

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Propagación in vitro de *Pleurothallis pulchella* y *Caucaea olivacea*, dos especies de orquídeas nativas del Ecuador.

Diana Berenice Sierra Maigua

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre del 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Propagación in vitro de *Pleurothallis pulchella* y *Caucaea olivacea*, dos especies de orquídeas nativas del Ecuador.

Diana Berenice Sierra Maigua

Miguel Orellana Carrión, MSc., MD.

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Diana Berenice Sierra Maigua

Código: 00215493

Cédula de identidad: 1724833940

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Las orquídeas son diversas y cosmopolitas, con alrededor de 700 géneros y más de 25,000 especies, con morfologías variadas. Se desarrollan en diferentes nichos ya sean terrestres o epífitas. Estas pueden exhibir colores, formas y aromas diversos. Las semillas de orquídeas, al no poseer endospermo requieren del vínculo con hongos micorrícicos para desarrollarse en la naturaleza. El cultivo *in vitro* asimbiótico puede ser una alternativa para impulsar su propagación. Se seleccionaron dos especies de orquídeas, *Pleurothallis pulchella* y *Caucaea olivacea*, para experimentos de cultivo *in vitro* e inducción de germinación asimbiótica. El estudio tiene como objetivo evaluar los efectos de distintas composiciones de medios de cultivo para la germinación y desarrollo de sus semillas y elongación (crecimiento) de protocormos en fase 5. Los resultados indican porcentajes variables de germinación para *P. pulchella* (20.11%) y *C. olivacea* (55,70%) en el medio ½ MS con carbón activado y Phytamax con carbón activado respectivamente. El desarrollo de protocormos, *P. pulchella* presentó 45,75% en base a la germinación (177 protocormos), mientras que *C. olivacea*, se identificó que el medio Phy con carbón activado con GA₃ generó la mayor cantidad de protocormos en fase 5 (124 protocormos). Para los ensayos de elongación, cada especie mostró respuestas específicas hacia los medios de cultivo con sus aditivos, siendo el mejor medio MS con carbón activado y GA₃ para *C. olivacea*, mientras que para *P. pulchella*, no se evidenciaron diferencias entre los medios de cultivo probados. La comparación entre orquídeas terrestres y epífitas reveló diferencias en las tasas de germinación y el desarrollo de protocormos.

Palabras clave: Orquídeas, cultivo *in vitro*, germinación asimbiótica, *Pleurothallis pulchella*, *Caucaea olivacea*, medio de cultivo.

ABSTRACT

Orchids are diverse and cosmopolitan, with about 700 genera and more than 25,000 species, with varied morphologies. They develop in different niches, either terrestrial or epiphytic. They can exhibit diverse colors, shapes and scents. Orchid seeds, not having endosperm, require the link with mycorrhizal fungi to develop in nature. *In vitro* asymbiotic culture can be an alternative to promote their propagation. Two orchid species, *Pleurothallis pulchella* and *Caucaea olivacea*, were selected for *in vitro* culture experiments and asymbiotic germination induction. The study aims to evaluate the effects of different culture media compositions on the germination and development of their seeds and elongation (growth) of protocorms at stage 5. The results indicate variable germination percentages for *P. pulchella* (20.11%) and *C. olivacea* (55.70%) on ½ MS medium with activated charcoal and Phytamax with activated charcoal, respectively. The development of protocorms, *P. pulchella* presented 45,75% based on germination (177 protocorms), while *C. olivacea*, it was identified that the Phy medium with activated charcoal with GA3 generated the highest amount of protocorms in phase 5 (124 protocorms). For the elongation assays, each species showed specific responses to the culture media with their additives, being the best MS medium with activated charcoal and GA3 for *C. olivacea*, while for *P. pulchella*, no differences between the culture media tested were evident. The comparison between terrestrial and epiphytic orchids revealed differences in germination rates and protocorm development.

Key words: *Orchids, Pleurothallis pulchella, Caucaea olivacea, in vitro culture, asymbiotic germination, culture media.*

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MÉTODOS.....	15
2.1 Recolección y Almacenamiento del Material Inicial.....	15
2.2 Desinfección de Semillas a partir de Cápsulas Frescas	15
2.3 Introducción de Semillas al Cultivo <i>In Vitro</i>	15
2.4 Desarrollo de protocormos en fase 5	16
2.5 Análisis de datos	16
3. RESULTADOS	18
3.1 Germinación asimbiótica y desarrollo de protocormos	18
3.1.1 <i>Pleurothallis pulchella</i>	18
3.1.2 <i>Caucaea olivacea</i>	18
3.2 Elongación de protocormos fase 5	19
3.2.1 <i>Pleurothallis pulchella</i>	19
3.2.2 <i>Caucaea olivacea</i>	20
4. DISCUSIÓN.....	22
4.1 Germinación asimbiótica y desarrollo de protocormos	22
4.1.1 <i>Pleurothallis pulchella</i>	22
4.1.2 <i>Caucaea olivacea</i>	23
4.2 Elongación de protocormos fase 5	24
4.2.1 <i>Pleurothallis pulchella</i>	24
4.2.2 <i>Caucaea olivacea</i>	25
5. CONCLUSIONES.....	26
6. TABLAS.....	27
7. FIGURAS	31
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
9. ANEXOS	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Germinación y desarrollo de protocormos de <i>P. pulchella</i> de todos los ensayos realizados.	26
Tabla 2. Germinación y desarrollo de protocormos de <i>C. olivacea</i> de todos los ensayos realizados.	27
Tabla 3. Germinación total y desarrollo <i>in vitro</i> de semillas de <i>P.pulchella</i> provenientes del ensayo 2.	28
Tabla 4. Germinación total y desarrollo <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. olivacea</i> provenientes del ensayo 6.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultados de germinación y desarrollo de protocormos fase 5 de *P.pulchella*..31
- Figura 2.** Resultados de germinación y desarrollo de protocormos fase 5 de *C. olivacea*. A. Germinación en 12 semanas, B. Desarrollo de protocormos fase 5 en 24 semanas..... 31
- Figura 3.** Fotos referenciales de *P. pulchella*. A. Cápsula fresca, B. semillas no viables, C. Fase 0, D. Fase 1, E. Fase 2, F. Fase 3, G. Fase 4, H. Fase 5 32
- Figura 4.** Fotos referenciales de *C. olivacea*. A. Cápsula fresca, B. semillas no viables, C. Fase 0, D. Fase 1, E. Fase 2, F. Fase 3, G. Fase 4, H. Fase 5 32
- Figura 5.** Resultados elongación en diferentes medios en *P.pulchella* durante 60 días 33
- Figura 6.** Resultados elongación en diferentes medios en *C.olivacea* durante 60 días 33

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO BASALES.....	40
ANEXO 2: CICLO DE VIDA DE UNA EPÍFITA (<i>LAELIA</i>).....	41
ANEXO 3: FASES DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO INICIAL DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS	41

1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas forman parte del orden Asparagales, compartiendo similitudes con las plantas del orden Liliales, y este conjunto abarca un total de 30 familias (Ordóñez, 2016). La familia Orchidaceae es uno de los grupos taxonómicos con el mayor número de especies documentadas (Chemisquy, 2010). Aproximadamente 700 géneros y más de 25,000 especies de orquídeas se presentan en todo el mundo, consideradas cosmopolita por habitar en la mayoría de las regiones alrededor del mundo (Tamay et al., 2020).

La morfología de las especies de orquídeas difiere en colores, formas y aromas, desde pequeñas orquídeas terrestres hasta epífitas que crecen sobre árboles y rocas (Vázquez, 2019). Sus hojas son variadas en forma y tamaño, la flor indica tres pétalos y tres sépalos importantes para atraer a los polinizadores; generalmente las flores se agrupan en inflorescencias (tallo o raquis), dependiendo de su posición en este se considera a la flor basal, apical o axilar (Freuler, 2008). Las semillas de las orquídeas son muy pequeñas semejantes al polvo, no son endospermicas y precisan de una simbiosis con hongos micorrísticos para germinar en la naturaleza (Koene et al., 2020). Al no poseer endospermo las semillas pasan por una fase inicial no fotosintética donde obtienen el carbono orgánico de las micorrizas mediante el intercambio simbiótico (Smestad, 2010), que comprende a las hifas de los hongos micorrísticos generando estructuras en espiral denominadas pelotones en la zona parenquimatosa del tejido cortical de las raíces, los cuales serán funcionales durante periodos (Chemisquy, 2010), suministrando a las orquídeas con otros nutrientes además del carbono, como nitrógeno y fósforo (Smestad, 2010). En lugar de poseer endospermo, un espacio aéreo envuelve el pequeño embrión globular protegido por una testa membranosa, una característica única de las semillas de orquídeas que varía dependiendo la especie (Koene

et al., 2020). Las orquídeas epífitas utilizan árboles como forófito, pero adicionalmente estos aportan carbono orgánico a las orquídeas micobiontes, a través de raíces ectomicorrícicas y restos de hojarasca y leña, útiles para los micobiontes saprótrofos (Rasmussen et al., 2015). Además, los factores abióticos como la temperatura y la humedad también son un punto clave porque generan señales estacionales que liberan latencia de las semillas para potenciar su germinación (Rasmussen et al., 2015).

Pleurothallis pulchella, es una especie de orquídea que se destaca por su pequeño tamaño. Sus hojas son generalmente pequeñas y lanceoladas, mientras que las flores son diminutas y presentan una paleta de colores variados (Karremans, 2019). *P. pulchella* se desarrolla en el suelo en hábitats específicos, como bosques tropicales y zonas de sotobosque. Posee tallos de hasta 20 cm de altura, con inflorescencias que llevan flores de 4-6 mm de largo. Es nativa de los Andes y crece a altitudes de 2000 a 3500 metros (Prada, 2023).

Caucaea olivacea es una especie epífita que se encuentra típicamente en altitudes que oscilan entre los 2300 y 3960 metros en Colombia y Ecuador, especialmente en bosques montanos frescos y húmedos, así como en los bosques nublados de alta montaña de los Andes (Albán & Toapanta, 2019). Sus características distintivas incluyen pseudobulbos agrupados de forma ovalada y color verde opaco, con crestas longitudinales en los lados, y hojas apicales (Szlachetko & Kolanowska, 2015). Esta orquídea tiene la notable capacidad de florecer durante todo el año, produciendo inflorescencias basales delgadas que pueden ser erectas o pendientes, alcanzando longitudes de 40 a 80 cm y llevando de 8 a 12 flores vistosas (IOSPE PHOTOS, s .f.).

La preservación de las orquídeas en Ecuador es crítica debido a su abundancia y diversidad, incluyendo muchas especies endémicas en peligro por la degradación del hábitat

y la influencia humana (Olórtegui, 2018). Ecuador alberga 1707 especies, con la familia Orchidaceae liderando esta lista (León, 2014). En Ecuador, la Reserva Geobotánica Pululahua, ubicada en la provincia de Pichincha, es un sitio de conservación destacado por conservar flora y fauna nativa en una superficie de 3,383 hectáreas y se encuentra en un cráter volcánico inactivo (Zafirir & Rodríguez, 2014). Pululahua es un bosque nublado que alberga una asombrosa variedad de orquídeas, incluyendo especies endémicas. La conservación en Pululahua es esencial para preservar estos hábitats únicos y las orquídeas que los habitan (Sánchez et al., 2018).

La supervivencia de las orquídeas está sujeto a un conjunto de factores bióticos y abióticos que influyen en su desarrollo, sin embargo, experimentan un futuro ambiguo en consecuencia del cambio climático, la pérdida de hábitat y sobrexplotación (Koene et al., 2020). Por este motivo, la germinación asimbiótica es una opción, al ser un proceso más independiente, donde las semillas pueden germinar en un medio de cultivo con nutrientes sin la necesidad de una asociación simbiótica (Dutra et al., 2009). Las condiciones *in vitro* se consideran una opción para la propagación y preservación, siendo la germinación asimbiótica un enfoque óptimo para comprender el desarrollo de semillas y plántulas (Koene et al., 2020). La germinación asimbiótica se justifica en muchos casos, debido a su mayor eficiencia y menor dependencia factores bióticos, siendo más controlable para ciertos procesos de propagación (Otero & Bayman, 2009).

Este estudio tiene como objetivo introducir semillas de *Pleurothallis pulchella* y *Caucaea olivacea* a condiciones *in vitro* con la finalidad de inducir una germinación asimbiótica y evaluar su desarrollo. Además, investigar los efectos de cada uno de los

tratamientos (medios de cultivos) con y sin la presencia de carbón activado y GA₃ sobre la germinación, desarrollo de protocormos y la etapa de elongación de estas dos especies.

2. MÉTODOS

2.1 Recolección y Almacenamiento del Material Inicial

Se identificaron morfológicamente *Pleurothallis pulchella* y *Caucaea olivacea* en la Reserva Geobotánica Pululahua. Se recolectaron cápsulas frescas y maduras de ambas especies en febrero de 2023 bajo autorización de investigación MAATE-ARSFC-2022-2445 otorgada por el Ministerio del Ambiente, Agua y Turismo del Ecuador (MAATE). Las cápsulas se transportaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ para su conservación y procesamiento.

2.2 Desinfección de Semillas a partir de Cápsulas Frescas

Las cápsulas de *C. olivacea* y *P. pulchella* se desinfectaron superficialmente en una cámara de flujo laminar (Labconco Purifier Clean Bench) con una solución de etanol al 70% por 5 minutos. Luego, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% con 4 gotas de detergente Tween-20® durante 15 minutos, seguido de 4 enjuagues con agua destilada estéril.

2.3 Introducción de Semillas al Cultivo In Vitro

Las cápsulas previamente desinfectadas se cortaron longitudinalmente con la ayuda de un bisturí y pinzas dentro de la cámara de flujo laminar para extraer las semillas. Estas fueron dispersadas homogéneamente en la superficie de distintos medios de cultivo para cada especie, tomando en cuenta tres medios basales: Murashige and Skoog (MS), Knudson C (KC) y Phytamax (Phy) (ANEXO 1). En el caso de *P. pulchella*, basándose en un estudio previo realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ, determinó que el medio ½ MS+CA (carbón activado) es el que proporciona mayor porcentaje de germinación,

por tanto, se utilizó en el presente estudio. Mientras que para *C. olivacea*, como no ha sido sujeta a experimentación previa, se utilizaron 9 medios de cultivo: MS; MS+CA; MS+CA+GA₃ (0.2 mg L⁻¹ de ácido giberélico-3); KC; KC+CA; KC+CA+GA₃; Phy; Phy+CA; Phy+CA+GA₃. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave (BIOBASE BKQ-BL) por 15 min a 120°C y 20 psi, y dispensados en cajas Petri de plástico estériles de 60 x 15 mm. Se realizó subcultivos en un medio fresco cada 3 meses, utilizando la misma composición del medio donde inició su germinación. Los datos se tomaron cada 3 semanas en el estereomicroscopio (Nikon SMZ745T) con cámara digital (Major MS60), hasta las 12 semanas en cultivo. Los cultivos se mantuvieron en una cámara climática (BIOBASE, BJPX-400II) a 23 ± 1°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y 75% de humedad relativa.

2.4 Desarrollo de protocormos en fase 5

Los ensayos de elongación se llevaron a cabo con los protocormos fase 5 desarrollados durante 24 semanas en los distintos medios de cultivo de cada una de las especies, tomando en cuenta los mejores medios para germinación y desarrollo de protocormos, se utilizó los medios de cultivo ½ MS + CA+ GA₃; KC + CA; KC + CA + GA₃ para *P. pulchella* y MS + CA+ GA₃; Phy; Phy + CA; Phy + CA + GA₃ para *C. olivacea*. La toma de datos se realizó en una cámara de flujo de laminar, donde se tomaron las fotos de material vegetal cada 30 días durante 2 meses con ayuda de un celular y previo a su subcultivo a un medio fresco. Los cultivos se mantuvieron en repisas dentro de un cuarto de cultivo a 23 ± 1°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

2.5 Análisis de datos

En cuando a la germinación total, para los ensayos de *C. olivacea* las semillas fueron cultivadas en 4 cajas Petri por medio de cultivo y para los ensayos de *P. pulchella* se utilizaron 13 cajas Petri del medio de cultivo para el cultivo. Para evaluar la germinación y desarrollo de protocormos, se identificó la fase de germinación de cada semilla en base a la referencia descrita por Seaton & Ramsay (2005) (ANEXO 2). En la toma de datos de germinación, las primeras fases de desarrollo se tomaron imágenes en 5X y posteriormente en 2X según el estado de desarrollo de cada semilla o protocormo. Para las dos especies la cantidad de campos se mantuvo en 6 campos aleatorios por caja Petri por medio de cultivo. Las semillas en sus distintas fases de germinación se las contabilizaron con el software Dot dot goose (versión 1.6.0) (Ersts, 2023) y posteriormente importados a MS Excel (versión 2102) y GraphPad Prism (versión 10.1.1) para su análisis. Para la germinación se consideró a “Germinación total” como variable de respuesta y para el desarrollo de protocormos se consideró los porcentajes de cada fase de desarrollo como variables de respuestas.

Respecto a los ensayos de elongación, para *P. pulchella* y *C. olivacea* se utilizaron 108 y 144 protocormos fase 5 respectivamente, los cuales se distribuyeron 6 protocormos por frasco y 6 frascos por medio de cultivo, respectivamente por especie. Los datos se tomaron con ayuda de una cámara de celular y una regla, estos datos se analizaron utilizando Image J (versión 1.54d) (Schneider, et al., 2012), donde se midió el tamaño del brote, tamaño de raíces y número de hojas, como variables de respuesta.

Los datos presentados se basaron en las diferencias de medidas como medida tendencia central y se calculó la desviación estándar de cada uno. Posteriormente, para observar diferencias entre los medios de cultivo y desarrollo de los brotes, se realizaron ANOVA de una sola vía, seguido de pruebas de comparación múltiple de Tuckey.

3. RESULTADOS

3.1 Germinación asimbiótica y desarrollo de protocormos

3.1.1 *Pleurothallis pulchella*

Para esta especie, se lanzaron 8 ensayos (Tabla 1) a partir de febrero 2023, sin embargo, para los análisis posteriores solo se utilizó un ensayo (Ensayo 6) tomando en cuenta el tiempo en cultivo, porcentaje de germinación y cantidad de protocormos fase 5 formados.

Se evaluó el estado germinativo en diferentes fases de la 0 a la 5 (ANEXO 3) utilizando únicamente el medio $\frac{1}{2}$ MS + CA, después de 12 semanas en cultivo. La germinación total obtenida fue del 20,11% en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS + CA, al evaluar un total de 1357 semillas (Tabla 3, A; Figura 1). En base a la cantidad de protocormos (fase 5), que se determinó hasta las 24 semanas en cultivo, se obtuvo un promedio del 45,75% en base al total de semillas germinadas (Tabla 3, B; Figura 1). Adicionalmente, se observó que la fase 5 presentó la mayor cantidad de protocormos (177 protocormos) a diferencia de las fases 3 y 4 que presentaron la menor cantidad de protocormos (Tabla 3, B).

3.1.2 *Caucaea olivacea*

Para esta especie, se lanzaron 6 ensayos (Tabla 2) a partir de febrero 2023, sin embargo, para los análisis posteriores únicamente se tomó en cuenta un ensayo (Ensayo 2) en base a diversas variables como el tiempo en cultivo, porcentaje de germinación y cantidad de protocormos fase 5 formados.

La germinación total y desarrollo de protocormos se evaluó mediante promedios de la cantidad de semillas en diferentes fases de la germinación de la 0 a la 5 (ANEXO 3) en diferentes medios de cultivo durante 12 semanas en cultivo. Con un nivel de confianza del

95%, los mayores promedios en cuanto a la germinación total se observaron en los medios cultivo Phy (55%), KC + CA (50,52%) y Phy + CA + GA₃ (44,47%) ($p < 0,0001$) (Tabla 4, A; Figura 2A).

Después de analizar el desarrollo de protocormos durante 24 semanas, bajo un nivel de confianza del 95%, los promedios con mayor cantidad de protocormos en fase 5 se observaron en los medios MS + CA + GA₃ (69,23%), Phy + CA + GA₃ (52,63%), MS + CA (40%), Phy (10,83%), y KC + CA (3,51%) en base al total de semillas germinadas ($p < 0,0001$) (Tabla 4, B; Figura 2, B). Adicionalmente, los medios de cultivo con menor promedio de protocormos en fase 5 fueron KC (0,83%), KC + CA + GA₃ (0%) y MS (1,94%) (Tabla 4, B; Figura 2, B). A pesar de que existieron cinco medios de cultivo con la misma respuesta significativa, los tres medios con mayor promedio en desarrollo de protocormos fase 5 fueron utilizados para los ensayos de elongación. De igual manera, como un patrón general de todos los medios de cultivo, se observó que la mayoría de protocormos se desarrollaron en la fase 4 y 5 (Tabla 4, B).

3.2 Elongación de protocormos fase 5

3.2.1 *Pleurothallis pulchella*

Para la elongación de protocormos en fase 5, se evaluaron los promedios de las variables de respuesta “Longitud de brote”, “Número de hojas” y “Número de raíces” en diferentes medios de cultivo durante 60 días. El medio de cultivo con mayor promedio de crecimiento en los brotes durante los 30 primeros días fue KC + CA a diferencia de los otros dos tratamientos utilizados para este análisis (½MS con carbón activado y con 0.2 mg L⁻¹ de GA₃ y KC con carbón activado y con 0.2 mg L⁻¹ de GA₃) que se obtuvo un menor crecimiento,

sin embargo, hasta los 60 días se observa una disminución de la tendencia de crecimiento de los brotes de todos los tratamientos analizados (Tabla 3, C; Figura 5), también considerando que algunos protocormos fueron descartados. Estos valores son significativos bajo un nivel de confianza del 95%. Adicionalmente, el mayor promedio de número de hojas del brote se obtuvo con el medio de cultivo KC con carbón activado y GA₃ (3,34) mientras que el mayor promedio del número de raíces se presentó con ½ MS con carbón activado y GA₃ (3,26) (Tabla 3, C)

3.2.2 *Caucaea olivacea*

Tomando en cuenta que en todos los medios de cultivo se observó germinación y desarrollo de protocormos, para esta especie, se evaluaron las mismas variables de respuesta descritas anteriormente para la especie *P. pulchella* en el mismo periodo de 60 días. Respecto a elongación se analizaron cuatro tratamientos (MS + CA + GA₃ y todas las combinaciones con el medio basal Phy). El medio de cultivo con mayor promedio de crecimiento durante los 30 primeros días fueron Phy + CA y Phy + CA + GA₃ a diferencia de los otros dos tratamientos utilizados para este análisis (Phy y MS + CA + GA₃), sin embargo, para los 60 días se observa una disminución en el tamaño de los brotes desarrollados en los medios de cultivo Phy + CA + GA₃. Los otros medios basados en Phy no mostraron una tendencia de crecimiento alto a partir del día 30, sin embargo, se identifica que el mejor resultado corresponde a los brotes desarrollados en el medio de cultivo MS + CA + GA₃ (Tabla 4,C; Figura 6), porque mantiene una tendencia positiva a lo largo del tiempo, es decir una mayor proyección de crecimiento, bajo un nivel de confianza del 95% estos valores son significativos. Además, el mayor promedio de número de hojas del brote se obtuvo con los

medios de cultivo MS + CA + GA₃ y Phy + CA + GA₃ (2,72 y 2.8 respectivamente), mientras que el mayor promedio del número de raíces se presentó con Phy + CA (0,19) (Tabla 4, C).

4. DISCUSIÓN

4.1 Germinación asimbiótica y desarrollo de protocormos

Se conoce que el cultivo *in vitro* de orquídeas mejora la eficacia de germinación al conseguir que las semillas germinen en una cantidad superior al 70% en orquídeas epifitas, en contraste condiciones *ex vitro* que pueden conseguir rangos menores de hasta 5% de germinación (Koene et al., 2020). En el presente estudio se obtuvo 55% de germinación para la especie epifita y 20,11% para la especie terrestre, estos porcentajes son buenos resultados tomando en cuenta otros estudios donde se ha reportado que una especie de orquídea epifita (*O. pentadactylon*) en el medio de cultivo óptimo obtuvo un 43% de germinación, y una especie de orquídea terrestre (*E. capitatus*) obtuvo 26% de germinación bajo condiciones *in vitro* asimbióticas (Oña, 2020).

4.1.1 *Pleurothallis pulchella*

Para *P. pulchella* el porcentaje de germinación fue inferior en comparación al obtenido por Valencia (2019), que a las 12 semanas obtuvo 62,99% con el medio ½ MS con carbón activado, sin embargo, esto posiblemente a causa de factores no controlados durante la realización del estudio como, el estadio de las cápsulas o la temporada de recolección del material vegetal utilizado para cada uno de los ensayos. Esto puede establecer la viabilidad de las semillas en su interior, ya que el uso de semillas de orquídeas inmaduras determina un estado óptimo de desarrollo (Vasudevan & Staden, 2010). Las semillas óptimas para una germinación eficiente son las que empiezan a madurar y no han comenzado la deshidratación para la dispersión (Mensa, et al., 1989). Respecto al desarrollo de protocormos, *P. pulchella* generó aproximadamente 177 protocormos fase 5 a pesar de su bajo porcentaje de

germinación. En un estudio previo con 4 especies de orquídeas terrestres (*Anacamptis*) se determinó que el desarrollo de protocormos fue óptimo y rápido con el medio de cultivo BM-1 (Terrestrial Orchid Medium) que contiene nitrógeno orgánico, logrando diferenciar las hojas en los brotes de 3 a 4 semanas a partir de la siembra en condiciones *in vitro* (Margrini, et al., 2018). Tomando en cuenta esto, es posible que para el desarrollo de protocormos a diferencia de la germinación, *P. pulchella* requiera de otros nutrientes presentes en medios de cultivo específicos para orquídeas terrestres.

4.1.2 *Caucaea olivacea*

En el caso de *C. olivacea*, podemos determinar que para la germinación los tratamientos basados en KC y Phy demuestran mayores promedios de germinación a diferencia de MS. Una posible explicación se puede deber a que el medio MS contiene concentraciones más altas de nutrientes en contraste con los otros medios de cultivo (KC y Phy), lo que posiblemente inhibe el desarrollo germinativo; ya que las orquídeas epifitas para su crecimiento óptimo obtienen los minerales en concentraciones bajas provenientes del agua de lluvia que se escurre por las ramas de los árboles en la naturaleza, por tanto, son intolerantes al exceso de minerales y sales (Bacuilima, 2015). Según Duarte (2014), en los primeros estadios de germinación las orquídeas requieren de agua para que su embrión se ensanche, las células crezcan y rompan la testa; pero, después de la germinación, es esencial la disposición externa de glúcidos para la organogénesis en su hábitat natural, y vitaminas, aminoácidos, sales inorgánicas, etc.

C. olivacea muestra altos promedios de desarrollo de protocormos fase 5 en la mayoría de las combinaciones probadas, lo que significa que todos los medios basales

probados tienen los nutrientes y minerales que necesita esta especie para esta etapa de desarrollo, sin embargo, el carbón activado y GA₃ son los que influyen directamente en las diferencias entre los tratamientos. Pero podemos recalcar, que los tratamientos establecidos en base a Phy son los mejores para el desarrollo de los protocormos fase 5, en comparación a los otros medios de cultivos probados. Este fenómeno también se lo evidenció en estudios similares donde el Phy mostró una mayor germinación, multiplicación de protocormos y generación de plántulas a *Vanda coerulea* (orquídea epífita) (Roy, et al., 2011). En cuanto a los componentes nutricionales, en la propagación de especies de la familia *Orchideae* en cultivo *in vitro*, el nitrógeno se considera el nutriente más importante en los medios de cultivo (Tavares, et al., 2012). Según Mitra, durante la germinación de semillas de *Brassia verrucosa* (orquídea epífita) la mejor fuente de nitrógeno es el nitrato de amonio (1987), presente tanto en Phy como en MS.

4.2 Elongación de protocormos fase 5

4.2.1 *Pleurothallis pulchella*

Respecto a elongación, *P. pulchella* solo demostró resultados positivos durante los 30 primeros días de análisis, posiblemente los medios de cultivo seleccionados no fueron ideales para esta etapa debido a las composiciones nutricionales. Se afirma que los hongos micorrícicos favorecen el desarrollo postgerminación y en algunas especies este apoyo no es crítico durante la germinación, pero si necesario para garantizar un mayor desarrollo de protocormos y plántulas, por tanto, es probable que la composición óptima de nutrientes requerida sea diferente a medida que avanza la germinación (Diantina et al., 2020). Entonces una alternativa para lograr el desarrollo de plántulas de *P. pulchella* es la incorporación del hongo micorrícico. También, Stewart y Kane (2006) mencionan que la adición de

citoquininas exógenas es importante para el desarrollo de protocormos. Sin embargo, se puede probar otros tratamientos con diferentes concentraciones de los nutrientes requeridos. En un estudio previo de Diantina et al., *Dendrobium strebloceras* (especie de orquídea terrestre) presentó un consistente crecimiento de plántulas, así como su altura, hojas y raíces con el medio de cultivo ½ MS con la adición de 2% de sacarosa (2020).

4.2.2 *Caucaea olivacea*

Los brotes de *C. olivacea* mostraron buenos resultados con el medio MS con carbón activado y con GA₃ a lo largo del tiempo, sin embargo, los medios basados en Phy para esta etapa no son los óptimos, posiblemente en esta etapa esta especie requiere de concentraciones de nutrientes más altas en contraste con Phy; adicionalmente el desarrollo de raíces fue lento comparando con *P.pulchella*. Según un estudio de Kabir et al., ½ MS con 1,0 mg/l de ácido indol-3-acético (IAA) fue exitoso para inducir el crecimiento de raíces adventicias en plántulas de *Dendrobium fimbriatum* (especie epífita) micropropagadas (2013). Esto también corresponde a lo mencionado por Knudson, depende de la especie de orquídea la variación del tiempo que requiere el desarrollo de cada estadio o fase (Duarte, 2014). Existen diversos factores que no se controlaron y posiblemente afectaron la germinación y desarrollo de las semillas de orquídeas como: el estado de maduración de la cápsula corresponde a la obtención de semillas maduras o inmaduras. Si los embriones son inmaduros implica condiciones especiales que difieren a los medios de cultivo utilizados comúnmente para la germinación asimbiótica (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2016). El tratamiento térmico (autoclave) de los medios de cultivo complejos en ocasiones puede provocar la pérdida de nutrientes por degradación térmica o reacciones químicas entre componentes (Trivedi, et al., 2015).

5. CONCLUSIONES

Se logro el cultivo in vitro asimbiótico de dos especies nativas del Ecuador, *Pleurothallis pulchella* y *Caucaea olivacea*, es decir logramos que las semillas de estas especies germinen, desarrollen sus embriones hasta protocormos y formen plántulas, estableciendo el medio de cultivo más eficiente para cada una de estas etapas.

Respecto al porcentaje de germinación para *Pleurothallis pulchella* se obtuvo un 20.11% y *Caucaea olivacea* un 55% para los mejores medios de cultivo respectivamente.

Los medios de cultivo probados también funcionaron para el desarrollo de protocormos fase 5 de cada especie, en cuanto a *P. pulchella* con medio ½ MS con carbón activado logramos obtener aproximadamente 177 protocormos, mientras que para *C. olivacea* los medios de cultivo Phy, Phy con carbón activado y GA3, MS con carbón activado y GA3 fueron los óptimos para el desarrollo de protocormos de esta especie, de tal manera obtuvimos una cantidad aproximada de 153 protocormos que fueron utilizados para la etapa de elongación respectivamente para cada una de las especies del estudio.

Pleurothallis pulchella y *Caucaea olivacea* mostraron respuestas específicas a los tratamientos en la elongación, con *C. olivacea* se determinó que el mejor medio de cultivo para esta etapa es MS con carbón activado y GA3, sin embargo, *P. pulchella* no mostró resultados positivos para ningún de los tratamientos probados en elongación durante los 60 días, por tanto, se requiere mayor experimentación para la obtención de plántulas robustas.

Cabe mencionar que estos resultados requieren de optimización, pero son la base preliminar para su propagación y de esta manera fomentar el estudio de estas valiosas especies de la flora del Ecuador.

6. TABLAS

Tabla 1. Germinación y desarrollo de protocormos de *P. pulchella* de todos los ensayos realizados.

Ensayo	Germinación total (%± DE)*	Desarrollo de protocormos en fase 5 (%± DE)**
1	---	---
2	7 ± 0,30	(≈108 protocormos)
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	20,11±0,35	74,36±0,93 (≈177 protocormos)
7	---	---
8	22,09 ± 0,31	---

Los valores representan medias + desviación estándar (DE).

Los espacios sin datos representan que no existió germinación del ensayo respectivamente.

* La germinación total se calculó durante 12 semanas en cultivo.

**El desarrollo de protocormos en fase 5 se calculó durante 24 semanas en cultivo.

Tabla 2. Germinación y desarrollo de protocormos de *C. olivacea* de todos los ensayos realizados.

Ensayo	Germinación total (% ± DE)*	Desarrollo de protocormos en fase 5 (% ± DE)**
1	---	---
2	55,70 ± 1,66	69,23 ± 5,16 (≈144 protocormos)
3	---	---
4	5,35 ± 0,27	13,33 ± 5,33 (≈35 protocormos)
5	51,55 ± 1,77	2,85 ± 0,71 (≈62 protocormos)
6	---	---

Los valores representan medias + desviación estándar (DE).

Los espacios sin datos representan que no existió germinación del ensayo respectivamente.

* La germinación total se calculó durante 12 semanas en cultivo.

** El desarrollo de protocormos en fase 5 se calculó durante 24 semanas en cultivo.

Tabla 3. Germinación total y desarrollo *in vitro* de semillas de *P.pulchella* provenientes del ensayo 6.

Etapa del cultivo <i>in vitro</i>	Medio de cultivo			
	½ MS + CA	½ MS + CA + GA3	KC + CA	KC + CA + GA3
A. Germinación (%)*	20,11±0,35	---	---	---
B. Desarrollo protocormos (%)**				
Fase 0	0	---	---	---
Fase 1	0	---	---	---
Fase 2	2,10 ± 0,25	---	---	---
Fase 3	2,52 ± 0,19	---	---	---
Fase 4	5,46 ± 0,39	---	---	---
Fase 5	45,75±0,17	---	---	---
C. Elongación ***				
Longitud del brote (cm)	---	0,03±0,03	0,04±0,05	0,03±0,04
Número de hojas	---	2,96±0,76	3,13±0,89	3,34±1,71
Número de raíces	---	3,26±1,43	2,08±1,1	2,73±1,07

Los numerales A-C representan las diferentes etapas de desarrollo *in vitro* de semillas de *P.pulchella* cultivadas en distintos medios de cultivo. Los valores representan medias + desviación estándar (DE) de 798 semillas en promedio.

*La germinación total se calculó durante 12 semanas en cultivo.

**El desarrollo de protocormos se calculó durante 24 semanas en cultivo

***La elongación está basada en el crecimiento durante 60 días.

Tabla 4. Germinación total y desarrollo *in vitro* de semillas de *C. olivacea* provenientes del ensayo 2.

Etapa del cultivo <i>in vitro</i>	Medio de cultivo								
	MS	MS+CA	MS+CA+GA3	KC	KC+CA	KC+CA+GA3	Phy	Phy+CA	Phy+CA+GA3
A. Germinación total (%)*	1,68±0,23	16,98±0,46	6,79±0,29	17,22±0,30	50,52±1,24	3,01±0,12	55,70±1,66	---	44,47±3,11
B. Desarrollo protocormos (%)**									
Fase 0	0	0	0	0	0	0	0	---	0
Fase 1	0	0	0	0	0	0	0	---	0
Fase 2	16,75±1,1	0	0	7,47±4,92	0,62±0,52	0	1,57±0,30	---	0
Fase 3	36,87±0,87	20±8,94	0	16,09±4,29	7,66±1,19	0	14,24±0,79	---	0
Fase 4	0,55±0,15	40±10,95	15,38±3,83	4,02±1,30	3,72±0,80	11,11±27,38	7,43±0,45	---	21,05±1,93
Fase 5	1,11±0,22	40±10,95	69,23±5,16	1,14±0,72	3,51±0,75	0	10,83±0,43	---	52,63±1,59
C. Elongación ***									
Longitud del brote (cm)	---	---	0,48±0,31	---	---	---	0,44±0,36	0,52±0,44	0,42±0,37
Número de hojas	---	---	2,72±1,48	---	---	---	1,97±1,43	2,55±0,9	2,8±2,18
Número de raíces	---	---	0,11±0,39	---	---	---	0,11±0,31	0,19±0,52	0,13±0,35

Los numerales A-C representan las diferentes etapas de desarrollo *in vitro* de semillas de *C. olivacea* cultivadas en distintos medios de cultivo. Los valores representan medias + desviación estándar (DE) de 5155 semillas en promedio.

*La germinación total se calculó durante 12 semanas en cultivo.

**El desarrollo de protocormos se calculó durante 24 semanas en cultivo

***La elongación está basada en el crecimiento durante 60 días.

7. FIGURAS

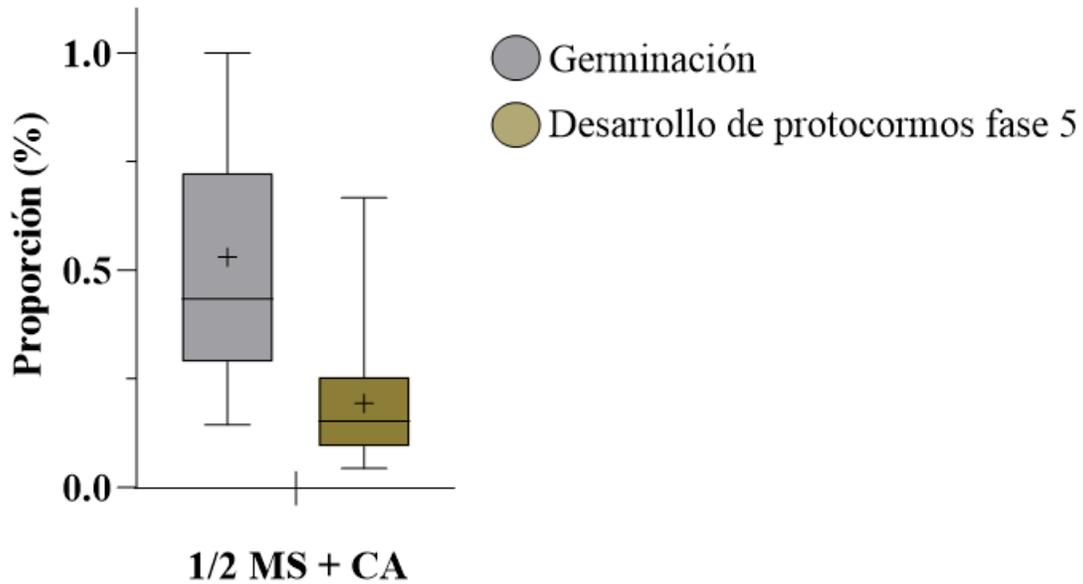


Figura 1. Resultados de germinación y desarrollo de protocormos fase 5 de *P. pulchella*.

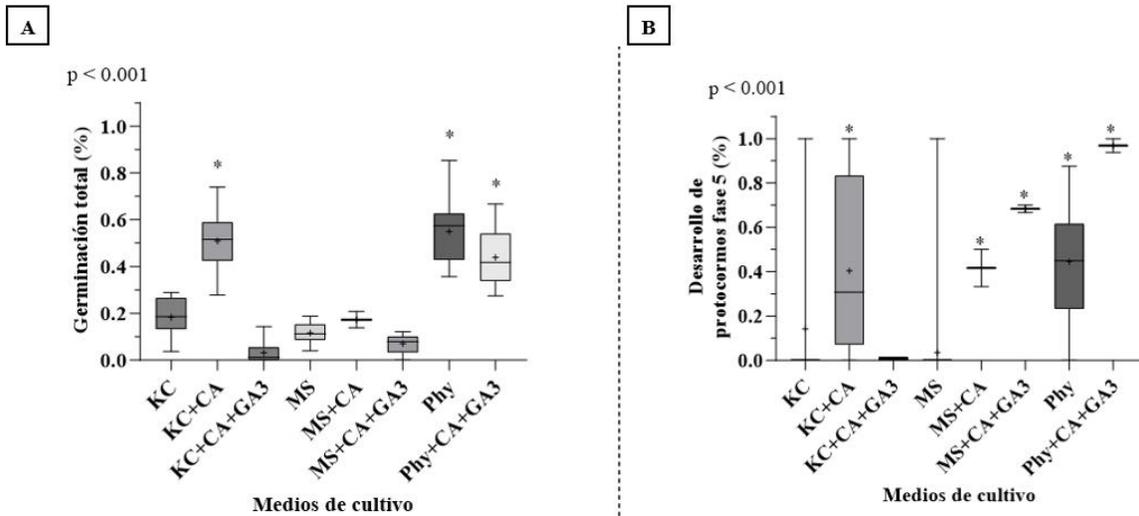


Figura 2. Resultados de germinación y desarrollo de protocormos fase 5 de *C. olivacea*. A. Germinación en 12 semanas, B. Desarrollo de protocormos fase 5 en 24 semanas.

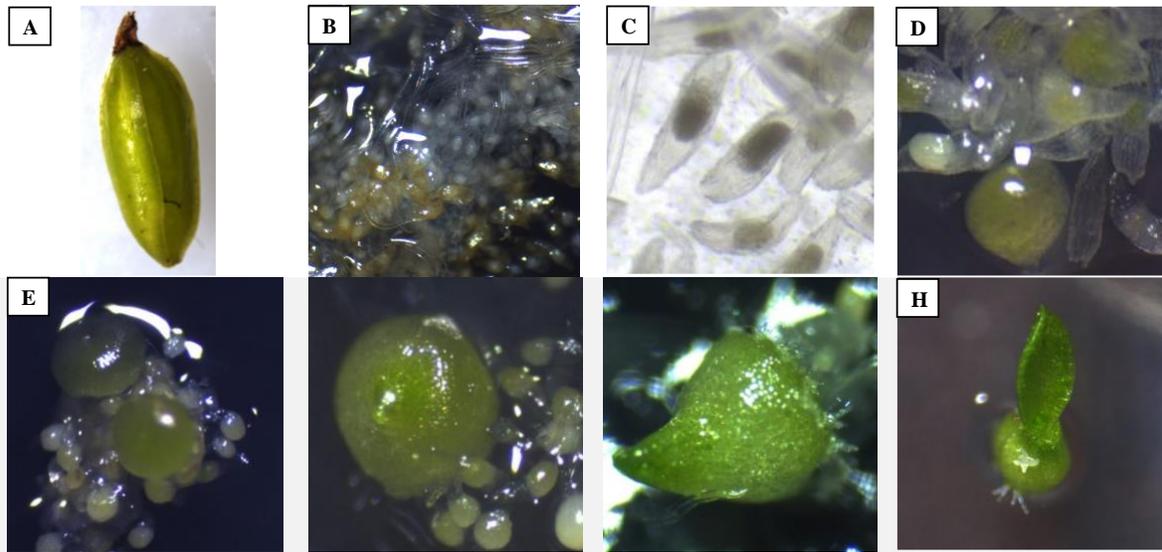


Figura 3. Fotos referenciales de *P. pulchella*. A. Cápsula fresca, B. semillas no viables, C. Fase 0, D. Fase 1, E. Fase 2, F. Fase 3, G. Fase 4, H. Fase 5.

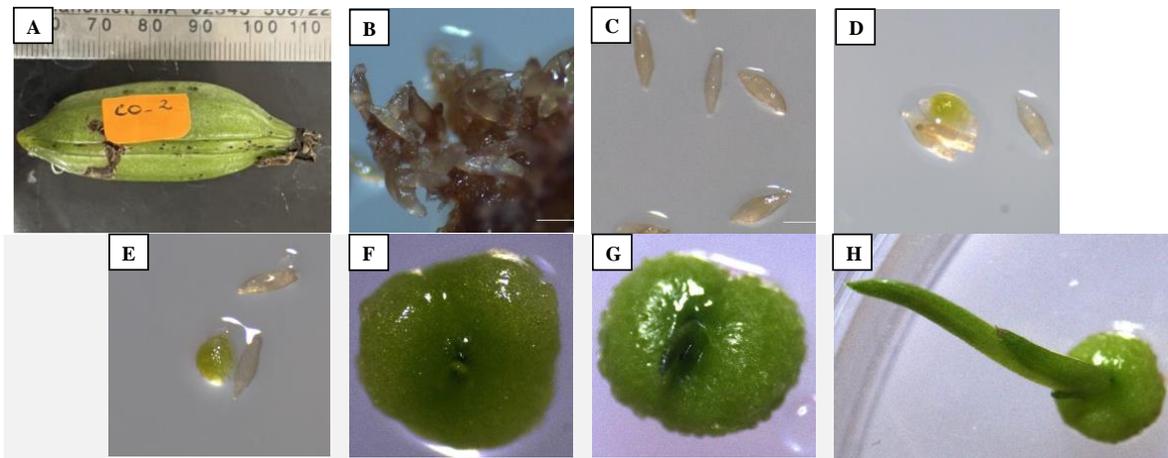


Figura 4. Fotos referenciales de *C. olivacea*. A. Cápsula fresca, B. semillas no viables, C. Fase 0, D. Fase 1, E. Fase 2, F. Fase 3, G. Fase 4, H. Fase 5.

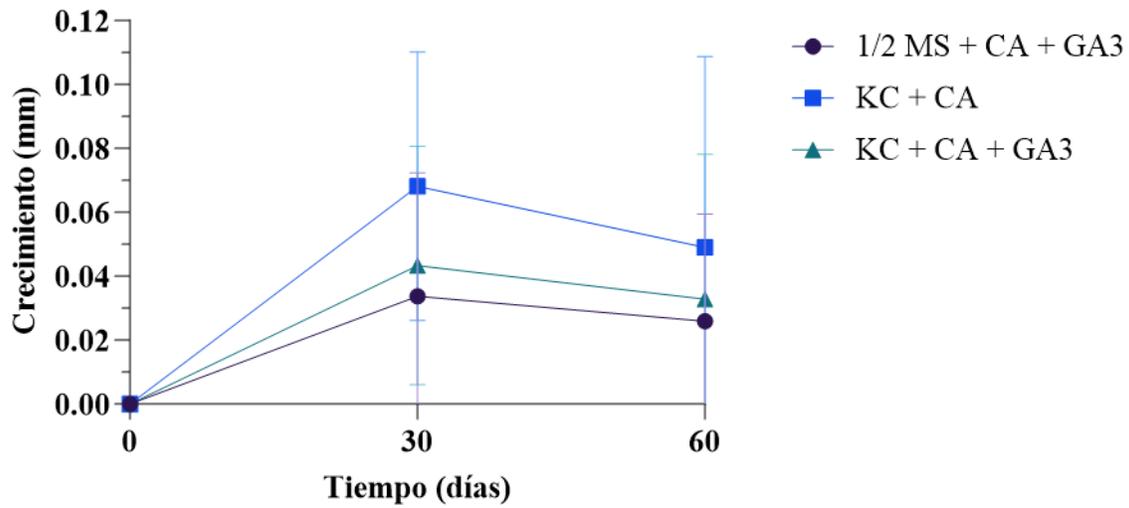


Figura 5. Resultados de elongación en diferentes medios en *P. pulchella* durante 60 días.

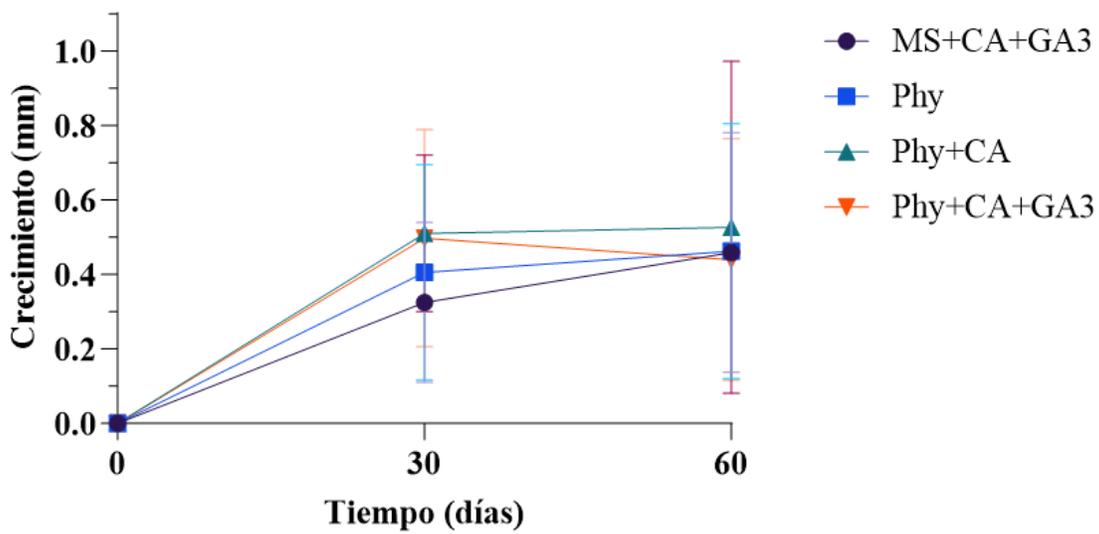


Figura 6. Resultados de elongación en diferentes medios en *C. olivacea* durante 60 días.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albán Reinoso, J. L., & Toapanta Cantuña, C. L. (2019). *Identificación molecular del género Caucaea (Orchidaceae) mediante el sistema Barcode y análisis químico de los aromas florales* (Bachelor's thesis).
- Bacuilima, P. (2015). *Respuesta fisiológica de la orquidea Maxilaria grandis*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8155/1/UPS-CT004909.pdf>
- Bertolini, V., & Damon, A. (2014). *Quelato de hierro y agua de coco en la germinación in vitro de Rossioglossum grande (Orchidaceae)*. *Acta Agronómica*, 63(3), 229-237.
- Chemisquy, M. A. (2010). *Las orquídeas del género Gavilea Poepp: sistemática, taxonomía, biogeografía y conservación* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Científica SENNA. (2023). *Reguladores de crecimiento. Ácido Gibberellic 3, Kinetin, Myo-Inositol, Picloram, etc.* <https://www.cientificasenna.com/producto/reguladores-de-crecimiento/#:~:text=Myo%2DInositol%20es%20una%20vitamina,de%20los%20fofol%20de%20membrana>
- Damon, A., Aguilar-Guerrero, E., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). *Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México*. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 195-203.
- Diantina, S., Kartikaningrum, S., McCormick, A. C., Millner, J., McGill, C., Pritchard, H. W., & Nadarajan, J. (2020). *Comparative in vitro seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143(3), 619-633.

- Duarte, I. (2014). Germinación *in vitro* de *barkeria uniflora* lex. Dressler & halbinger, una orquídea endémica de México. Facultad de estudios superiores Zaragoza.
- Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L. (2009). *Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of Cyrtopodium punctatum: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 96, 235-243.
- de Feria, M., Chávez, M., & Quiala, E. (2007). *Establecimiento in vitro de Phalaenopsis*. Biotecnología Vegetal, 7(1).
- Ersts, P.J. [Internet] DotDotGoose (version 1.6.0). American Museum of Natural Histor, Center for Biodiversity and Conservation. Available from https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/dotdotgoose/
- Freuler, M. J. (2008). *Orquídeas*. Editorial Albatros.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. [doi:10.1038/nmeth.2089](https://doi.org/10.1038/nmeth.2089)
- IOSPE PHOTOS*. (s. f.). <http://www.orchidspecies.com/oncoliveaceum.htm>
- Karremans, A. P. (2019). To be, or not to be a Stelis. *Lankesteriana*, 19(3), 281-343.
- Kabir, M. F., Rahman, M. S., Jamal, A., Rahman, M., & Khalekuzzaman, M. (2013). Multiple shoot regeneration in *Dendrobium fimbriatum* Hook an ornamental orchid. *J. Anim. Plant Sci*, 23(4), 1140-1145.
- Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 14, 214-217.

Koene, F. M., Amano, E., Smidt, E. D. C., & Ribas, L. L. F. (2020). Asymbiotic germination and morphological studies of seeds of Atlantic Rainforest micro-orchids (Pleurothallidinae). *Plos one*, *15*(12), e0243297.

Koene, F. M., Amano, É., & Ribas, L. L. F. (2019). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, *121*, 83-91.

León, M. J. (2014). *Orquídeas del ecuador-número de especies, endemismo especies amenazadas y su manejo adecuado*.

Loewus, F. A., & Murthy, P. P. (2000). myo-Inositol metabolism in plants. *Plant science*, *150*(1), 1-19.

Magrini, S., De Vitis, M., Torelli, D., Santi, L., & Zucconi, L. (2019). Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. *Plant Biology*, *21*(3), 544-550.

Mensa, E. G., García, E. P., & Montesino, D. P. (1989). Estudio del desarrollo de cápsulas de *Cattleyopsis* con fines de propagación. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 295-299.

Mio-inositol. (2019, abril 18). EcuRed. Consultado el 15:21, diciembre 12, 2023 en <https://www.ecured.cu/index.php?title=Mio-inositol&oldid=3349953>.

MITRA, G. C. 1987. Some aspects of asymbiotic nutrition of orchid's embryos. *J. Orch. Soc. Ind.* 1: 91–108.

Olórtegui Chamolí, S. (2018). Implementación de un programa educativo ambiental para conservar la diversidad de la familia Orchidaceae en estudiantes del 2 y 3 grado de nivel secundario de la Institución Educativa N 00827 Santa Fe–Rioja–San Martín 2017.

Oña Arias, C. G. (2020). Germinación asimbiótica en condiciones in vitro de *Oncidium pentadactylon* y *Elleanthus capitatus*: orquídeas nativas del Ecuador (Bachelor's thesis, Quito).

Ordóñez, B. J. (2016). Investigación e Innovación Tecnología y Apropiación Social del Conocimiento Científico de Orquídeas Nativas de Cundinamarca. Bogota

Otero Ospina, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270-276.

Pérez-Martínez, B. A., & Castañeda-Garzón, S. L. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Biotecnología Vegetal*, 16(3).

Quezada, P. J. (2005). Evaluación de medios alternativos al Phytamax TM para la micropropagación de *Schomburkia undalata* (orquídea). *Biofarbo*, 79-82.

RAQUEL, Z., & FABIÁN, R. (2014). Valorización económica del uso recreativo de la Reserva Geobotánica Pululahua (RGP) a través del método del costo de viaje. *Revista Geoespacial*, 11, 16-27.

- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391-402.
- Roy, A. R., Patel, R. S., Patel, V. V., Sajeev, S., & Deka, B. C. (2011). Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl.(Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 325-331.
- Sánchez, E. P. O., Cadena, M. D. J. M., & Moreno, D. R. (2018). Inventario de la Familia Orchidaceae en la Reserva Geobotánica Pululahua. *Revista Científica Hallazgos* 21, 3(1), 1-13.
- Seaton, P. and M. Ramsay. 2005. Growing orchids from seeds. Royal Botanical Garden, Kew. London, England.
- Smestad, L. (2010). Abundance of arbuscular mycorrhizae in epiphytic Orchidaceae: abiotic, biotic and taxonomic factors.
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 147-158.
- Szlachetko, D., & Kolanowska, M. (2015). Five new species of *Caucaea* (orchidaceae) from Colombia and Ecuador. *Polish Botanical Journal*, 60(2), 127-134.
- Tamay, L. D. C., Cruz, J. Y. S. R., & García, E. A. P. (2020). Diversidad y uso de las orquídeas. *Revista Bioagrobiencias*, 9(1), 1-5.

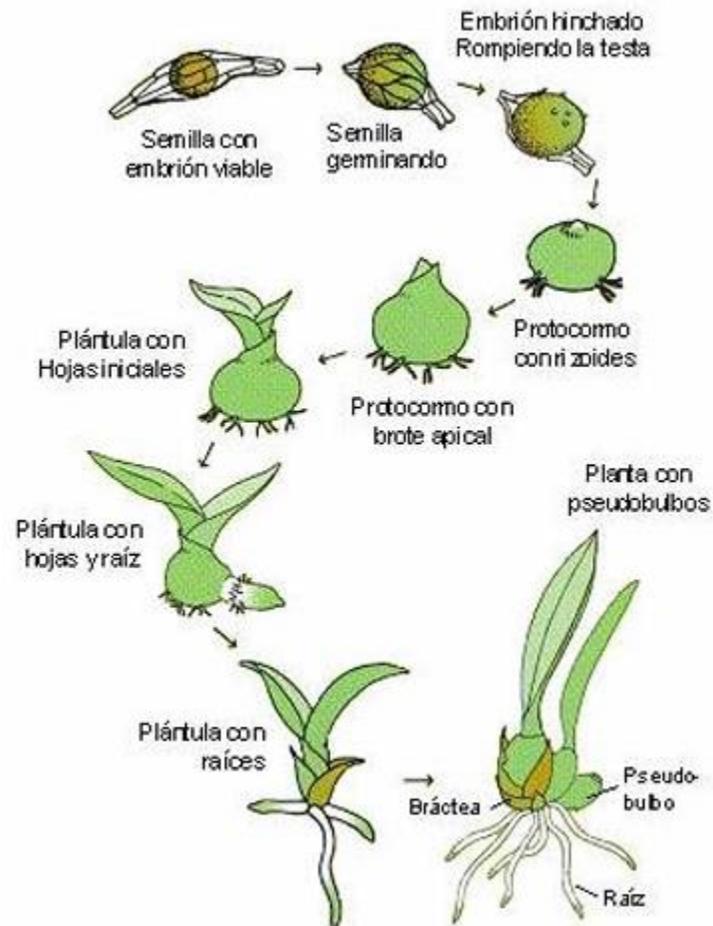
- Tan, X. M., Wang, C. L., Chen, X. M., Zhou, Y. Q., Wang, Y. Q., Luo, A. X., ... & Guo, S. X. (2014). In vitro seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.). *Scientia Horticulturae*, 165, 62-68.
- Tavares, A. R., Young, J. L. M., Ori, S. S., Kanashiro, S., Lima, G. P., Chu, E. P., & Suzuki, R. M.. (2012). Orchid in vitro growth as affected by nitrogen levels in the culture medium. *Horticultura Brasileira*, 30(1), 119–124. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000100020>
- Trivedi, M., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Bairwa, K., & Jana, S. (2015). Physical, thermal, and spectroscopic characterization of biofield energy treated murashige and skoog plant cell culture media. *Cell Biology*, 4(3), 50-57.
- Vasudevan, R., & Staden, J. (2010). In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Sci Hortic* , 496-504
- Vázquez, G. F. B. (2019). *Guía ilustrada de las Orquídeas del Jardín Botánico Regional del Soconusco, Chiapas* (Doctoral dissertation, Universidad De Guadalajara).

9. ANEXOS

ANEXO 1: FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Compuestos (mgL ⁻¹)	Murashige and Skoog (MS)	Knudson C (KC)	Phytamax (Phy)
Nitrato de Amonio	1650		825
Sulfato de amonio		500	
Ácido bórico	6.2	0.056	3.1
Anhidrido clorhídrico de calcio	332.2		166
Nitrato de calcio		694.4	
Clorhídrico de cobalto • 6H ₂ O	0.025		0.0125
Sulfato cúprico • 5H ₂ O	0.05	0.0624	0.0125
Na ₂ -EDTA	37.26		37.24
Sulfato ferroso • 7H ₂ O	27.8	25	27.85
Sulfato de magnesio	180.7	122.125	90.35
Sulfato de magnesio • H ₂ O	16.9	5.682	8.45
Trióxido de molibdeno		0.016	
Sal sódica • 2H ₂ O	0.25		0.125
Yodato de potasio	0.83		0.415
Nitrato de potasio	1900		950
Sacarosa	20000	20000	20000
Fosfato de potasio monobásico	170	250	85
Zinc sulfato • 7H ₂ O	8.6	0.331	5.3
Carbón activado			2000
MES			1000
Mioinositol			100
Ácido nicotínico			1
Peptona			200
Piridoxina • HCl			1
Tiamina • HCl			10

ANEXO 2: CICLO DE VIDA DE UNA EPÍFITA (*LAELIA*)



(Seaton & Ramsay, 2005)

ANEXO 3: FASES DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO INICIAL DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS

Fase	Descripción
0	Semilla con embrión viable no germinado
1	Embrión creciendo, semilla germinando
2	Embrión hinchado, rompiendo la testa
3	Protocormos con rizoides y yema apical
4	Protocormo con brote apical
5	Protocormo con hojas iniciales