

## EFFECTO DE DIFERENTES TIPOS DE ENRAIZADORES IN VITRO Y SUSTRATOS EN LA ACLIMATACIÓN DE *Zigopetalum maculatum* (ORCHIDACEAE)

### Effect of different types of in vitro rooting and substrates on the acclimatation of *Zigopetalum maculatum* (Orchidaceae)

Beatriz Mamani Sánchez<sup>1</sup>, Ana Gabriela Quispe Mamani<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Las orquídeas tienen un gran potencial, pero, requieren medios de cultivo especializados para ser propagadas, ya que de manera natural menos de 5 % llegan a germinar y necesitan asociarse con hongos simbióticos. En ese sentido, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar efecto de enraizadores *in vitro* (sacarosa y auxina) y tipos de sustrato en la aclimatación de *Zigopetalum maculatum*. Para el enraizamiento, los brotes fueron sembrados con AIA (3, 6 y 9 mg L<sup>-1</sup>) y sacarosa (30, 50 y 70 g L<sup>-1</sup>). En la aclimatación, se sembraron en sustratos con fibra del fruto de coco (*Cocos* sp.), trozos de raíz de helecho arbóreo (*Cyathea* sp.), y musgo (*Sphagnum* sp.), con diferentes proporciones de humus de lombriz (0.5, 1 y 2). El diseño empleado, fue DCA con arreglo bifactorial. Las variables de respuesta para el enraizamiento son: longitud y número de raíces, altura de la planta y número de hojas. En aclimatación son: altura planta y número de hojas (todos a los 90 días). En el enraizamiento, la interacción presentó diferencias significativas, en la combinación con 6 mg L<sup>-1</sup> AIA\*70 g de sacarosa presentó mayor número de raíces (6.10). La aplicación de AIA presentó diferencias significativas, de las cuales con 3 y 6 mg L<sup>-1</sup> AIA expresaron mayor longitud de la planta (4.27 y 4.17 cm). La concentración de sacarosa presentó diferencias significativas, con 30 y 50 g L<sup>-1</sup> tienen mayor cantidad de hojas de 5.35 y 5.32. En la aclimatación, la altura de las plantas presentó diferencias significativas en cuanto a tipo de sustrato, *Shagnum* sp. fue el más favorable en obtener mayor altura de 7.8 cm. Se concluye, que en *Z. maculatum* con la combinación de 6 mg L<sup>-1</sup> AIA\*70 g de sacarosa presentó mayor número de raíces y en la aclimatación, *Shagnum* sp. fue el más propicio durante este proceso.

**Palabras clave:** ácido indolacético, sacarosa, aclimatación, *Zigopetalum maculatum*.

#### ABSTRACT

Orchids have great potential, but they require specialized growing media to be propagated, since naturally less than 5 % manage to germinate and they need to associate with symbiotic fungi. In this sense, the present work aims to evaluate the effect of in vitro rooting agents (sucrose and auxin) and types of substrate on the acclimatization of *Zigopetalum maculatum*. For rooting, the shoots were sown with IAA (3, 6 and 9 mg L<sup>-1</sup>) and sucrose (30, 50 and 70 g L<sup>-1</sup>). In acclimatization, they were sown in substrates with coconut fruit fiber (*Cocos* sp.), pieces of tree fern root (*Cyathea* sp.), and moss (*Sphagnum* sp.), with different proportions of worm castings (0.5, 1 and 2). The design used was DCA with a two-factor arrangement. The response variables for rooting are: length and number of roots, plant height and number of leaves. In acclimatization they are: plant height and number of leaves (all after 90 days). In rooting, the interaction presented significant differences, in the combination with 6 mg L<sup>-1</sup> IAA\*70 g of sucrose it presented a greater number of roots (6.10). The application of IAA presented significant differences, of which with 3 and 6 mg L<sup>-1</sup> IAA they expressed greater plant length (4.27 and 4.17 cm). The sucrose concentration presented significant differences, with 30 and 50 g L<sup>-1</sup> they have a greater number of leaves of 5.35 and 5.32. In acclimatization, the height of the plants presented significant differences in terms of type of substrate, *Shagnum* sp. was the most favorable in obtaining a greater height of 7.8 cm. It is concluded that in *Z. maculatum* with the combination of 6 mg L<sup>-1</sup> AIA\*70 g of sucrose presented a greater number of roots and in acclimatization, *Shagnum* sp. was the most favorable during this process.

**Keywords:** indoleacetic acid, sucrose, acclimatization, *Zigopetalum maculatum*.

<sup>1</sup> ✉ Departamento de Investigación y Proyectos, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa, Universidad Católica Boliviana "San Pablo", Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9513-6941>. [bmamani@uac-cp.edu.bo](mailto:bmamani@uac-cp.edu.bo)

<sup>2</sup> Carrera de Ingeniería Agronómica, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa, Universidad Católica Boliviana "San Pablo", Bolivia.

## INTRODUCCIÓN

*Z. maculatum* es una orquídea que se distribuye en Perú, Bolivia y Brasil. Crecen en suelos llanos con vegetación cubierta de pastos se encuentra entre 1 100 y 2 500 m, toma su nombre, de la forma como es insertada la cabeza del labelo y que esta se asocia con los pétalos y sépalos; la planta alcanza unos 40 cm de altura, la inflorescencia puede alcanzar 60 cm (Javi, 2017).

El proyecto “Epifitas” dio a conocer información sobre el medio ambiente, biología y potencial económico de muchas especies de orquídeas, bromelias y aráceas (Jiménez, 2009). Entre ellas, está presente *Z. maculatum*, que está catalogada como una especie promisoría por su valor económico y además de un interés científico. Sin embargo, las orquídeas en general tienen problemas de reproducción (semillas sin endospermos, dependencia de micorrizas y polinizadores). Una alternativa para reproducirlos, es mediante el cultivo de tejidos vegetales, que ofrece condiciones físicas y químicas para su crecimiento.

El cultivo tejido vegetales, es una técnica que facilita la germinación y propagación de orquídeas y otras especies vegetales, se lleva a cabo en condiciones de asepsia, en presencia de una fuente de nutrimentos y condiciones físicas controladas, esto potencia su capacidad de reproducción y crecimiento (Zettler et al., 2001). Para cultivar plantas en condiciones *in vitro* se contemplan las siguientes fases: el primero, consiste en la selección del material vegetal, fase de introducción, fase de multiplicación, fase de enraizamiento y fase de aclimatación. Las dos últimas fases son muy importantes para que las plántulas retomen su desarrollo natural (Gisbert y Picó, 2015).

Para el enraizamiento en orquídeas, recomiendan que los brotes tengan una altura de aproximadamente dos centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación, se trasladan a un medio libre de reguladores de crecimiento o que tengan auxinas. Sin embargo, algunas especies no necesitan pasar por fase de enraizamiento debido a que presentan simultáneamente la formación de raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan los brotes, este como resultado para el proceso de multiplicación y enraizamiento (Tombion, 2023). Para inducir al enraizamiento se emplean auxinas, sacarosa y reducción de sales.

Durante la aclimatación las vitro-plantas tienen cambios fisiológicos (apertura de estomas, humedad, entre otros) dichos cambios deben ser progresivos de manera que permita adaptarse a vivir en condiciones naturales, en el momento en que las plantas enraizadas se retiran del medio de cultivo, no son muy aptas para el cultivo en invernaderos, porque estas plantas enraizan y crecen en un ambiente con alta humedad y a menudo los estomas están completamente abiertos (agentes que regulan la transpiración y la pérdida de agua en una planta), que no son totalmente eficaces frente a decadencias de la humedad relativa, y por lo tanto, son demasiado lentos para evitar la desecación del brote, los explantes recién enraizados son muy sensibles para los cambios ambientales y que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación.

Un aspecto a considerar para la propagación de orquídeas es el cuidado y manejo en condiciones de invernadero, al tratarse de especies semi-epifitas y epifitas, el sustrato tiene características particulares, ya que además que se emplea como soporte y como fuente de agua, aireación y nutrientes desempeña un papel importante en la sanidad y vigor de las plantas. Entre los sustratos más empleados están: musgo (como por ejemplo *Sphagnum* sp.), corteza de corcho (*Quercus suber*), raíz de helecho arbóreo (*Cyathea* sp.), arena de río, grava, perlita y carbón vegetal (Gutierrez et al., 1988).

En ese sentido el presente trabajo de investigación pretende evaluar el efecto de enraizadores *in vitro* (sacarosa y auxina) y la aclimatación de *Z. maculatum* (*Orchidaceae*) en diferentes tipos de sustratos bajo condiciones controladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación de la zona de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad Académica Campesina de Carmen Pampa (UAC-CP), dependiente de la Universidad Católica Boliviana "San Pablo", en el municipio de Coroico, provincia Nor Yungas, departamento de La Paz, Bolivia, situada a una altitud de 1 850 m s.n.m. a 16°20'30" de latitud sur y 67°50'30" de longitud oeste. La distancia de la ciudad de La Paz a Carmen Pampa es de 115.5 km.

## Metodología

El trabajo experimental se dividió en dos fases, una que corresponde al trabajo de laboratorio en condiciones *in vitro*, donde se evaluó el enraizamiento (Figura 1). La segunda fue realizada en un vivero y se evaluó la aclimatación. Es importante aclarar que las vitroplantas de *Z. maculatum* se tenían establecida en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UAC-CP.



Figura 1. Plántula *in vitro* de *Zigopetalum maculatum*.

### Fase de laboratorio: enraizamiento *in vitro*

Inicialmente se realizó la preparación de medios de cultivo, y para ello se empleó dos soluciones de hidroponía, que está constituida por: la solución A de macronutrientes (añade 5 ml L<sup>-1</sup>) y la solución B micronutrientes (2 ml L<sup>-1</sup>) (Tabla 1), al mismo se adicionó 20 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco, sacarosa, AIA (ácido indolacético) y se ajustó el pH a 5.6.

Tabla 1. Composición del medio basal

Nombre	Fórmula	Solubilidad g L <sup>-1</sup>
Nitrato de calcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 220
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	130
Nitrato de magnesio	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	279
Fosfato monopotásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	230
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	710
Sulfato de potasio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	111
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub>	980
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	310
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	960
Molibdato de amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	430

Fuente: FAO, La Empresa Hidropónica de Mediana Escala, La técnica de la solución Nutritiva Recirculante (NFT), (1996) citado en (Gilsanz, 2007).

La batería de tratamientos de las combinaciones de sacarosa y AIA (ácido-3-indol acético) están detalladas en la Tabla 2. Los medios fueron servidos en frascos de cultivo y por último se hizo el tapado a cada uno de

los frascos de vidrio con papel aluminio, posteriormente se realizó la esterilización del medio de cultivo en la autoclave, a 121 °C (vapor a presión) a 15 PSI por 15 minutos.

Tabla 2. Distribución de los tratamientos.

		Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )		
		30	50	70
AIA	3	T1	T2	T3
(mg L <sup>-1</sup> )	6	T4	T5	T6
	9	T7	T8	T9

### Fase de vivero: aclimatación

Al cabo de las 12 semanas de enraizamiento, las raíces de las vitroplantas fueron lavadas con agua de grifo quitando todo el agar y estas fueron sembradas en los sustratos, las cuales previamente fueron esterilizada a excepción del musgo. La combinación de los tratamientos resultantes para la aclimatación está descrita en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos a evaluar para la aclimatación.

		Sustratos		
		Fibra del fruto de coco seco (Cocos nucifera L.)	Fibra de raíz de helecho (Cyathea spp)	Musgo (Sphagnum)
Humus de lombriz	3 de tierra; 2 arena; 0.5 de lombriz	T1	T2	T3
	3 de tierra; 2 arena; 1 de humus de lombriz	T4	T5	T6
	3 de tierra; 2 arena; 2 de humus de lombriz	T7	T8	T9

El material que se empleó a manera de macetas fueron vasos de plástico (500 ml), una vez sembrado las plántulas se empleó como cobertor de cada maceta otro vaso de similar, este procedimiento se realizó con el fin mantener la humedad del ambiente y pasado los tres días del trasplante en el extremo superior del vaso se realizó la perforación de 0.5 cm de diámetro, esto para tenga intercambio de gases (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) y a los 15 días se destapo por completo (Figura 2). A requerimiento de la humedad del sustrato se realizó el riego. Durante esta etapa, la temperatura media registrada fue de 21°C.



Figura 2. Procedimiento de aclimatación: Aclimatación a los 3 días (Izq.), destapado de frascos a los 15 días (Der.)

*Variables de respuesta*

Durante la fase de enraizamiento, al cabo de 90 días de la siembra fueron medidos: el número de raíces, altura de planta, número de hojas. En la fase de aclimatación se evaluó, el porcentaje de sobrevivencia al cabo de 15 días de aclimatación, sin embargo, la altura de planta y número de hojas se evaluó al cabo de 90 días.

*Diseño y análisis estadístico*

La investigación fue realizada en base del Diseño Completamente al Azar con arreglo Bi-factorial en los dos tiempos de evaluación (fase enraizamiento y aclimatación). Para el enraizamiento se evaluó un total de nueve tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento, lo que hace un total de 180 unidades experimentales. Para la aclimatación se realizó en un total de nueve tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento, lo que hace un total de 135 unidades experimentales. El análisis de datos se realizó a través del programa estadístico INFOSTAT (2010), donde el ANVA (análisis de varianza) y la prueba Tukey están analizados a un nivel de significancia del 5 %.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Fase de enraizamiento**

*Longitud de raíces*

El análisis de varianza para la longitud de raíces no presentó diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) por efecto de concentraciones de auxinas y sacarosa y la interacción de los factores de estudio en los tres tiempos de evaluación. Los valores de coeficiente de variación están entre 4.96 a 5.07 %, el cual está entre los parámetros aceptables de la investigación.

En la Figura 3 se aprecia que no hay diferencia por la aplicación de concentraciones de AIA. Sin embargo, se observa que los promedios de los datos, con 6 mg L<sup>-1</sup> de AIA es mayor la longitud de la raíz en los tres tiempos de evaluación de 1.82 cm (30 días), 5.07 cm (60 días) y 6.48 cm (90 días) respectivamente, en relación a las otras concentraciones empleadas (3 y 9 mg L<sup>-1</sup> de AIA).

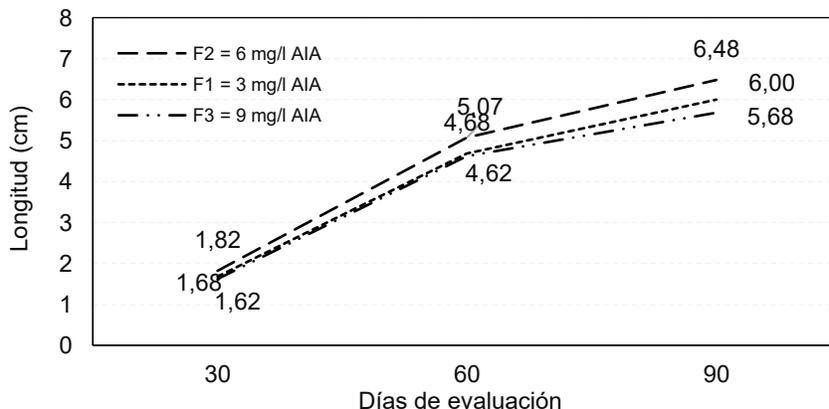


Figura 3. Variación de la longitud de raíz con la aplicación de diferentes concentraciones de AIA.

En un trabajo realizado por Carranza-Álvarez et al. (2021) en la especie de orquídea *Vanilla planifolia* reporta, que al emplear  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA presenta mayor longitud de raíces (2.3 cm) en relación a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (1.5 cm) en 90 días. Comparando estos resultados *Z. maculatum*, esta presentó mayor longitud (6.48 cm) con  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA. Esta situación podría deberse a dos causas, la primera a la diferencia de especies y la otra a la concentración de AIA. En la primera situación, las dos especies tienen un diferente comportamiento en respuesta a la suplementación de reguladores de crecimiento en condiciones *in vitro*. Por otra parte, *Z. maculatum* al emplear 3, 6 y  $9 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA promueve una similar longitud de raíces, del cual no se aprecia una diferencia en cuanto a la concentración de AIA (Figura 3).

Mendieta (2013) menciona que en *Epidendrum quinquepartitum* Schltr mediante el empleo de  $10 \text{ mg l}^{-1}$  ácido naftalenacético (ANA) las raíces tienen una longitud de 8.92 cm, en cambio con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA tienen 2.93 cm de longitud de raíz. En el presente trabajo, *Z. maculatum* la longitud fue similar, ya sea a mayor ( $9 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA) o menor ( $3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA) concentración. La diferencia encontrada en la longitud de raíz de los dos tipos de auxinas de ANA y AIA probablemente se deba a que ANA es un regulador de mayor potencia que el AIA.

Las auxinas participan en todos los procesos de desarrollo de las plantas (Friml, 2009) citado en Garay-Arroyo et al. (2014) y, a nivel celular, intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (Garay-Arroyo et al. 2014). Al respecto Coello et al. (2010) mencionado por Amador-Alfárez et al. (2013) señalan, que el AIA tiene un efecto importante al promover una mayor longitud de brotes y raíces.

La longitud de las raíces en los tres momentos de evaluación asciende, pero no se aprecia diferencia entre los tres tratamientos de sacarosa. De los resultados, en la Figura 4 se observa que a los 90 días de evaluación se tiene una mejor respuesta con  $50 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, donde se obtiene 6.33 cm de longitud. Estos resultados, difieren al estudio realizado por Raya-Montaño et al. (2011) mencionan, que la concentración de sacarosa no afectó la organogénesis *in vitro* en la longitud de raíces de *Laelia halbingeriana*, sino más bien influye en el número de hojas. Una baja concentración de sacarosa ( $87.64 \text{ mM L}^{-1}$ ) permite que la plántula absorba agua y nutrientes con facilidad, en cambio, el adicionar  $116.85 \text{ mM L}^{-1}$  de sacarosa al medio de cultivo, disminuye considerablemente el potencial osmótico, lo que dificulta la absorción de agua y nutrientes hacia el interior de las plántulas, por lo que el crecimiento de las hojas es limitado.

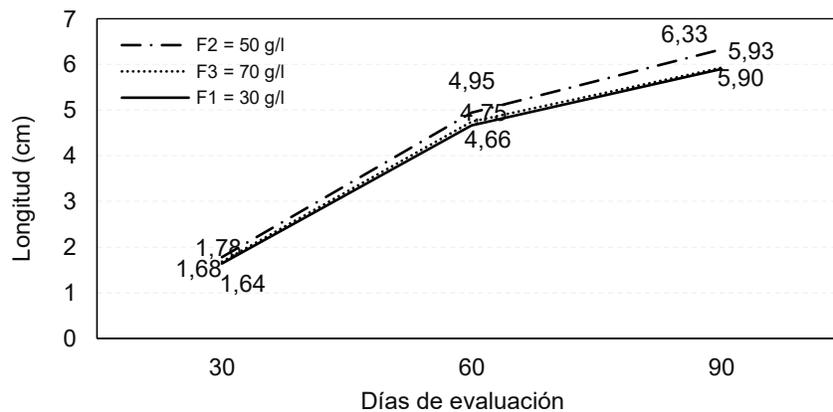


Figura 4. Comportamiento de la longitud de raíz por la aplicación de sacarosa.

#### Número de raíces

El análisis de varianza a los 90 días de evaluación presenta diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por efecto de concentraciones de auxinas y la interacción de los factores de estudio, no así por la presencia de sacarosa ( $P > 0.05$ ). Los coeficientes de variación están

entre 4.73 a 5.24 %, el cual está entre los parámetros aceptables de la investigación.

En la Figura 5 se aprecia, que a concentraciones 3 y  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA se forman 5.03 y 5.68 raíces, los cuales son estadísticamente similares y diferentes a  $9 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA en la que se forma menor número de raíces.

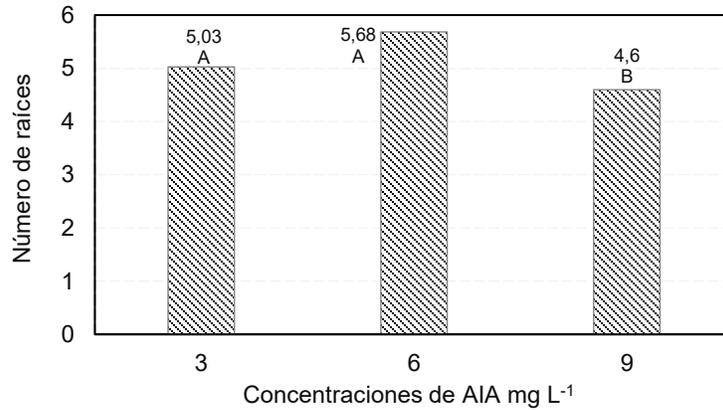


Figura 5. Número de raíces a diferentes concentraciones de ANA.

Jiménez-Mariña et al. (2019) indican que a una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA favoreció el crecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Dahlia* sp, con 3.9 raíces/brote y 87.5 % de enraizamiento. Comparando estos resultados con *Z. maculatum* presentó una mejor respuesta con 6 mg L<sup>-1</sup> de AIA logrando formar 5.68 raíces, esta situación podría deberse a la diferencia de especies, esta afirmación es corroborada por Roca et al. (1991) citado por González (2003), quien argumenta que las condiciones cambian de acuerdo con la especie de la planta y en ocasiones según las variedades de una misma especie.

Con relación al tipo de auxinas la potencia de efectividad como regulador, este varía de manera descendente de ANA (ácido naftalenacético), AIB (ácido indolbutírico) y AIA (ácido indolacético), tal afirmación es demostrada por Gómez y Vasco (2020) en *Epidendrum ibaguense*, es una especie endémica

de Colombia indica que una mayor inducción de raíces con ANA seguido de AIB.

Mendieta (2013) en un estudio en enraizamiento y aclimatación de vitroplantas en *Epidendrum quinquepartitum* Schltr con distintos niveles de ANA y diferentes sustratos, reporta un mayor número de raíces (3.75 y 3.53) con 10 y 5 mg L<sup>-1</sup> de ANA respectivamente.

En la Figura 6 se aprecia mayor número de raíces (6.1) como resultado de la combinación de 6 mg L<sup>-1</sup> de AIA con 70 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Sin embargo, contradictoriamente a menor y a mayor concentración de AIA, es decir, de 3 y 9 mg L<sup>-1</sup> presentan entre 5 a 4 raíces. El número de raíces *in vitro* es importante porque permite que las vitroplantas puedan sostenerse al sustrato en el momento de la aclimatación.

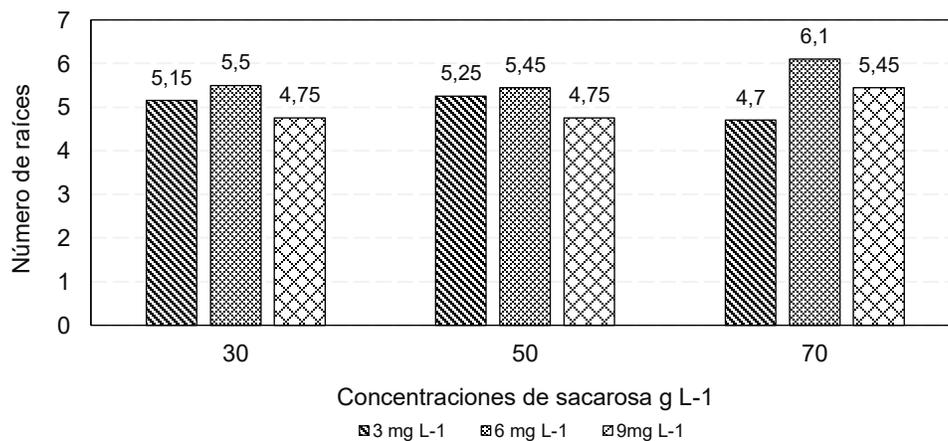


Figura 6. Interacción de concentraciones de auxina y sacarosa en el número de raíces.

Carranza-Álvarez et al. (2021) mencionan que al emplear ácido indolacético (AIA) para la rizogénesis de los brotes de *V. planifolia*, alcanzaron un mayor número de raíces con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA, obteniendo un rango de 0.9 a 13 raíces por brote. En cambio, en

los tratamientos control y con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA, el número de raíces es reducido de 1.0 a 5.0. Razón, por la que se deduce que el número de raíces no presenta un similar patrón en las especies de orquídeas.

El AIA es precisamente la auxina más recomendada para la mayoría de los medios de cultivo de enraizamiento descritos en la literatura. El AIA tiene un efecto importante al promover una mayor longitud de brotes y raíces. La función es inducir el crecimiento, por medio de una rápida estimulación de síntesis de los componentes de la pared celular de células en crecimiento.

#### Altura de planta

El análisis de varianza a los 90 días de evaluación en la altura de la planta presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) de la concentración de AIA y con respecto a la concentración de sacarosa e interacción de factores no presenta diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) cuyo coeficiente de variación es de 5.05 %.

En la Figura 7 se aprecia que a los 90 días de evaluación una mayor longitud de la planta con la aplicación de 3 y 6 mg L<sup>-1</sup> de AIA con un tamaño de 4.27 y 4.17 cm respectivamente y es estadísticamente diferente con 9 mg L<sup>-1</sup> de AIA, en la que presentó menor longitud la planta 3.65 cm.

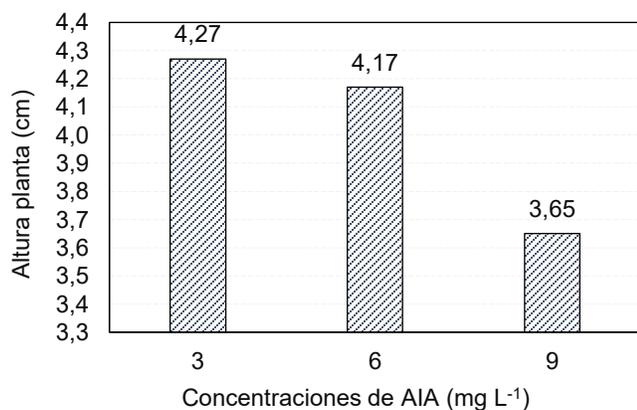


Figura 7. Altura planta por la aplicación de AIA.

Mendieta (2013) en su estudio en la inducción al enraizamiento demuestra que los tratamientos de 0 mg L<sup>-1</sup> ANA, 1 mg L<sup>-1</sup> ANA, 5 mg L<sup>-1</sup> ANA y 10 mg L<sup>-1</sup> ANA presentan altura de las plantas de 7.74, 9.18, 11.10 y 14.05 cm respectivamente. La diferencia de resultados de las investigaciones podría deberse por los dos genotipos y la otra causa al tipo de auxina. ANA a bajas concentraciones tiene mayor efectividad que AIA en promover mayor longitud de las raíces. Esta afirmación es corroborada por Salisbury (2000) que señala que la auxina sintética ANA suele ser más eficaz que el AIA (Jiménez-Mariña et al., 2019).

#### Número de hojas

El análisis de varianza a los 90 días de evaluación en el número de hojas presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por efecto del AIA, y con respecto a la concentración de sacarosa e interacción de factores no presenta diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) cuyo coeficiente es de 4.73 %.

A los 90 días de evaluación, los medios con mayor número de hojas fueron con 30 y 50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, los cuales son estadísticamente similares llegándose a obtener 5.35 y 5.32 hojas/planta con lo cual se evidencia que a 50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa no afecta de manera directa en la disponibilidad en la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo, pero si cuando se incrementa a 70 g L<sup>-1</sup> de sacarosa que reduce el número de hojas a 4.77 (Figura 8).

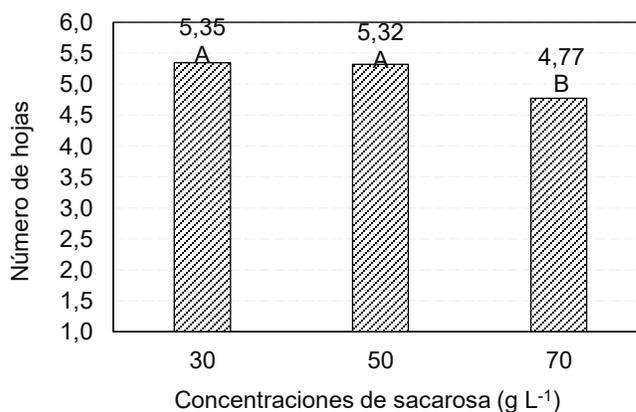


Figura 8. Número de hojas a diferentes concentraciones de sacarosa.

En la misma variable de respuesta en *Baccharis incarum* al emplear 30, 50 y 70 g L<sup>-1</sup> sacarosa el número de hojas es similar de 23.6, 21.1 y 22 (Mamani et al., 2023), con esto se podría señalar que el incremento de la concentración de sacarosa no influye en el número de hojas durante la fase de enraizamiento, pero si influye en el número de raíces (Rangel-Estrada et al., 2015).

En un estudio en *Vitis rupestris' vitis berlandieri*, el porcentaje de enraizamiento, número y tamaño de raíces, tamaño de brotes, peso de materia fresca y contenido de agua de los explantes *in vitro*, disminuye al incrementar la concentración de sacarosa, en los contenedores con intercambio gaseoso (Paz da Silva y Villegas, 2009).

## Fase de aclimatación

### Porcentaje de sobrevivencia

Al cabo de 15 días y 30 días de evaluación el 100 % de los plantines aclimatados de *Z. maculatum* sobrevivieron (Figura 9). En un estudio realizado por Barsanti y Lallana (2013) en la aclimatación de un híbrido de *Cattleya*, el porcentaje de sobrevivencia varió en función al número de hojas, a los 240 días de haber iniciado el proceso de aclimatación es de 78.4 % de sobrevivencia. En otro estudio en la *Polystachya concreta* presenta más del 90 % de sobrevivencia con sustratos comerciales (Billard et al., 2014).



Figura 9. Vitroplantas aclimatadas.

### Altura de las plantas

El análisis de varianza la altura de las plantas presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por efecto del tipo de sustrato, y con respecto a la concentración de humus e interacción de factores no presenta diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) cuyo coeficiente de variación es de 4.72 %. En la Figura 10, se observa que el musgo se destacó en presentar mayor altura de las plantas (8.56 cm) en relación a los dos sustratos.

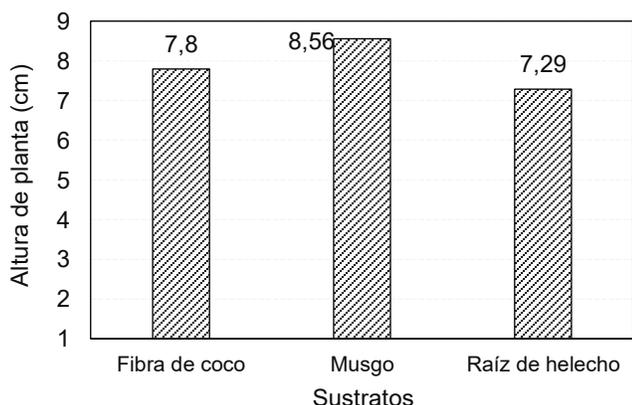


Figura 10. Altura de las plantas en diferentes tipos de sustratos.

Guato (2014) con el objetivo de evaluar la influencia de cuatro tipos de sustratos en la fase inicial de desarrollo en dos especies de orquídeas en 180 días en dos especies de *Dendrobium earsakul* con el musgo importado 75 % con poliestireno 25 %, presenta mayor altura de plantas con un valor de 7.81 cm para ambas especies, y en general, el musgo, *Sphagnum* por sus particularidades de acumulación de humedad presenta mejores características de retención de humedad y de nutrientes. Similar comportamiento se presentó en *Z. maculatum* en la altura de las plantas (Figura 10). El tipo de sustrato varía en función a la especie por ejemplo en *Prosthechea vitellina* obtuvo 80 % de sobrevivencia de las plántulas sembradas en su fase de endurecimiento con la mezcla fibra de coco: turba 1:1 (Mora, 2021).

### Número de hojas

A los 90 días de evaluación el análisis de varianza el número de hojas no presentó diferencias significativas por efecto del tipo de sustrato, concentración de humus e interacción de factores ( $P > 0.05$ ) cuyo coeficiente es de 4.16 %, el número de hojas en promedio fue de 4.7 hojas/planta.

## CONCLUSIONES

En la fase de enraizamiento en la longitud de las raíces fue más propicia con 3 y 6 mg L<sup>-1</sup> de AIA; en relación al número de raíces la combinación con 70 g L<sup>-1</sup> sacarosa y 6 mg L<sup>-1</sup> de AIA promueve 6.10 raíces. La altura de las plantas se vio favorecida con 3 mg L<sup>-1</sup> de AIA (4.27 cm), el número de hojas se desarrolló de manera más efectiva con 30 y 50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa respectivamente (de 5.35 y 5.32).

En la fase de aclimatación, la sobrevivencia fue al 100 % de platines. La altura de las plantas presentó una respuesta adecuada con musgo (*Sphagnum*) y fibra de coco (*Cocos nucifera* L.) de 8.5 y de 7.8 cm y no se presentó diferencias en cuanto al número de hojas en cuanto al sustrato. La supervivencia de las plantas aclimatadas depende mucho de los componentes de los sustratos, ya que de estos depende su aclimatación.

## BIBLIOGRAFÍA

Amador-Alfárez, KA; Díaz-González J; Loza-Comejo S; Bivián-Castro EY. 2013. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae) (en línea). Polibotánica. 109-3. Consultado 02 sept. 2023. Disponible en

- [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682013000100007](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682013000100007)
- Barsanti, MV; Lallana, VH. 2013. Cultivo in vitro y aclimatación de plantas de un híbrido del género *Cattleya* (Orchidaceae). XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores. Corrientes, 14 a 16 de octubre de 2013.
- Billard, CE; Barsanti, MV; Lallana, VH. 2014. Cultivo in vitro y aclimatación de plantas de *Polystachya* concreta (Orchidaceae) (en línea). Revista FABICIB 18:95-106. Consultado 05 oct. 2023. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/282449802\\_Cultivo\\_in\\_vitro\\_y\\_aclimatacion\\_de\\_plantas\\_de\\_Polystachya\\_concreta\\_Orchidaceae](https://www.researchgate.net/publication/282449802_Cultivo_in_vitro_y_aclimatacion_de_plantas_de_Polystachya_concreta_Orchidaceae)
- Carranza-Álvarez, C; Trinidad-García, KL; Reyes-Hernández, H; Castillo-Pérez, LJ; Fortanelli-Martínez, J. 2021. Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación in vitro de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae) (en línea). Biotecnia 23(1):5-12. Consultado 11 ene. 2024. Disponible en <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.805>
- Garay-Arroyo, A; Paz, M, García-Ponce, B; Álvarez-Buylla, E y Gutiérrez, C. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis Thaliana* (en línea). Rev. educ. bioquím 33(1). Ciudad de México. Consultado 02 feb. 2024. Disponible en [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952014000100003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003)
- Gisbert, MC; Picó, MB. 2015. Micropropagación (en línea). Universitat Politècnica de Valencia. Consultado 22 nov. 2023. Disponible en <http://hdl.handle.net/10251/51895>
- Gilsanz, JC. 2007. Hidroponía. Montevideo: Unidad de comunicación y transferencia de tecnología, 2007. pp. 32.
- González, K. 2003. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Instituto tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Informe de práctica de especialidad. Cartago.
- Gómez, DC; Vasco, CA. 2020. Evaluación del enraizamiento in vitro y aclimatación de plántulas de la orquídea *Epidendrum ibaguense* (en línea). Tesis de Lic. Universidad Militar de Nueva Granada. Consultado 08 mar. 2023. Disponible en <https://repository.unimilitar.edu.co/handle/10654/35961?show=full>
- Guato, L. 2014. Influencia de cuatro tipos de sustratos en la fase inicial de desarrollo de dos especies de orquídeas (*Dendrobium earsakul* y *Dendrobium sky blue*), escuela superior politécnica de Chimborazo obtenidas por cultivo in vitro" (en línea). Riobamba, Ecuador. Consultado 28 de mar 2022. Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3307/1/13T0787%20.pdf>
- Gutiérrez, L; León, MY; Collantes, B. 1988. Manual De cultivo de orquídeas. Perú.
- Javi. 2017. Guía de Jardinería. Obtenido de guía para decorar (en línea). Consultado 11 oct. 2023. Disponible en [www.guiaparadecorar.com](http://www.guiaparadecorar.com)
- Jiménez, I. 2009. Proyecto Epifitas. Responsable botánico del proyecto del Herbario Nacional de Bolivia.
- Jiménez-Mariña, L; Fonseca-Arias, M; García-Alcántara, A; Infante-Fonseca, S; Vázquez-Rodríguez, J. 2019. Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en el enraizamiento in vitro de *Dahlia* sp. (en línea). Cultivos Tropicales 40(1). Ediciones INCA. Consultado 09 nov. 2023. Disponible en <https://www.redalyc.org/journal/1932/193261173011/html/>
- Mamani, B; Chalco, V; Pillco, HC; Nova Pinedo, M. 2023. Propagación in vitro y en vivero de *Baccharis incarum* para revegetación en taludes de carretera Senkata y Mantecani (en línea). La Paz, Bolivia. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales 10(2):61-70. Consultado 11 feb. 2024. Disponible en <https://doi.org/10.53287/okiz7115eh43c>
- Mendieta, JM. 2013. Inducción al enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de orquídea (*Epidendrum quinquepartitum* Schltr.) con distintos niveles. Tesis en licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.
- Mora, Y. 2021. Morfogénesis in vitro de *Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins (en línea). Tesis de Posgrado Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Consultado 08 mar. 2024. Disponible en [http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/4619/Mora\\_Cruz\\_Yazmin\\_MC\\_Fisiologia\\_Vegetal\\_2021.pdf;jsessionid=C6A2499D8158AF60DCDBB5C74C1FAFF4?sequence=1](http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/4619/Mora_Cruz_Yazmin_MC_Fisiologia_Vegetal_2021.pdf;jsessionid=C6A2499D8158AF60DCDBB5C74C1FAFF4?sequence=1)
- Paz da Silva, R; Villegas, A. 2009. Niveles de sacarosa en el enraizamiento in vitro y aclimatización ex vitro de plántulas del portainjerto de vid R110 (*vitis rupestris*' *vitis berlandieri*) (en línea). INCI 34(12) Caracas. Consultado 12 oct. 2023. Disponible en [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442009001200012](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009001200012)
- Rangel-Estrada, SE; Canul-Ku, J; Osuna-Canizalez, F; García-Perez, F; Rosario-Montes, P; Vences, ÁSB; Hernández-Meneses, E. 2015. Regeneración in vitro de híbridos de nochebuena vía organogénesis. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6(7):1571-85.
- Raya-Montaño, YA; Carrillo-Castañeda, G; Pedraza-Santos, ME; Corona-Torres, T; Carrillo-Salazar, JA; Alcantar-González, G. 2011. Propagación in vitro de *Laelia halbingeri* (en línea). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, núm. 3, noviembre-diciembre, pp. 539-553 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Estado de México. Consultado 22 dic. 2023. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263122300011.pdf>
- Salisbury, F. 2000. Fisiología de las Plantas 3: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Madrid, España: International Thomson Editores.
- Tombion, L. 2023. El cultivo de tejidos vegetales y su empleo en plantas y cultivares ornamentales INTA (en línea). Consultado 05 nov. 2023. Disponible en [https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/15686/INTA\\_CIRN\\_InstitutodeFloricultura\\_Tombion\\_El\\_cultivo\\_de\\_tejidos\\_vegetales\\_y\\_su%20empleo.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/15686/INTA_CIRN_InstitutodeFloricultura_Tombion_El_cultivo_de_tejidos_vegetales_y_su%20empleo.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Zettler, LW.; Stewart, SS; Bowles, LM; Jacobs, AK. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera Leucophaea* (Nuttall) Lindley. The Am. Midland Nat. 145:168-17.

Artículo recibido en: 24 de mayo del 2024

Aceptado en: 25 de agosto del 2024