinum*, *Oncidium sp.* y *Stanhopea tigrina*. Cada especie responde de manera diferente, dependiendo de la interacción de tipo y nivel de regulador de crecimiento, los efectos de las hormonas dependen de la especie y, en orquídeas sus efectos son muy variados como se observó en este trabajo (Cuello et al, 2010).

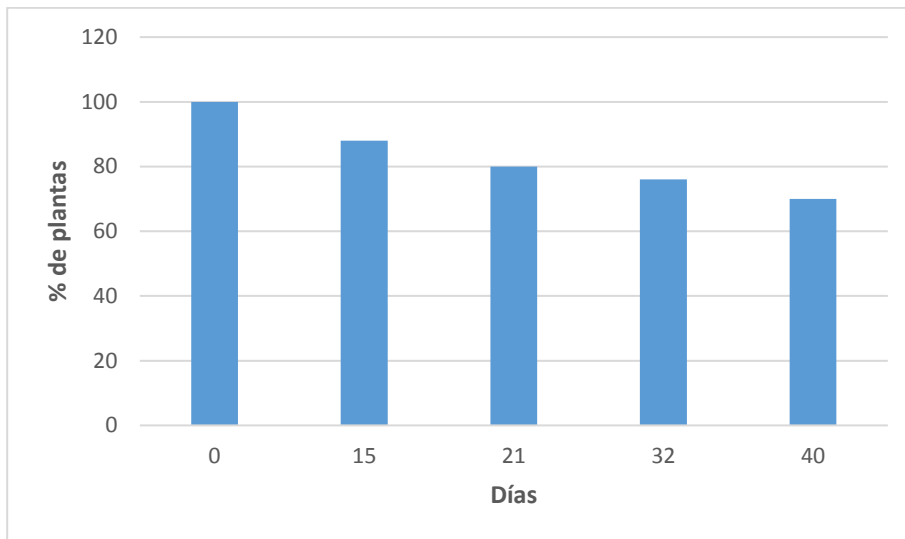
7. EVALUACIÓN DE SUSTRATOS EN ENDURECIMIENTO.

La aclimatación en condiciones *ex vitro* fue de 80% en la mezcla de sustrato fibra de coco:turba (1:1). En un estudio en condiciones *ex vitro*, con una mezcla de sustrato que contiene corteza: perlita: turba (1:1:1) fue obtenida una supervivencia del 98.3% (Hassan et al, 2014), lo cual ubica nuestro resultado en un rango algo menor. (Gráfica 10).

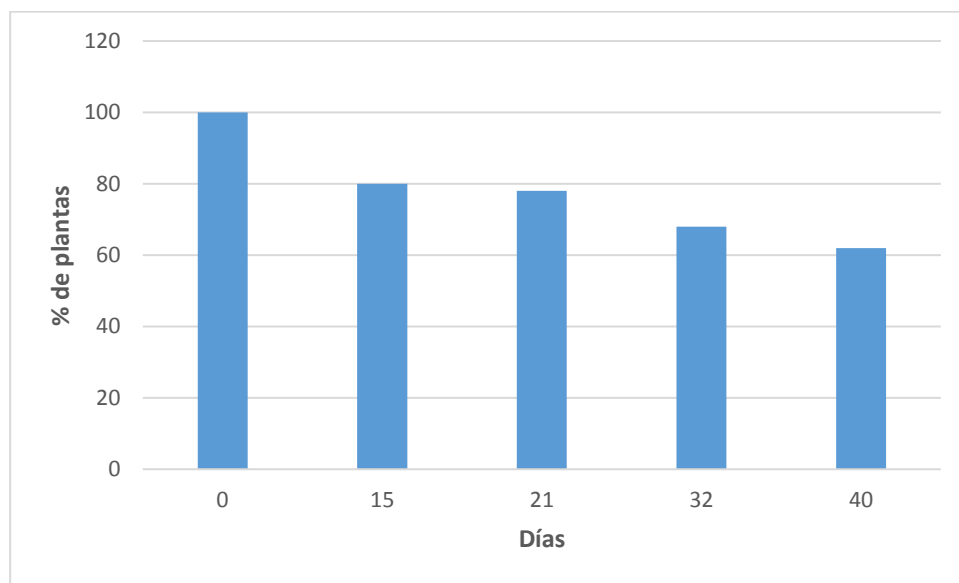


Gráfica 10: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Turba 1:1. Días de aclimatación de las plántulas durante 40 días con un porcentaje de supervivencia de 80%.

La mezcla fibra coco: turba: compost (1:1:0,2) presentó una supervivencia de 79%, y la mezcla de fibra de coco: turba: compost (1:1:0,5) supervivencia de 70% es decir que con el aumento de compost fue disminuyendo el porcentaje de supervivencia (Gráficas 11 y 12). Indicando un posible efecto negativo del compost sobre la aclimatación de las orquídeas.

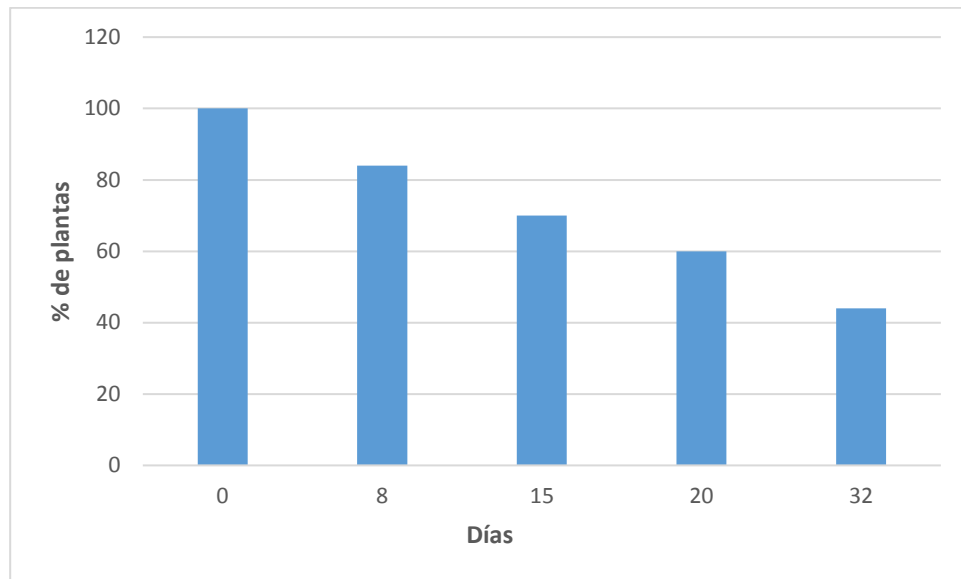


Gráfica 11: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Turba: Compost. 1:1:0, 2 Se obtuvieron resultados de 70% de supervivencia de las plantas en ex vitro.



Gráfica 12: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Turba: Compost. 1:1:0,5 Se obtuvieron resultados de 64% de supervivencia de las plantas en ex vitro.

En la mezcla fibra coco: cascarilla de arroz quemada (1:1) los resultados obtenidos no fueron los esperados obteniendo una supervivencia del 50% (Gráfica 4)



Gráfica 13: Mezcla de sustrato Fibra de coco: Cascarilla de arroz quemada. 1:1 En el eje X se observan los días de adaptación de las orquídeas *E. ibaguense* teniendo una mortalidad con un promedio de 10 plántulas cada 5 días.

En todas las mezclas realizadas en la investigación con sus 50 réplicas las plántulas no tuvieron desarrollo en su elongación ni desarrollo de nuevas hojas.

8. CONCLUSIONES

Se logró la inducción de enraizamiento de las plántulas propagadas *in vitro* de la especie *E. ibaguense* utilizando los reguladores de crecimiento: ANA, IBA y AIA.

Se identificó que el ANA indujo la más alta cantidad de raíces en todas las plantas con 103 raíces con 2,0 mg/L en la especie de orquídea *E. ibaguense*.

El regulador de crecimiento que no se recomienda para utilizar en las concentraciones utilizadas en la investigación es 2,4-D, ya que no indujo la formación de raíces, y se recomienda evaluar en dosis más bajas .

Se evidenció que la producción de raíces es una respuesta muy variable en las plántulas de un mismo tratamiento, pues no se observó homogeneidad dentro de los tratamientos.

Se observó que la inducción de raíces con ANA e IBA inicia hacia el día 20, con un pico de producción entre los días 20 y 30, mientras que con AIA la producción fue muy baja y no incremento durante el tiempo de evaluación.

El sustrato que más favoreció a las plántulas de *E. ibaguense* en la fase de aclimatación es la mezcla de los sustratos fibra de coco-turba 1:1 con un porcentaje de supervivencia de 84%.

Se pudo observar que el compost no fue adecuado para la propagación de la especie de la orquídea *E. ibaguense* en la fase de endurecimiento y aclimatación.

La mezcla de los sustratos fibra de coco-cascarilla de arroz quemada no favorecieron la aclimatación de la especie *E. ibaguense*.

Perspectivas

Se espera que esta investigación sea punto de referencia de otras investigaciones para profundizar el tema. También ser referente en investigaciones sobre otras especies de orquídeas nativas ya que las investigaciones de este tipo en nuestro país parecen ser escasas.

9. BIBLIOGRAFIA.

- Abdelnour, et, al. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Turrialba. Costa Rica.
- Ávila Díaz Irene, R. Salgado Garciglia. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Billard et al. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional. Entre Ríos. México.
- Castellanos-Castro, C. y Torres-Morales, G. 2018. Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 328 p.
- Coello et al, 2010. Optimización de reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de la orquídea *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins. México.
- Gil K. 2012. Evaluación del estado de conocimiento y conservación de la familia Orchidaceae, a través de colecciones *ex situ* en el departamento de Cundinamarca, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Estudios Ambientales y Rurales Bogotá. Colombia.
- Hassan, et al. 2015. Micropropagation of *Cattleya*: Improved *in vitro* rooting and acclimatization.
- Hunhoff, et al. 2017 Nutritional requirements for germination and *in vitro* development of three Orchidaceae species in the southern Brazilian Amazon. Brazil.

- Khatun et al. 2010. *In vitro* root formation and plantlet development in *Dendrobium* orchid. Giraldo, G. & J. Betancur. 2011. Guía de campo de las orquídeas de Santa María (Boyacá, Colombia). Serie Guías de Campo del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia No. 9. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 188p.
- Mesén F. 1998. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba. Costa Rica.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y Universidad Nacional de Colombia. 2015. Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia. Textos: Betancur, J., H. Sarmiento-L., L. Toro-González & J. Valencia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Colombia; Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. Pp.336
- Mohanty et al. 2012. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India.
- Montoya et al. 2008. Elementos Fisiología Básica. Universidad de Córdoba.
- Salazar et, al. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). Revista Colombiana de Biotecnología, 15 (2)
- Taiz L, Zeiger E. 2010. Plant Physiology, 5th edition. Sinauer Associates, USA. 781 pp.
- <https://www.agronegocios.co/agricultura/las-exportaciones-de-orquideas-crecieron-141-en-2017-y-su-principal-destino-fue-estados-unidos-2717780>