

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Cultivo *in vitro* asimbiótico de dos orquídeas nativas del Ecuador: *Oncidium pentadactylon* y *Govenia tingens*

Ana Paula Altamirano Galárraga

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Cultivo *in vitro* asimbiótico de dos orquídeas nativas del Ecuador:
Oncidium pentadactylon y *Govenia tingens***

Ana Paula Altamirano Galárraga

Nombre del profesor, Título académico

Miguel Orellana Carrión, MSc., MD

Quito, 18 de diciembre de 2024

© 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: Ana Paula Altamirano Galárraga

Código: 00209840

Cédula de identidad: 1718611674

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Orchidaceae es una diversa familia de plantas vasculares, cuya disminución poblacional requiere el desarrollo de métodos eficientes para su conservación. Encontradas en el apéndice II de CITES, su propagación *in situ* es un reto por la carencia de endospermo, una estricta asociación micorrícica y específicos requerimientos nutricionales. Por esta y otras consideraciones, se propone el cultivo *in vitro* asimbiótico en medios de cultivo artificiales, evaluando en este estudio el aquel con mejores resultados para la germinación y elongación de *Oncidium pentadactylon* y *Govenia tingens*. En *O. pentadactylon* se probaron dos medios para la germinación, donde Phytamax (Phy) (98,30%) y Phytamax con carbón activado y ácido giberélico (Phy+CA+GA₃) (98,25%) no mostraron diferencias significativas. En la semana 24, la mayor cantidad de protocormos en Fase 5 se consiguió en Phy+CA+GA₃ (32,63%). Para la elongación, se utilizaron cuatro medios, donde Phy+CA desarrolló protocormos con una mayor longitud promedio de brote (0,48 cm) y área promedio del protocormo (0,72 cm²) en 16 semanas. En *G. tingens*, se probaron nueve medios, donde el mayor porcentaje de germinación en la semana 12 se obtuvo con Phy (87,92%) y Phy+CA (85,16%). A las 42 semanas, el mayor porcentaje de protocormos con brote apical se encontró en Phy+CA (43,16%). Para la elongación se evaluaron dos medios, Phy y Phy+CA, sin encontrar diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el medio de germinación tuvo un efecto significativo en el crecimiento del brote, con un mayor promedio en Phy+CA (0,30 cm con Phy+CA en germinación, sumado a Phy en elongación; 0,17 cm con Phy+CA en germinación, sumado a Phy+CA en elongación). Con este trabajo, se ha logrado determinar los medios de cultivo que permiten la germinación y desarrollo germinativo *in vitro* de ambas especies, siendo esta la base para su propagación, investigación y conservación.

Palabras clave: Orquídeas, cultivo *in vitro* asimbiótico, medio de cultivo, germinación, elongación, protocormo, *Oncidium pentadactylon*, *Govenia tingens*.

ABSTRACT

Orchidiaceae is a diverse family of vascular plants, which population reduction demands the development of efficient conservation methods. Now found in the appendix II of CITES, *in situ* orchid seed germination is a challenge due to the lack of an endosperm, a strict mycorrhizal association and specific nutritional requirements. For this and other considerations, an asymbiotic *in vitro* culture using artificial growth media is proposed, evaluating the optimal medium for the germination and elongation of *Oncidium pentadactylon* and *Govenia tingens* within this study. Two media were tested on *O. pentadactylon* for germination, showing no significant differences by week 12 between Phytamax (Phy) (98,30%) and Phytamax with activated charcoal and gibberellic acid (Phy+CA+ GA₃) (98,25%). On week 24, the largest amount of Phase 5 protocorms was achieved with Phy+CA+ GA₃ (32,63%). Four growth media were used for elongation, indicating that Phy+CA led to a higher shoot length (0,48 cm) and protocorm area (0,72 cm²) in 16 weeks. As for *G. tingens*, nine growth media were utilized, where the greatest germination percentage on week 12 was obtained with Phy (87,92%) and Phy+CA (85,16%). Furthermore, on week 42, the highest percentage of apical shoots was seen on Phy+CA (43,16%). Two media, Phy and Phy+CA, were evaluated on the elongation phase, without finding any significant difference between them. Nonetheless, the culture medium used on germination had a significant effect on shoot growth, with the highest average in Phy+CA (0,30 cm with Phy+CA in germination, plus Phy in elongation 0,30; 0,17 with Phy+CA in germination, plus Phy+CA in elongation). The present work determines the growth media that allow the *in vitro* germination and germinative development of both species, which is the base for their propagation, research and conservation.

Key words: Orchids, asymbiotic *in vitro* culture, growth medium, germination, elongation, protocorm, *Oncidium pentadactylon*, *Govenia tingens*.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. MÉTODOS	14
2.1 Material vegetal.....	14
2.2 Desinfección y germinación asimbiótica <i>in vitro</i>	14
2.3 Elongación de protocormos.....	15
2.4 Toma de datos y análisis	15
3. RESULTADOS	17
3.1 Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> y desarrollo germinativo.....	17
3.2 Elongación de protocormos <i>in vitro</i>	18
4. DISCUSIÓN	20
4.1 Germinación asimbiótica <i>in vitro</i>	20
4.2 Elongación de protocormos <i>in vitro</i>	22
5. CONCLUSIONES.....	24
6. TABLAS.....	25
7. FIGURAS.....	30
8. REFERENCIAS.....	38
9. ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de diferentes medios de cultivo en la germinación (semana 12), desarrollo germinativo y necrosis (24 semanas) de <i>Oncidium pentadactylon</i> (Ensayo 7)	25
Tabla 2. Efecto de diferentes medios de cultivo en el desarrollo durante la elongación (semana 16) de <i>Oncidium pentadactylon</i> (Ensayo 4)	26
Tabla 3. Efecto de diferentes medios de cultivo en la germinación (semana 12), desarrollo germinativo y necrosis (semana 42) de <i>Govenia tingens</i> (Ensayo 1)	27
Tabla 4. Efecto de diferentes medios de cultivo en el desarrollo durante la elongación (semana 12) de <i>Govenia tingens</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de germinación de <i>Oncidium pentadactylon</i> y <i>Govenia tingens</i>	30
Figura 2. Elongación <i>in vitro</i> de brotes apicales de <i>Oncidium pentadactylon</i> en cuatro medios de cultivo distintos durante 16 semanas	31
Figura 3. Elongación <i>in vitro</i> de brotes apicales de <i>Govenia tingens</i> en tres medios de cultivo distintos durante 12 semanas	32
Figura 4. Gráficos lineales del porcentaje de germinación y elongación <i>in vitro</i> de <i>Oncidium pentadactylon</i> a través del tiempo	33
Figura 5. Gráficos lineales del porcentaje de germinación y desarrollo germinativo de <i>Govenia tingens</i> a través del tiempo	35
Figura 6. Gráficos lineales del desarrollo en la elongación de <i>Govenia tingens</i> a través del tiempo	36

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Fases de germinación y desarrollo germinativo de las especies de orquídea estudiadas	48
ANEXO 2: Referencias de germinación y desarrollo germinativo para <i>Oncidium pentadactylon</i> y <i>Govenia tingens</i>	49
ANEXO 3: Diseño experimental para el lanzamiento de ensayos de germinación in vitro en <i>O. pentadactylon</i> y <i>G. tingens</i>	50
ANEXO 4: Diseño experimental para el lanzamiento de ensayos de elongación en <i>O. pentadactylon</i> y <i>G. tingens</i>	51

1. INTRODUCCIÓN

Orchideaceae es una de las familias más numerosas de plantas vasculares, de la cual se estiman más de 29 000 especies, que representan un 10% de las angiospermas (De, 2020; Gaskett, A. C., & Gallagher, 2018). Están distribuidas en un extenso rango hábitats en el planeta a excepción de la Antártica (Moraes et al., 2022). Un 75% de las orquídeas son epífitas, es decir, crecen sobre otras plantas de un modo no parasítico. Por otro lado, las orquídeas terrestres crecen desde el suelo, donde desarrollan tubérculos y raíces con pelos radiculares (Moreira & Isaias, 2008; Mawinei & Paramitha, 2024).

El desarrollo general de las orquídeas inicia con la fertilización, luego de la cual se genera una cápsula que alberga de cientos a millones de semillas sumamente pequeñas, lo que facilita su dispersión (Seaton et al., 2018; Zhao et al., 2024). Estas semillas cuentan con una testa, mas no con un endospermo, estructura útil para el almacenamiento de nutrientes y fitohormonas necesarias para el desarrollo embrionario. Autores relacionan la falta de endospermo con una fusión parcial de núcleos en el saco embrionario, produciendo una sola célula endospérmica no funcional (Yeung, 2022). Debido a esta carencia, las semillas dependen de asociaciones frecuentemente específicas con hongos, que aportan nutrientes, aumentan la absorción de agua y dan resistencia a enfermedades. A cambio, pelotones de hongos reciben un albergue para su reproducción (Bonfante & Genre, 2010; Yeung et al., 2018, a; Zhao et al., 2021).

La germinación comienza con el ensanchamiento del embrión dentro de la testa hasta su rotura, formando un protocormo, estructura homóloga a un hipocótilo en otras angiospermas, el cual está diseñado para la simbiosis fúngica (Yeung et al., 2018, a). El crecimiento del protocormo continúa con aparición de rizoides. Posteriormente, eventos mitóticos en uno de los polos del protocormo dan lugar a células meristemáticas, las cuales serán parte del meristema apical (Yeung et al., 2018, a). Desde esta región, se desarrollan primordios de hojas,

mientras que, en el área basal, surgen raíces adventicias (Batygina et al., 2003; Billard et al., 2014; Yeung, 2017).

Las orquídeas son un valioso recurso genético, utilizado para el comercio de plantas ornamentales, así como para aplicaciones culturales, medicinales, cosméticas y alimentarias (Zhang et al., 2018). Además, juegan un rol ecológico clave en una variedad de ecosistemas. En particular, las epífitas están involucradas en la captura y filtración de agua (Mendieta et al., 2020). Asimismo, varios autores han utilizado a las orquídeas como indicadores de la salud de los ecosistemas en virtud de la sensibilidad a cambios en su hábitat (Newman, 2009).

Actualmente, el cambio climático, la fragmentación del hábitat y la recolección indiscriminada afectan de forma significativa a las orquídeas (Hernández-Mejía et al., 2024). En efecto, toda la familia *Ochideaceae* se encuentra dentro del apéndice II de CITES (Chugh et al., 2009; Fay, 2018). Ecuador atesora la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, con más de 4 000 especies, de las cuales unas 1700 son endémicas. Se conoce que 1455 especies de orquídeas en Ecuador se encuentran en algún estado de vulnerabilidad (León, 2014).

Se han propuesto varias alternativas para la conservación, entre ellas, la protección *in situ* dentro de reservas y parques nacionales, lo cual es desafiante debido al lento crecimiento, hábitats deteriorados, escasez de simbiontes, uso de pesticidas en alrededores y el impacto del calentamiento global (Chugh et al., 2009; Seaton et al., 2010). Por esta razón, se han generado planes de conservación *ex situ* a través de bancos de germoplasma, el crecimiento en jardines botánicos, la criopreservación y el cultivo *in vitro* (De & Pathak, 2018). El cultivo *in vitro* ha sido ampliamente utilizado, debido a la aplicación de medios de cultivo con una composición definida que permite la estandarización de protocolos para la propagación de una variedad de especies y materiales vegetales iniciales (Chugh et al., 2009; Calevo et al., 2022; Longchar et al., 2022). De hecho, es posible emplear semillas o diversos tipos de explantes, tales como hojas, meristemas, yemas axilares, segmentos de raíz, entre otros (Lal & Singh, 2020). En

orquídeas, la germinación de semillas *in vitro* permite obtener un número mayor de plantas en comparación con condiciones naturales, donde la tasa de germinación es inferior al 5%. (Lal & Singh, 2020; Utami & Hariyanto, 2020).

Para la germinación de semillas *in vitro*, se realizan cultivos simbióticos en presencia de un hongo micorrícico, o asimbióticos en ausencia del simbiote (Fay, 2018; Anghelescu et al., 2023). Varios autores optan por cultivos asimbióticos por su simpleza, ya que no se necesita aislar al simbiote fúngico y se mantienen condiciones más asépticas al no incluir microorganismos en el medio (Dolce et al., 2020). Cabe resaltar que, al no contar con un hongo que aporta nutrientes a la semilla, se debe proporcionar un medio de cultivo que cubra las exigencias de la orquídea, el cual consiste en una solución con macro y microelementos, fuentes de carbono, vitaminas y un agente gelificante (Park & Yeung, 2018). Usualmente, es necesaria la incorporación de fitohormonas, fuentes proteicas, antioxidantes, extractos orgánicos, carbón activado y otros aditivos para optimizar y acelerar la germinación (Reddy, 2016; Yeung et al., 2018, b; Lal et al., 2020). Así también, es importante el conocimiento del pH óptimo del medio y la implementación de reguladores de pH (da Silva, 2013; Prakash et al., 2013; Yeung et al., 2018, b). El medio de cultivo idóneo varía entre especies, explantes y etapas del desarrollo; según el contexto, un mismo compuesto puede tener efectos positivos o causar toxicidad (Park & Yeung, 2018; Lal & Singh, 2020; An et al., 2021).

Desde la primera descripción de la germinación asimbiótica de orquídeas (Knudson, 1922), se han publicado una serie de investigaciones que demuestran su eficacia. Especialmente, en especies vulnerables, se han probado distintos medios de cultivo en combinación con fitohormonas y otros aditivos orgánicos, identificando con éxito las condiciones óptimas para la obtención del mayor número de plántulas con características fisiológicas adecuadas (Roy et al., 2011; Suzuki et al., 2012; Zeng et al., 2012; Chen et al., 2015; Fatahi et al., 2022). En el Ecuador, los estudios de germinación se han orientado al cultivo

fúngico en especies nativas de los géneros *Polystachya*, *Dracula* y *Epidendrum*. De igual manera, se ha investigado sobre el cultivo asimbiótico en géneros como *Polystachya*, *Dracula*, *Epidendrum*, *Oncidium* y *Pleurothallis* (Salazar et al., 2020; Quija-Lamiña et al., 2023a, 2023b, 2023c; Valencia-Glushchenko et al., 2024). Dada la necesidad de contar con protocolos eficientes, sencillos y de mayor alcance para la propagación y conservación de orquídeas en el país, es fundamental desarrollar estrategias basadas en métodos asimbióticos.

El presente trabajo se enfoca en dos especies de orquídea nativas del Ecuador. Por un lado, *Oncidium pentadactylon* es una orquídea epífita simpodial encontrada en Colombia, Bolivia, Ecuador, Perú y partes de Mesoamérica. Se reconoce por sus flores amarillentas con varias ramificaciones. Tiene pseudobulbos y hojas en la región apical (Cueva & Moya, 2015) (GBIF, 2024). Por otro lado, *Govenia tingens* es una orquídea terrestre simpodial distribuida en Ecuador, Perú y Bolivia. Presenta inflorescencias blancas, con ligeras coloraciones vino tinto o marrón. Su rizoma es carnoso y presentan cormos separables del rizoma (Giraldo & Betancur, 2011; Missouri Botanical Garden, 2024). Ambas especies fueron recolectadas en la Reserva Geobotánica Pululahua, un bosque nublado que se ubica en altura de 1600 y 3 356 msnm., con una precipitación de hasta 1600 mm y temperaturas de 12 a 19 °C (Sánchez et al., 2018).

A través de este estudio, se pretende establecer el primer protocolo reportado para el cultivo *in vitro* asimbiótico de *Govenia tingens* y optimizar del protocolo de *Oncidium pentadactylon*, con el fin de identificar aquellos medios de cultivo que promuevan de manera más efectiva su germinación y posterior elongación. De esta forma, se podrá tener una adecuada herramienta para su conservación y estudio futuro.

2. MÉTODOS

2.1 Material vegetal

La recolección de material vegetal de *Oncidium pentadactylon* y *Govenia tingens* se efectuó dentro de la Reserva Geobotánica Pululahua (0°02'17"N 78°27'47"O), bajo el permiso del Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), código MAATE-ARSFC-2022-2445. Se recolectó cápsulas, que fueron almacenadas en una bolsa plástica con sílica gel y transportadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Se conservaron en un recipiente hermético a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) hasta ser utilizadas en siete días.

2.2 Desinfección y germinación asimbiótica *in vitro*

O. pentadactylon y *G. tingens* se sometieron al mismo protocolo de desinfección establecido por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (USFQ) (ANEXO 3). Se prepararon diferentes medios de cultivo para la germinación asimbiótica *in vitro* de las dos especies estudiadas. Se emplearon tres medios basales: Phytamax (Phy; Sigma Aldrich), Knudson-C (KC; Knudson, 1946) y Murashige & Skoog (MS; Murashige & Skoog, 1969), a los cuales se les agregó carbón activado (CA) o carbón activado y ácido giberélico (CA+GA₃). El detalle de los medios de cultivo para cada especie con las concentraciones de los aditivos se encuentra en el (ANEXO 3). Los medios se autoclavaron (BIOBASE BKQ-BL) a 121 grados y 20 psi durante 15 minutos. La adición de GA₃ se realizó con un filtro de jeringuilla con membrana de nylon de 0,22 µm (Corning®). Se dispensó un aproximado de 10 mL de cada medio en cajas Petri plásticas de 50 x 9 mm.

Para la germinación de semillas, se abrió cada cápsula esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar, realizando un corte longitudinal con un bisturí y pinza estériles. Con una microcuchara estéril, se dispersaron las semillas uniformemente en la superficie de cada medio de cultivo. Cada cápsula se consideró como un ensayo independiente. Se detalla el diseño

experimental para cada especie en el (ANEXO 3). Las cajas fueron selladas con PARAFILM® y se llevaron a una cámara climática (BIOBASE, BJPX-400II), a 23°C, 75% de humedad relativa y con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz-oscuridad respectivamente. Los subcultivos se realizaron cada 12 semanas y se mantuvo el medio de cultivo utilizado inicialmente. Se identificó las distintas fases de germinación descritas en la literatura (ANEXO 1; ANEXO 2). Para *O. pentadactylon* se utilizó la referencia de Seaton y Ramsay (2005), mientras que para *G. tingens*, una modificación de Stewart & Zettler (2002).

2.3 Elongación de protocormos

Con el fin de evaluar el medio de cultivo que promueva un mejor desarrollo en la elongación, se probaron distintas composiciones dependiendo de la especie. El detalle de los medios de cultivo utilizados, así como el número de protocormos evaluados según la especie se encuentra en el (ANEXO 4). Aproximadamente 70 mL de cada medio de cultivo fueron dispensados en frascos de vidrio. En total, se contó con cuatro ensayos en *O. pentadactylon* y un solo ensayo en *G. tingens*. Los protocormos se cultivaron en un cuarto de cultivo a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz-oscuridad. Los subcultivos se realizaron cada cuatro semanas; 16 semanas en total en *O. pentadactylon* y 12 semanas en total en *G. tingens*.

2.4 Toma de datos y análisis

Para la evaluación de la germinación *in vitro*, se tomó fotografías de las semillas el mismo día que inició el cultivo *in vitro* y posteriormente cada tres semanas hasta la semana 24 en *O. pentadactylon* y hasta la semana 42 en *G. tingens*. Se utilizó un estereomicroscopio (Nikon SMZ745T) con una cámara digital asociada al software MShot Image Analysis System (versión 1.1.6) (Guangzhou Micro-shot Technology Co., 2024). En cada toma de datos, se capturaron 10 campos aleatorios por caja Petri, con un aumento de 5X en las fases iniciales del desarrollo y un cambio a 2X o 1X en fases de mayor desarrollo. El conteo de semillas y protocormos (Fases 0-5 o 0-brote de hoja, ANEXO 1) se realizó con el programa DotDotGoose

(versión 1.7.0) (Ersts, 2024). Los archivos CSV generados fueron importados a Microsoft Excel (versión 2019), donde se estimó el número de semillas germinadas (Fases 1-5) por cada campo, al igual que el número de protocormos en cada fase del desarrollo. Se calculó porcentajes de germinación y de las distintas fases de desarrollo. En *O. pentadactylon*, se consideró el porcentaje de germinación total en la semana 12 y el porcentaje de protocormos en Fase 5 en la semana 24. Para *G. tingens*, se consideró el porcentaje de germinación en la semana 12 y el porcentaje de protocormos con brote apical en la semana 42.

En la etapa de elongación, se tomó datos cada cuatro semanas en el momento del subcultivo. Se colocó a los protocormos en cajas Petri plásticas junto con una regla y se tomó fotografías. Por medio del software Fiji (Image-J, 2024), se midió la longitud de brote (cm), longitud de la hoja más larga (cm) longitud de la raíz más larga (cm), número de hojas nuevas, y área (cm²) de cada protocormo. Se calculó un diferencial de cada uno de estos parámetros con respecto a la toma de datos anterior con el propósito de estimar el crecimiento de los protocormos a través del tiempo. Se usó la siguiente fórmula: $\Delta x = x_f - x_i$, donde Δx se refiere al diferencial de un determinado parámetro, x_f a la medida a la medida del parámetro más actual y x_i la medida de la toma de datos anterior.

El análisis estadístico se basó en los valores promedio de cada parámetro de germinación y elongación, utilizando los programas Microsoft Excel (versión 2019) y Minitab® (versión 21.4.2) (Minitab, 2023). Se efectuó análisis de varianza de uno o dos factores para evaluar diferencias significativas entre medios de cultivo, así como pruebas de comparación múltiple de Tukey para identificar los medios óptimos. Se elaboró líneas de tiempo con el fin de visualizar la tendencia de crecimiento en cada medio.

3. RESULTADOS

3.1 Germinación asimbiótica *in vitro* y desarrollo germinativo

Para *Oncidium pentadactylon*, se recolectaron siete cápsulas que fueron utilizadas para la germinación *in vitro*. Se escogió un solo ensayo para el análisis de resultados según rendimiento de germinación, proporción de protocormos necrosados y cantidad de protocormos en Fase 5 (Figura 1; ANEXO 1). En la semana 12, se presentó una germinación promedio de 98,3% en Phy y 98,25% en Phy+CA+GA₃. Se determinó que en esta etapa no existen diferencias significativas en porcentaje de germinación entre medios de cultivo ($p=0,95$) (Figura 1; Figura 4A; Tabla 1).

Asimismo, en la semana 24 en *O. pentadactylon*, se evidenció un mayor porcentaje de protocormos en fase 5 con Phy+CA+GA₃ (32,63%) frente a Phy (8,47%) ($p=0,00$) (Figura 1; Figura 4B; Tabla 1). Durante el mismo tiempo en cultivo, se observó menor necrosis en Phy (2,49%) que en Phy+CA+GA₃ (6,42%) ($p=0,00$) (Tabla 1).

En cuanto a *Govenia tingens*, se recolectaron ocho cápsulas para distintos ensayos de germinación *in vitro*. Se tomó un solo ensayo de referencia para la evaluación de resultados, tomando en cuenta el porcentaje de germinación, necrosis y el desarrollo de protocormos en Fase 5, con brote apical y brote de hoja (Figura 1; ANEXO 1). Los mayores porcentajes de germinación se hallaron en Phy (87,92%), Phy+CA (85,16%) y KC+CA (74,75%) (Figura 1; Figura 5; Tabla 3). Aunque hubo germinación en KC+CA, los protocormos mostraron signos de necrosis, caracterizada por el pardeamiento de los tejidos. Por otra parte, los menores porcentajes se encontraron en Phy+CA+GA₃ (33,71%), KC (55,99%), KC+CA+ GA₃ (61,78%), MS (52,70%), MS+CA (68,80%), MS+CA+GA₃ (66,39%) ($p=0,00$) (Figura 5).

Los medios donde se apreciaron mayores porcentajes protocormos en Fase 5 fueron Phy (43,25%) y Phy+CA+GA₃ (40,37%), mientras que en Phy+CA se observó un menor porcentaje (3,42%) ($p=0,00$) (Figura 1; Figura 5B; Tabla 3). En cuanto a protocormos con brote apical, se

identificaron diferencias significativas entre medios de cultivo, con una mayor proporción en Phy+CA (43,16%) ($p=0,02$). Por otro lado, la menor proporción se halló en Phy (16,67%) y Phy+CA+GA3 (0,00%) (Figura 1; Figura 5C; Tabla 3). Con respecto al porcentaje de protocormos con un brote de hoja, no se evidenciaron diferencias significativas entre medios de cultivo ($p=0,36$) (Figura 1; Figura 5D; Tabla 3). Se observó una mínima necrosis en Phy (13,49%) y Phy+CA (7,69%), mientras que fue mayor en Phy+CA+GA3 (44,44%) ($p=0,02$). Existió una necrosis del 100% en los medios KC, KC+CA, KC+CA+GA₃, MS y MS+CA, MS+CA+GA₃.

3.2 Elongación de protocormos *in vitro*

Para la elongación en *O. pentadactylon*, se llevaron a cabo cuatro ensayos, de los cuales se escogió uno como base de resultados debido a su desarrollo satisfactorio y la clara diferenciación del crecimiento entre medios de cultivo. En relación con el crecimiento de protocormos en longitud de brote, se aprecian diferencias significativas entre medios en la semana 16 ($p=0,00$), indicando que Phy+CA tuvo un mayor promedio (0,48 cm) en comparación con Phy (0,07 cm) (Figura 2; Figura 4C; Tabla 2). No existieron diferencias significativas en la semana 16 para los distintos medios de cultivo, con respecto al crecimiento de protocormos en longitud de hoja ($p=0,39$), longitud de raíz ($p=0,09$) y número de hojas nuevas ($p=1,99$) (Figura 4D, E, F; Tabla 2). Por otro lado, el crecimiento de protocormos en área demostró diferencias significativas entre medios en todas las semanas de análisis. En la semana 16, Phy+CA contó con el mayor promedio (0,72 cm²) y Phy con el menor promedio (0,10 cm²) ($p=0,00$) (Figura 4G; Tabla 2). Los gráficos lineales demuestran claramente que los protocormos en Phy+CA tuvieron una tendencia de crecimiento mayor en todos los parámetros evaluados (Figura 4C, D, E, F y G). Existió una necrosis del 100% en Phy+CA+GA₃ a la semana 8 y en Phy+GA₃ a la semana 12. Además, en la semana 16, la necrosis fue superior en protocormos cultivados en Phy (47,22%), en contraste a protocormos en Phy+CA (25,00%)

(Tabla 2).

En *G. tingens* se realizó un análisis estadístico a partir de un solo ensayo de elongación. Con respecto al crecimiento de protocormos en longitud de brote en la semana 12, no se observaron diferencias significativas entre los medios de cultivo utilizados en la elongación ($p=0,68$) (Tabla 4). Además, se evidenció que sí existen diferencias significativas según el medio de origen del protocormo durante la germinación ($p=0,03$). En este caso, los protocormos que germinaron en el medio de cultivo Phy+CA mostraron un mayor promedio de longitud de brote en la etapa de elongación (0,30 cm con Phy+CA en germinación, sumado a Phy en elongación; 0,17 cm con Phy+CA en germinación, sumado a Phy+CA en elongación), que aquellos que provinieron del medio Phy (0,06 cm con Phy en germinación, sumado a Phy en elongación; 0,14 cm con Phy en germinación, sumado a Phy+CA en elongación) (Figura 3; Tabla 4). Por otra parte, no se presentaron diferencias significativas entre medios de cultivo de elongación en cuanto al promedio de Longitud de hoja ($p=0,38$), Longitud de raíz ($p=0,53$), Número de hojas nuevas ($p=0,19$) y Área de protocormo ($p=0,08$). Asimismo, no existieron diferencias significativas entre medios utilizados en germinación para Longitud de hoja ($p=0,24$), Longitud de raíz ($p=0,23$), Número de hojas ($p=0,96$) y Área de protocormo ($p=0,84$) (Tabla 4). Analizando los gráficos lineales, se demuestra que los protocormos germinados en Phy+CA (Figura 6B, D, F, H, J) tuvieron una tendencia de crecimiento mayor en longitud de brote, longitud de hoja, longitud de raíz, número de hojas y área que aquellos germinados en Phy (Figura 6A, C, E, G, I) durante un total de 12 semanas. Por otra parte, el posterior cultivo en Phy+CA como medio de elongación resultó en una disminución en la tendencia de crecimiento en longitud de brote, número de hojas y área de protocormo (Figura 6A, B, G, H, I, J). El porcentaje de necrosis hasta la semana 12 fue superior en los protocormos en medio de elongación Phy+CA que germinaron en Phy.

4. DISCUSIÓN

4.1 Germinación asimbiótica *in vitro*

En *O. pentadactylon*, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre los medios Phy y Phy+CA+GA₃. Con un porcentaje cercano al 100%, ambos medios fueron eficaces sin un efecto notable por la adición de CA o GA₃. En comparación con otras orquídeas epífitas, se ha encontrado una germinación asimbiótica del 100% en *Cymbidium giganteum* y de 62,33% en *Vanda coerulea* al usar Phy en condiciones *in vitro* (Hossain et al., 2010; Roy et al., 2011). En un estudio previo, se observó que Phy+CA+GA₃ promovió una mayor germinación en *O. pentadactylon*, con un promedio de 81,6% (Oña Arias, 2020). A pesar que el estudio de Oña-Arias (2020) y el actual presentan promedios de germinación altos, las diferencias de dichos valores podrían explicarse por el estado de maduración de las semillas (Kunakhonnuruk et al., 2018). El uso de semillas inmaduras suele incrementar la germinación por una mayor permeabilidad y menor contenido de ácido abscísico (Kendon et al., 2017; Cabej, 2019). También se ha discutido sobre las diferencias genotípicas que afectan a la viabilidad y germinación (Kauth et al., 2008), lo cual se ha apreciado en el cultivo simbiótico de semillas de *Platanthera clavellata* provenientes de distintas poblaciones o en la germinación asimbiótica de diferentes híbridos de *Dendrobium Swartz* (Zettlet & Hofer, 1998; Vendrame et al., 2007).

El medio Phy+CA+GA₃ mostró el mayor desarrollo de protocormos en Fase 5, alcanzando un 17,1%, lo cual coincide con lo reportado por Oña-Arias (2020), evidenciando la importancia de incluir este medio de cultivo en desarrollo germinativo *in vitro* de *O. pentadactylon*. Aunque no se ha probado esta combinación en otras especies epífitas, en *Thunia marshalliana* se ha observado que Phy+CA es eficiente para el desarrollo posterior a la germinación (Roy et al., 2007). El CA podría ser un aditivo importante para el cultivo *in vitro* de algunas orquídeas, tal como se ha observado en varias especies del género *Vanda*, influyendo positivamente en el crecimiento de protocormos (Setiaji et al., 2021). El CA es conocido por

retener compuestos fenólicos y especies reactivas de oxígeno que se acumulan en el medio durante el cultivo *in vitro* de orquídeas, evitando así el pardeamiento de los protocormos (Kaewubon et al., 2015; Kim et al., 2019). Además, en presencia de CA, aumenta la hidrólisis de la sacarosa, haciéndola más disponible para las plantas (Yeung et al., 2018, b). Por otra parte, se conoce que el GA₃ es una fitohormona que rompe la dormancia en las semillas, contribuye a su germinación, al crecimiento y proliferación celular (Misra et al., 2021). En particular, se ha evidenciado que adición de GA₃ al medio de cultivo ha resultado beneficioso en la germinación e inducción de brotes y raíces en las especies *Comparettia falcata*, *Santalum album* y *Guarianthe skinneri* (Pedroza-Manrique et al., 2005; Nikam & Barmukh, 2009; Coello et al., 2010).

En cambio, con *G. tingens*, la mayor germinación se apreció en los medios Phy y Phy+CA, mientras que se observó necrosis en KC+CA y la germinación más baja en los medios con KC y MS. Esto se debe a las diferencias en la composición de los medios de cultivo, donde la fuente de nitrógeno, cuya preferencia varía según la especie, es uno de los factores más importantes. En este contexto, Phy, KC y MS contienen una alta concentración de nitrato (NO₃⁻) y amonio (NH₄⁺) (Park & Yeung, 2018; Sigma Aldrich, s.f.). No obstante, Phy mostró una ventaja al incluir peptona, que se la conoce como una fuente de nitrógeno orgánica compuesta por péptidos y aminoácidos, cuya asimilación demanda menos energía metabólica en comparación con las fuentes de nitrógeno inorgánicas (Nadarajan et al., 2011; Panjama, 2022). En *Epidendrum ibaguense* y *Laelia rubescens*, se demostró que la peptona de Phy estimula significativamente la germinación asimbiótica, potenciando sus efectos a medida que aumenta su concentración. (Hossain, 2008; Mayo-Mosqueda, 2020). Además, Phy contiene una mayor concentración de otros compuestos orgánicos frente a MS, tales como; la tiamina, que contribuye a la inmunidad, la respuesta al estrés y el crecimiento; y la piridoxina, que favorece el crecimiento de hojas y raíces (Park & Yeung, 2018; Fitzpatrick, 2011; Fitzpatrick &

Chapman, 2020). De igual manera, Phy presenta ácido 2-N-morfolino etanosulfónico o MES, un amortiguador de pH que mantiene las formas disponibles de los nutrientes y promueve una adecuada actividad enzimática (de Klerk et al., 2008). Aunque se obtuvo una alta germinación con Phy en *G. tingens*, el rendimiento se podría optimizar en próximas investigaciones por la adición de otros componentes al medio de cultivo. En otros géneros de orquídeas terrestres la bencilaminopurina (BA) y zeatina pueden aumentar la germinación, como se demostró en *Cypripedium macranthos* y *Dactylorhiza aristata* (Tomita, 2002). También se ha observado que la completa oscuridad mejora la germinación de semillas en algunas orquídeas terrestres, tales como *Anacamptis pyramidalis* (Ostojić et al., 2022).

En cuanto al desarrollo germinativo en *G. tingens*, se observó un mayor porcentaje de protocormos con brote apical en el medio de cultivo Phy+CA. En la orquídea terrestre *Paphiopedilum wardii*, también se observó un mejor desarrollo de protocormos al aplicar CA (Zeng et al., 2012). En Phy+CA+GA₃, se observó una alta incidencia de necrosis y una disminución en la formación de brotes apicales, lo cual podría estar relacionado con la incorporación de GA₃, al inducir procesos de estrés en las plantas. Aunque no se han evaluado directamente los efectos del GA₃ en *G. tingens*, es posible que su adición haya contribuido a estos resultados, similar a lo reportado en otras orquídeas terrestres como *Dactylorhiza purpurella*. En este sentido, algunas especies producen cantidades suficientes de GA₃ de manera endógena, por lo que un aumento exógeno en su concentración podría resultar perjudicial (Hew & Clifford, 1993; Vejsadova, 2006).

4.2 Elongación de protocormos *in vitro*

En la elongación, *O. pentadactylon* tuvo un mayor crecimiento en longitud de hoja y área de protocormo en el medio de cultivo Phy+CA, respaldando las observaciones de Oña Arias (2020), que también identificó a este medio como superior para la elongación de esta especie. Se destaca que el uso de carbón activado permite un mayor desarrollo de protocormos

al adsorber compuestos tóxicos o inhibitorios en el medio, lo cual se ha observado en otras orquídeas de este género, como *Oncidium trulliferum* (Moraes et al., 2003; Sipayung et al., 2018). Por otra parte, la adición de GA₃ afectó negativamente el desarrollo y supervivencia de *O. pentadactylon*. En otras orquídeas como *Dactylorhiza purpurella* y *Paphiopedilum ciliolare*, se observó que el GA₃ también podría haber provocado elongación anormal, etiolación, clorosis y menor crecimiento de raíces (Hew & Clifford, 1993; Vejsadova, 2006; Zeng et al., 2016). En el género *Oncidium*, no se ha utilizado GA₃, pero las fitohormonas BAP y ANA han optimizado el desarrollo de protocormos en ciertos híbridos (Rianawati et al., 2021).

En *G. tingens*, el medio de cultivo en el cual las semillas germinaron fue un factor de importancia para el crecimiento del brote en la elongación, siendo Phy+CA la composición que produjo el desarrollo más favorable. Como medios de elongación, Phy y Phy+CA no indicaron diferencias significativas; sin embargo, se observó una mayor necrosis en protocormos cultivados en Phy+CA, además de una reducción en la tendencia de crecimiento en longitud de brote, número de hojas y área de protocormos. A pesar de los beneficios de la adición de CA al medio de cultivo de plantas, también se reporta su potencial efecto perjudicial en el cultivo *in vitro* de orquídeas, debido a una posible concentración excesiva o una exposición prolongada que podría inferir la reducción de la disponibilidad de nutrientes del medio de cultivo y ralentizar actividad metabólica de la planta (Ebrahimi et al. 2024). En contraste, la adición de CA en la orquídea terrestre *Pecteilis radiata* resultó efectiva para aumentar la obtención de plántulas (Kim et al., 2019). Con el fin de inducir el desarrollo vegetativo en otras especies terrestres, se ha demostrado que la citoquinina BAP promueve el crecimiento de brotes en *Cyrtopodium saintlegerianum*, *Chloraea crispera* y *Habenaria macroceratitis* (Stewart et al., 2006; Rodrigues et al., 2015; Quiroz et al., 2017).

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se ha conseguido con éxito el cultivo *in vitro* asimbiótico en *Oncidium pentadactylon* y *Govenia tingens*, estableciendo los medios de cultivo más convenientes para su germinación, desarrollo vegetativo y radicular. En particular, con las formulaciones basadas en Phy se obtuvieron los mayores resultados en germinación, desarrollo germinativo y elongación en ambas especies. En *O. pentadactylon*, se identificó que Phy y Phy+CA+GA₃ tuvieron una alta efectividad para la germinación, mientras que el uso de Phy+CA+GA₃ resultó esencial para promover un mayor desarrollo germinativo. Además, se demostró que Phy+CA es el medio más apropiado para el crecimiento durante la elongación, alcanzando una mayor longitud de brotes y una mayor área de protocormos. En cuanto a *G. tingens*, Phy y Phy+CA ocasionaron una germinación superior en comparación con los medios a base de KC o MS. En el desarrollo germinativo, Phy+CA produjo la mayor cantidad de protocormos con brote apical y resultó ser la mejor fuente de protocormos para lograr una mayor respuesta en el crecimiento de brotes en la elongación. No se encontraron diferencias del uso de Phy y Phy+CA durante la elongación, por lo que se podrían probar otras estrategias para mejorar el desarrollo en esta fase. Este estudio contribuye significativamente al conocimiento del cultivo *in vitro* de orquídeas del Ecuador, promoviendo la investigación para optimizar y estandarizar la técnica, además de impulsar programas de conservación para ambas especies.

6. TABLAS

Tabla 1. Efecto de diferentes medios de cultivo en la germinación (semana 12), desarrollo germinativo y necrosis (24 semanas) de *Oncidium pentadactylon* (Ensayo 7).

Parámetro	Medio de cultivo	
	Phy	Phy+CA+GA ₃
Germinación (%; DE; n)	98,30 ± 3,86 ^a (n=1049)	98,25 ± 4,47 ^a (n=792)
Protocormos en Fase 5 (%; DE; n)	8,47 ± 6,70 ^b (n=5427)	32,63 ± 25,72 ^a (n=2346)
Necrosis (%; DE)	2,49 ± 4,76 ^b	6,42 ± 8,96 ^a

a: Medios de cultivo estadísticamente iguales, mayor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

b: Medios de cultivo estadísticamente iguales, menor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

Tabla 2. Efecto de diferentes medios de cultivo en el desarrollo durante la elongación (semana 16) de *Oncidium pentadactylon* (Ensayo 4).

Parámetro	Medio de cultivo	
	Phy	Phy+CA
Longitud brote (cm; DE; n)	0,07 ± 0,18 ^b (n=8)	0,48 ± 0,53 ^a (n=20)
Longitud hoja (cm; DE; n)	0,10 ± 0,23 ^a (n=8)	0,17 ± 0,31 ^a (n=20)
Longitud raíz (cm; DE; n)	0,03 ± 0,09 ^a (n=8)	0,10 ± 0,15 ^a (n=20)
Número hojas (No.; DE; n)	0,25 ± 0,72 ^a (n=8)	0,59 ± 1,47 ^a (n=20)
Área protocormo (cm ² ; DE; n)	0,10 ± 0,20 ^b (n=8)	0,72 ± 0,89 ^a (n=20)
Necrosis (%)	47,22	25,00

a: Medios de cultivo estadísticamente iguales, mayor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

b: Medios de cultivo estadísticamente iguales, menor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

Tabla 3. Efecto de diferentes medios de cultivo en la germinación (semana 12), desarrollo germinativo y necrosis (semana 42) de *Govenia tingens* (Ensayo 1).

Parámetro	Medio de cultivo			
	Phy	Phy+CA	Phy+CA+GA3	KC+CA
Germinación (%; DE; n)	87,92 ± 13,43 ^{abc} (n=164)	85,16 ± 16,63 ^a (n=362)	33,71 ± 26,16 ^d (n=481)	74,75 ± 13,42 ^a (n=515)
Fase 5 (%; DE; n)	44,44 ± 43,25 ^a (n=36)	3,42 ± 16,75 ^b (n=53)	22,22 ± 40,37 ^{ab} (n=11)	0,00 ± 0,00 [*]
Brote apical (%; DE; n)	16,67 ± 36,51 ^b (n=36)	43,16 ± 47,56 ^a (n=53)	0,00 ± 0,00 ^b (n=11)	0,00 ± 0,00 [*]
Brotos de hoja (%; DE; n)	19,05 ± 37,00 ^a (n=36)	28,21 ± 44,12 ^a (n=53)	16,67 ± 40,82 ^a (n=11)	0,00 ± 0,00 [*]
Necrosis (%)	13,49 ± 27,19 ^a	7,69 ± 21,58 ^{ab}	44,44 ± 50,18 ^a	100,00 ± 0,00 [*]

a: Medios de cultivo estadísticamente iguales, mayor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

b, c, d: Medios de cultivo estadísticamente iguales, menor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

*: No se realizó pruebas estadísticas por necrosis del 100% en KC+CA.

Tabla 4. Efecto de diferentes medios de cultivo en el desarrollo durante la elongación (semana 12) de *Govenia tingens*.

Medio germinación: Phy		
Parámetro	Medio elongación	
	Phy	Phy+CA
Longitud brote (cm; DE;n)	0,06 ± 0,09 ^{Ab} (n=13)	0,14 ± 0,14 ^{aB} (n=10)
Longitud hoja (cm; DE; n)	0,84 ± 1,04 ^{aA} (n=13)	0,61 ± 1,07 ^{aA} (n=10)
Longitud raíz (cm; DE; n)	0,09 ± 0,31 ^{aA} (n=13)	0,33 ± 0,59 ^{aA} (n=10)
Número hojas (No.; DE; n)	0,15 ± 0,38 ^{aA} (n=13)	0,00 ± 0,00 ^{aA} (n=10)
Área protocormo (cm ² ; DE; n)	0,88 ± 0,63 ^{aA} (n=13)	0,45 ± 0,71 ^{aA} (n=10)
Necrosis (%)	0,00	7,69
Medio germinación: Phy+CA		
Parámetro	Medio elongación	
	Phy	Phy+CA
Longitud brote (cm; DE; n)	0,30 ± 0,26 ^{aA} (n=7)	0,17 ± 0,15 ^{aA} (n=4)
Longitud hoja (cm; DE; n)	0,49 ± 1,29 ^{aA} (n=7)	0,00 ± 0,01 ^{aA} (n=4)
Longitud raíz (cm; DE;n)	0,06 ± 0,15 ^{aA} (n=7)	0,00 ± 0,00 ^{aA} (n=4)
Número hojas (No.; DE; n)	0,15 ± 0,14 ^{aA} (n=7)	0,00 ± 0,00 ^{aA} (n=4)
Área protocormo (cm ² ; DE; n)	0,90 ± 1,04 ^{aA} (n=7)	0,31 ± 0,48 ^{aA} (n=4)
Necrosis (%)	0,00	0,00

a: Medios de cultivo de germinación estadísticamente iguales, mayor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

b: Medios de cultivo de germinación estadísticamente iguales, menor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

A: Medios de cultivo de elongación estadísticamente iguales, mayor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

B: Medios de cultivo de elongación estadísticamente iguales, menor promedio, de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

7. FIGURAS

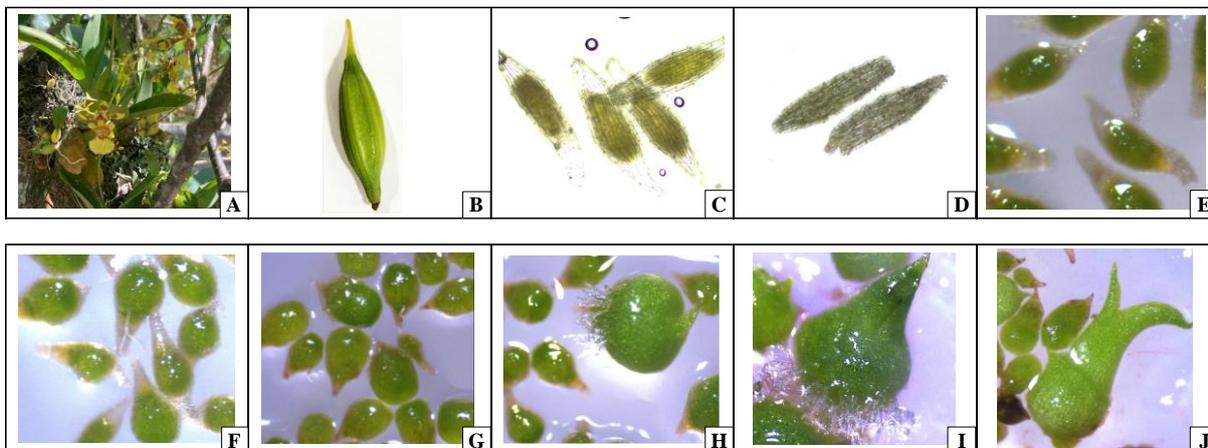
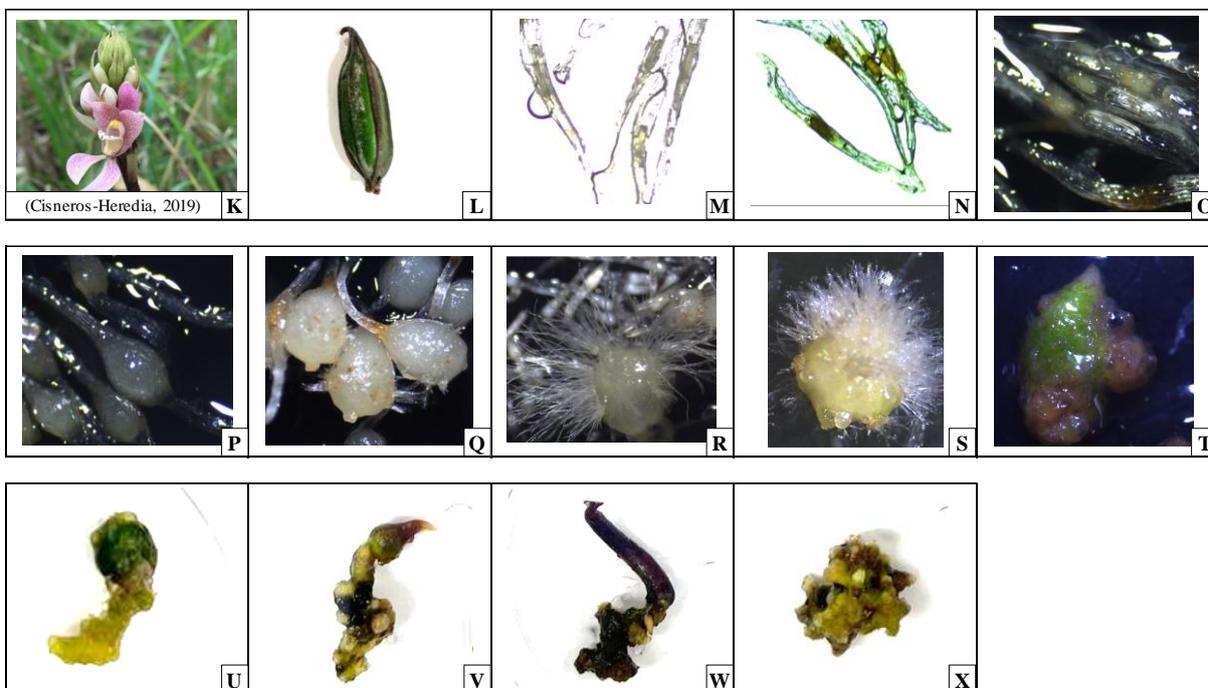
Oncidium pentadactylon*Govenia tingens*

Figura 1. Fases de germinación de *Oncidium pentadactylon* y *Govenia tingens*. A. Flor de *O. pentadactylon*. B. Cápsula madura. C. Semillas viables. D. Semillas no viables. E. Fase 0. F.

Fase 1. G. Fase 2. H. Fase 3. I. Fase 4. J. Fase 5. (Ver fases en anexo A). K. Flor de *G.*

tingens. L. Cápsula madura. M. Semillas viables. N. semillas no viables. O. Fase 0. P. Fase 1.

Q. Fase 2. R. Fase 3. S. Fase 4. J. Fase 5. K. Brote apical. L. Brote de hoja. M. Hoja. O.

Estructura callosa sin diferenciación. (Ver fases en anexo A).

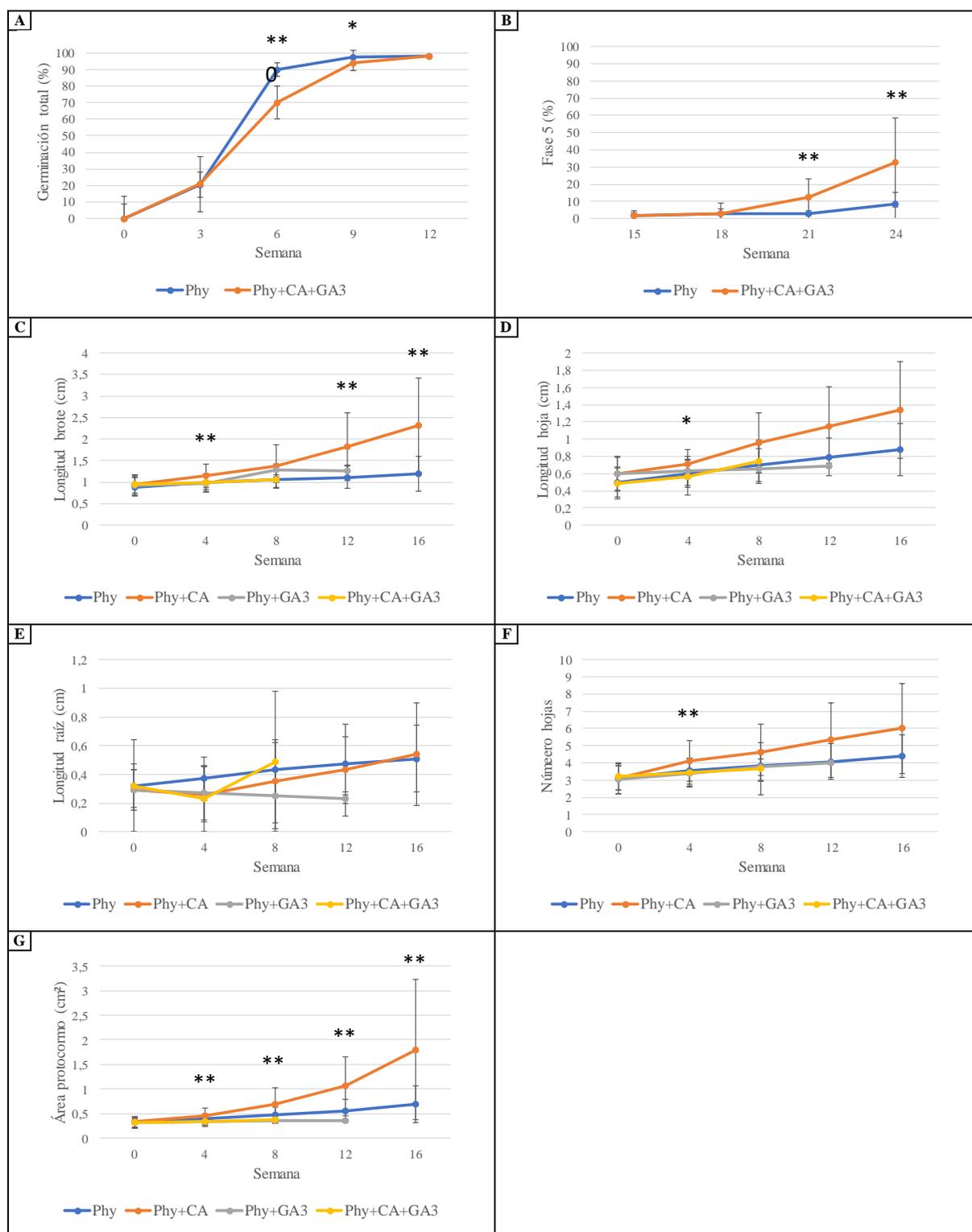
Tiempo	Medio de cultivo			
	Phy	Phy+CA	Phy+GA3	Phy+CA+GA3
Semana 0				
Semana 4				
Semana 8				
Semana 12				
Semana 16				

*Cuadros en gris: material vegetal descartado por necrosis.

Figura 2. Elongación *in vitro* de brotes apicales de *Oncidium pentadactylon* en cuatro medios de cultivo distintos durante 16 semanas.

Medio de cultivo germinación	Tiempo	Medio de cultivo elongación	
		Phy	Phy+CA
Phy	Semana 0		
	Semana 4		
	Semana 8		
	Semana 12		
Phy+CA	Semana 0		
	Semana 4		
	Semana 8		
	Semana 12		

Figura 3. Elongación *in vitro* de brotes apicales de *Govenia tingens* en tres medios de cultivo distintos durante 12 semanas.

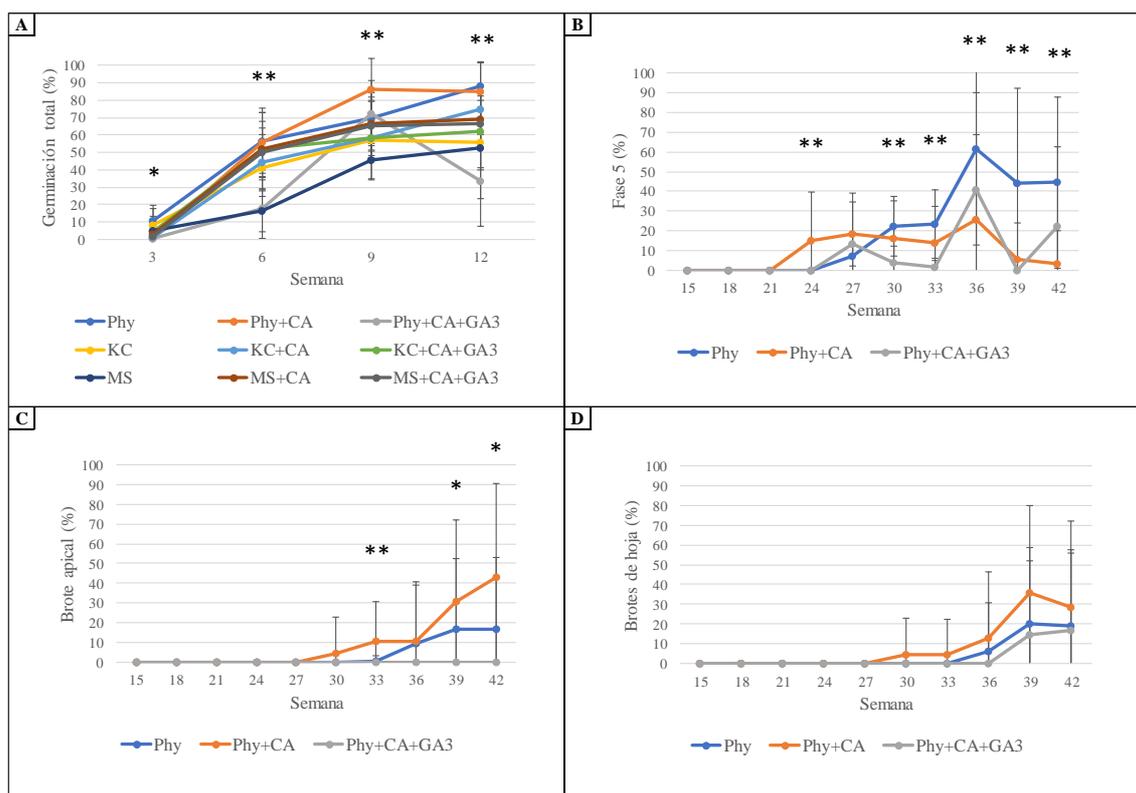


*: Medios de cultivo estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

** : Medios de cultivo estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,01$.

Los valores están representados en promedios \pm desviación estándar.

Figura 4. Gráficos lineales del porcentaje de germinación y elongación *in vitro* de *Oncidium pentadactylon* a través del tiempo. A: Porcentaje de germinación, evaluado hasta la semana 12. B: Porcentaje de desarrollo de protocormos en Fase 5, evaluado desde la semana 15 hasta la semana 24 en cultivo. C: crecimiento en base a la longitud de brote (cm). D: Crecimiento de longitud de hoja más larga (cm). E: Crecimiento de longitud de raíz más larga (cm). F: Número de hojas nuevas. G: Crecimiento en área de protocormo (cm²).



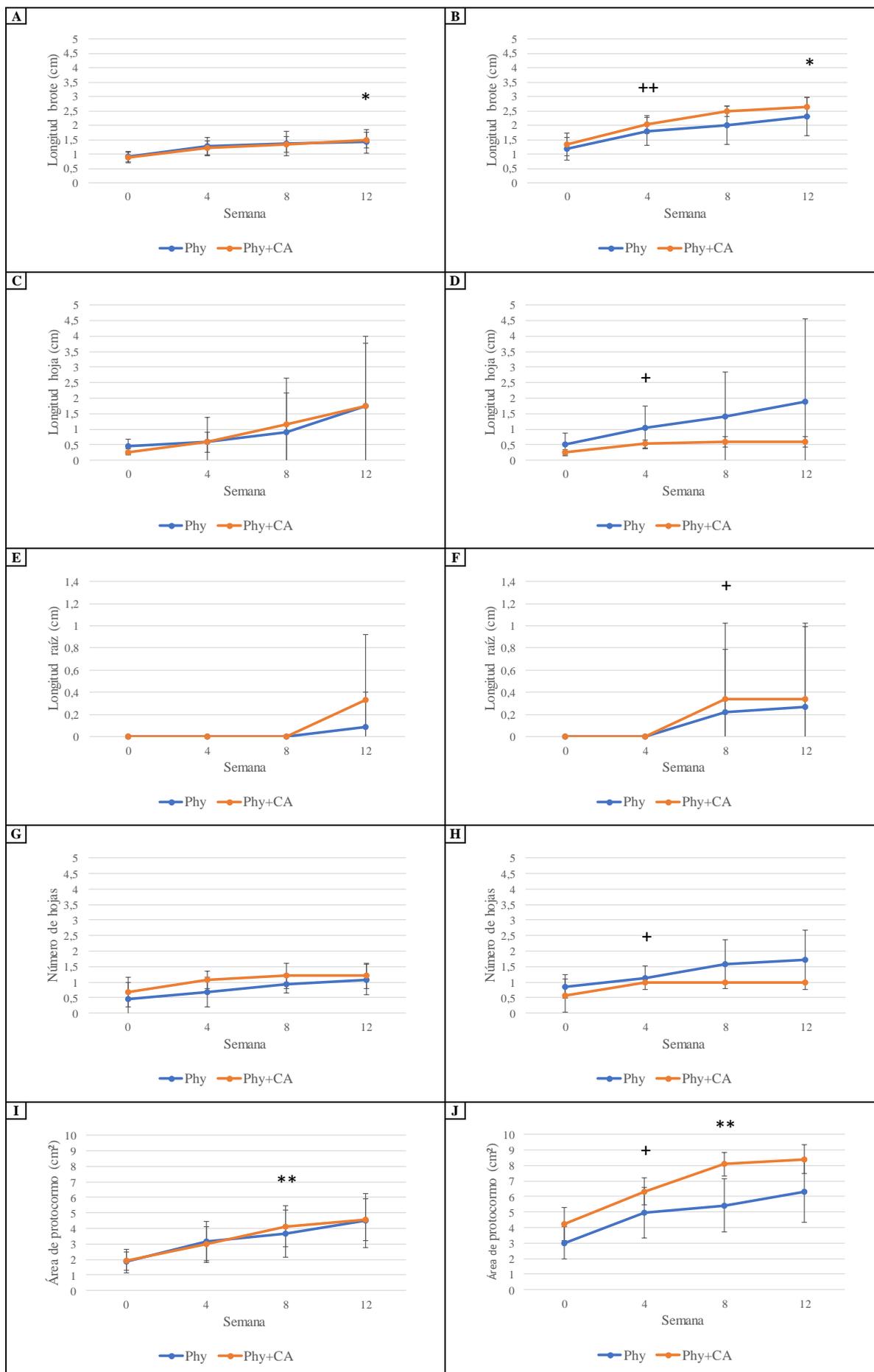
*: Medios de cultivo estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

** : Medios de cultivo estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,01$.

Los valores están representados en promedios \pm desviación estándar.

Figura 5. Gráficos lineales del porcentaje de germinación y desarrollo germinativo de *Govenia tingens*

a través del tiempo. A. Porcentaje de germinación, evaluado en la semana 12. B. Porcentaje de protocormos en Fase 5, evaluado en la semana 42. C. Porcentaje de protocormos con un brote apical, evaluado en la semana 42. D. Porcentaje de protocormos con un brote de hoja, evaluado en la semana



*: Medios de cultivo de germinación estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

** : Medios de cultivo de germinación estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,01$.

+: Medios de cultivo de elongación estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,05$.

++: Medios de cultivo de elongación estadísticamente diferentes de acuerdo con pruebas de Tukey, $\alpha = 0,01$.

Los valores están representados en promedios \pm desviación estándar.

Figura 6. Gráficos lineales del desarrollo en la elongación de *Govenia tingens* a través del tiempo. A-B. Promedio de crecimiento de longitud de brote (cm), protocormos germinados en Phy (A) y Phy+CA (B). C-D. Promedio de crecimiento de longitud de hoja más larga (cm), protocormos germinados en Phy (C) y Phy+CA (D). E. Promedio de crecimiento de longitud de raíz más larga (cm), protocormos germinados en Phy (E) y Phy+CA (F). G-H. Promedio de número de hojas nuevas, protocormos germinados en Phy (G) y Phy+CA (H). I. Promedio de crecimiento en área (cm²), protocormos germinados en Phy (I) y Phy+CA (J).

8. REFERENCIAS

- An, J., Kim, P. B., Park, H. B., Kim, S., Park, H. J., Lee, C. W & Hwang, J. E. (2021). Effects of different growth media on *in vitro* seedling development of an endangered orchid species *Sedirea japonica*. *Plants*, 10(6), 1193.
- Anghelescu, N. E., Vafaei, Y., Ahmadzadeh, K., & Chen, J. T. (2023). Asymbiotic seed germination in terrestrial orchids: problems, progress, and prospects. *Advances in Orchid Biology, Biotechnology and Omics*, 221-260.
- Batygina, T. B., Bragina, E. A., & Vasilyeva, V. E. (2003). The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45(2), 21-34.
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A., & Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, (38), 145-157.
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*, 1(1), 48.
- Cabej, N. (2019). Chapter 15 - Plant Epigenetics. *Epigenetic Principles of Evolution (Second Edition)*. Academic Press. Pages 733-781. ISBN 9780128140673. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814067-3.00015-6>.
- Calevo, J., Copetta, A., Marchioni, I., Bazzicalupo, M., Pianta, M., Shirmohammadi, N., ... & Giovannini, A. (2022). The use of a new culture medium and organic supplement to improve *in vitro* early-stage development of five orchid species. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 156(1), 143-151.
- Chen, Y., Goodale, U. M., Fan, X. L., & Gao, J. Y. (2015). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*, 3, 367-378.
- Chugh, S., Guha, S., & Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507-520.
- Cisneros-Heredia, D. (2019). *Govenia tingens*. <https://ecuador.inaturalist.org/observations/19630007>

- Coello, C. Y., Miceli, C. L., Orantes, C., DenDooven, L., & Gutiérrez, F. A. (2010). Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & WE Higgins. *Gayana Botánica*, 67(1), 19-26.
- Cueva, E., & Moya, M. (2015). Evaluación de tres crioprotectores para el almacenamiento de nitrógeno líquido de semillas de orquídeas nativas del ecuador: *Elleathus*, *Epidendrum*, *odontoglossum* y *Oncidium*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9218/1/UPS-QT06860.pdf>
- da Silva, J. T. (2013). Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 7(1), 1-52.
- de Klerk, G. J., Hanecakova, J., & Jásik, J. (2008). Effect of medium-pH and MES on adventitious root formation from stem disks of apple. *Plant cell, tissue and organ culture*, 95, 285-292.
- De, L. C. (2020). Morphological diversity in orchids. *International Journal of Botany Studies*, 5(5), 229-238.
- De, L. C., & Pathak, P. (2018). Conservation, management and utilization of orchid genetic resources. *Orchid Society of India*, 32, 81-91.
- Dolce, N. R., Medina, R. D., Terada, G., González-Arno, M. T., & Flachslan, E. A. (2020). *In vitro* propagation and germplasm conservation of wild orchids from South America. *Orchid biology: recent trends & challenges*, 37-94.
- Ebrahimi, T., Piri, K., Abdoli, A., & Tohidfar, M. (2024). Effect of Activated Charcoal on *in vitro* Propagation of *Lythrum salicaria* L. (*Lythraceae*). *Journal of Medicinal Plants & By-Products*, 13(2).
- Ersts, P. J. DotDotGoose (version 1.7.0). (2024). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/dotdotgoose.
- Fatahi, M., Vafae, Y., Nazari, F., & Tahir, N. A. R. (2022). *In vitro* asymbiotic seed germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis simia* Lam.: A threatened terrestrial orchid species. *South African Journal of Botany*, 151, 156-165.
- Fay, M. F. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanical studies*, 59, 1-6.

- Fitzpatrick, T. B. (2011). Vitamin B6 in plants: more than meets the eye. In *Advances in botanical research* (Vol. 59, pp. 1-38). Academic Press.
- Fitzpatrick, T. B., & Chapman, L. M. (2020). The importance of thiamine (vitamin B1) in plant health: From crop yield to biofortification. *Journal of Biological Chemistry*, 295(34), 12002-12013.
- Gaskett, A. C., & Gallagher, R. V. (2018). Orchid diversity: Spatial and climatic patterns from herbarium records. *Ecology and Evolution*, 8(22), 11235-11245.
- GBIF. (2024). *Oncidium pentadactylon Lindl.* Global Biodiversity Information facility. <https://www.gbif.org/species/5321964> <https://www.gbif.org/species/5321964>
- Giraldo, G., & Betancur, J. (2011). Guía de campo de las orquídeas de Santa María (Boyacá, Colombia). Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales.
- Guangzhou Micro-shot Technology Co. (2024). M Shot Image Analysis System (Version 1.1.6) [Software]. www.m-shot.com
- Hernández-Mejía, J. A., Rosa-Manzano, E. D. L., & Delgado-Sánchez, P. (2024). Ecosystem services provided by orchids: a global analysis. *Botanical Sciences*, 102(3), 671-685.
- Hew, C. S., & Clifford, P. E. (1993). Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. *Plant growth regulation*, 13, 231-239.
- Hossain, M. M. (2008). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth.(Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*, 7(20).
- Hossain, M. M., Sharma, M., da Silva, J. A. T., & Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 479-487.
- Image-J. (2024). Fiji 64 bit. [Software]. www.imagej.net
- Kaewubon, P., Hutadilok-Towatana, N., Teixeira da Silva, J. A., & Meesawat, U. (2015). Ultrastructural and biochemical alterations during browning of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz) callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121, 53-69.
- Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 5, 375-391.

- Kendon, J. P., Rajaovelona, L., Sandford, H., Fang, R., Bell, J., & Sarasan, V. (2017). Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: *in vitro* collecting as a case study. *Botanical studies*, 58, 1-14.
- Kim, D. H., Kang, K. W., Enkhtaivan, G., Jan, U., & Sivanesan, I. (2019). Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron on non-symbiotic *in vitro* seed germination of *Pecteilis radiata* (Thunb.) Raf. *South African Journal of Botany*, 124, 144-150.
- Knudson, L (1922) Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gaz* 73:1–25
- Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 15: 214 -217.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P., & Kongbangkerd, A. (2018). *In vitro* propagation of *Epipactis flava* Seidenf., an endangered rheophytic orchid: a first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135, 419-432.
- Lal, N., & Singh, M. (2020). Prospects of plant tissue culture in orchid propagation: A review. *Indian Journal of Biology*, 7(2), 103-110.
- 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.
- Longchar, T. B., & Deb, C. R. (2022). Optimization of *in vitro* propagation protocol of *Dendrobium heterocarpum* Wall. ex. Lindl. and clonal genetic fidelity assessment of the regenerates: An orchid of horticultural and medicinal importance. *South African Journal of Botany*, 149, 67-78.
- Mawinei, N., & Paramitha, Q. (2024). Comparative Anatomy of Roots and Leaves in Epiphytic and Terrestrial Orchids: Insights into Adaptations and Ecological Strategies. *Law and Economics*, 18(2), 73-85.
- Mayo-Mosqueda, A., Maceda-López, L. F., Andrade-Canto, S. B., Noguera-Savelli, E., Caamal-Velázquez, H., Cano-Sosa, J. D. S., & Alatorre-Cobos, F. (2020). Efficient protocol for *in vitro* propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination. *South African Journal of Botany*, 133, 264-272.

- Microsoft Corporation. (2019). Microsoft Excel (Versión 2019) [Software]. <https://www.microsoft.com>
- Minitab, LLC. (2023). Minitab (Version 21.4.2) [Software]. <https://www.minitab.com>
- Misra, V., Mall, A. K., Khan, M. I. R., & Ansari, M. I. (2021). Phytohormone transporters during abiotic stress response. In *Transporters and Plant Osmotic Stress* (pp. 235-260). Academic Press.
- Missouri Botanical Garden. (2024). *Govenia tingens* Poepp. & Endl. Tropicos.org. <https://www.tropicos.org/name/23506793>
- Moraes, A. P., Engel, T. B. J., Forni-Martins, E. R., De Barros, F., Felix, L. P., & Cabral, J. S. (2022). Are chromosome number and genome size associated with habit and environmental niche variables? Insights from the Neotropical orchids. *Annals of Botany*, 130(1), 11-25.
- Moraes, L. M., Faria, R. T., & Cuquel, F. L. (2003). Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. In *V International Symposium on New Floricultural Crops* 683 (pp. 383-390).
- Moreira, A. S. F. P., & Isaias, R. M. D. S. (2008). Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian archives of biology and technology*, 51, 83-93.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T. R., Seaton, P. T., & Pritchard, H. W. (2011). Nutritional requirements for *in vitro* seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 204-212.
- Newman, B. (2009). Orchids as indicators of ecosystem health in urban bushland fragments. Murdoch, Australia: Murdoch University.
- Nikam, T. D., & Barmukh, R. B. (2009). GA3 enhances *in vitro* seed germination in *Santalum album*. *Seed Science and Technology*, 37(2), 276-280.
- 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).
- Ostojić, J., Ljubojević, M., Narandžić, T., & Pušić, M. (2022). *In vitro* culture conditions for asymbiotic germination and seedling development of *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. and *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. *South African Journal of Botany*, 150, 829-839.

- Paek, K. Y., & Yeung, E. C. (1991). The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N 6-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 24, 65-71.
- Panjama, K., Inkham, C., Sato, T., Ohyama, T., Ohtake, N., & Ruamrungsri, S. (2022). Nitrogen uptake and translocation in *Vanda* orchid after roots and leaves application of different forms ¹⁵N tracer. *Horticulturae*, 8(10), 902.
- Park, J., & Yeung, E. C. (2018). Orchid seed germination and micropropagation II: Media information and composition. *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*, 127-150.
- Pedroza-Manrique, J., Fernandez-Lizarazo, C., & Suarez-Silva, A. (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compantia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 838-843.
- Prakash, B., Bais, R. T., Singh, P., Khan, S., & Nagar, B. M. (2013). Effect of different pH on *in vitro* seed germination of *Vanda tessellata* (Roxb.) hook. Ex. G an endangered medicinal orchid. *Advances in Life Science and Technology*, 8, 4-7.
- Quijia-Lamiña, P. H., Baquero, L. E., Kane, M. E., & Zettler, L. W. (2023). Asymbiotic and symbiotic seed culture of *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay & HR sweet from Ecuador. *South African Journal of Botany*, 159, 164-178.
- Quijia-Lamiña, P. H., Baquero, L. E., Kane, M. E., & Zettler, L. W. (2023). *In Vitro* Seed Germination and Seedling Development of *Dracula felix* (Luer) Luer—An Orchid Native to Ecuador. *Diversity*, 15(6), 732.
- Quijia-Lamiña, P. H., Baquero, L. E., Kane, M. E., & Zettler, L. W. (2023). Symbiotic seed germination and seedling development of *Epidendrum geminiflorum* Knuth from Ecuador. *Diversity*, 15(2), 236.
- Quiroz, K., Saavedra, J., Vogel, H., Verdugo, G., Caligari, P. D., & García-González, R. (2017). *In vitro* asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Applications in plant sciences*, 5(8), 1600142.

- 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.
- Reddy, J. (2016). Nutrient media used for micropropagation of orchids: a research review. *World J Pharm Res*, 5, 1719-1732.
- Rianawati, S., Dwiatmini, K., & Marwoto, B. (2021). Hybridization and *In Vitro* Seed Germination of a Commercial Hybrid *Oncidium* Orchid in Indonesia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 715, No. 1, p. 012034). IOP Publishing.
- Rodrigues, L. A., Paiva, V. B. D., Boaretto, A. G., Oliveira, J. F. D., Torrezan, M. D. A., Lima, S. F. D., & Otoni, W. C. (2015). *In vitro* propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f.(*Orchidaceae*), a native orchid of the Brazilian savannah. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15(1), 10-17.
- Roy, A. R., Patel, R. S., Patel, V. V., & Kumar, R. (2007). *In vitro* propagation of *Thunia marshalliana* Rchb. f. an epiphytic-cum-terrestrial orchid. *Journal of Ornamental Horticulture*, 10(1), 15-19.
- 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.
- Salazar, J. M., Pomavilla, M., Pollard, A. T., Chica, E. J., & Peña, D. F. (2020). Endophytic fungi associated with roots of epiphytic orchids in two Andean forests in Southern Ecuador and their role in germination. *Lankesteriana*, 20(1), 37-47.
- 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.
- Seaton, P. T., Hosomi, S. T., Custódio, C. C., Marks, T. R., Machado-Neto, N. B., & Pritchard, H. W. (2018). Orchid seed and pollen: a toolkit for long-term storage, viability assessment and conservation. *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*, 71-98.

- Seaton, P. T., Hu, H., Perner, H., & Pritchard, H. W. (2010). *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. *The Botanical Review*, 76, 193-203.
- Setiaji, A., ANNISA, R. R., SANTOSO, A. D., KINASIH, A., & RIYADI, A. D. (2021). Factors affecting mass propagation of Vanda orchid *in vitro*. *Cell Biology and Development*, 5(2).
- Sheelavantmath, S. S., Murthy, H. N., Pyati, A. N., Ashok Kumar, H. G., & Ravishankar, B. V. (2000). *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 151-154.
- Sigma-Aldrich. (s.f.). PHYTAMAX™ ORCHID MAINTENANCE MEDIUM. P6668 - Phytigel: Product Information. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/207/535/p6668dat.p>
- Sipayung, P., Matanari, J., Lafau, M. B., Sulastri, Y. S., Ginting, B. B., Sihombing, D. R., ... & Giawa, T. (2018). The effect of activated charcoal dose and benzyl amino purine concentration on the growth of orchid plantlets in Murashige and Skoog media *in vitro*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 205, No. 1, p. 012025). IOP Publishing.
- 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.
- Stewart, S. L., & Zettler, L. W. (2002). Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquisetata*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany*, 72(1), 25-35.
- Suzuki, R. M., Moreira, V. C., Pescador, R., & de Melo Ferreira, W. (2012). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48, 500-511.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances*, 26(6), 618-631.
- Tomita, M. (2002). The Cytokinin Preference for Immature Embryo Culture of Some Terrestrial Orchids©. In *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society* (Vol. 52, p. 332).

- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2020). Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. *International Journal of Agronomy*, 2020(1), 2795108.
- Valencia-Glushchenko, N., Oña-Arias, C. G., Orellana, M., Ortega, M., Montero-Oleas, A., & de Lourdes Torres, M. (2024). *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling development of four endangered Ecuadorian orchids: *Epidendrum Jamiesonis*, *Pleurothallis pulchella*, *Oncidium pentadactylon*, and *Elleanthus capitatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 158(3), 60.
- Vejsadova, H. A. N. A. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(1), 109-113.
- Vendrame, W. A., Carvalho, V. S., & Dias, J. M. M. (2007). *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*, 114(3), 188-193.
- Yeung, E. C. (2017). A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical studies*, 58(1), 33.
- Yeung, E. C. (2022). The orchid embryo—“An embryonic protocorm”. *Botany*, 100(9), 691-706.
- Yeung, E. C., Li, Y. Y., & Lee, Y. I. (2018). Understanding seed and protocorm development in orchids. *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*, 3-26.
- Yeung, E. C., Park, J., & Harry, I. S. (2018). Orchid seed germination and micropropagation I: Background information and related protocols. *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*, 101-125.
- Zeng, S., Huang, W., Wu, K., Zhang, J., Teixeira da Silva, J. A., & Duan, J. (2016). *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical reviews in biotechnology*, 36(3), 521-534.
- Zeng, S., Wu, K., da Silva, J. A. T., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., & Duan, J. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138, 198-209.

- Zettler, L. W., & Hofer, C. J. (1998). Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*, 39(3), 189-195.
- Zhao, D. K., Mou, Z. M., & Ruan, Y. L. (2024). Orchids acquire fungal carbon for seed germination: pathways and players. *Trends in Plant Science*.
- Zhao, D. K., Selosse, M. A., Wu, L., Luo, Y., Shao, S. C., & Ruan, Y. L. (2021). Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi derived from protocorms or seedlings. *Frontiers in plant science*, 12, 701152.

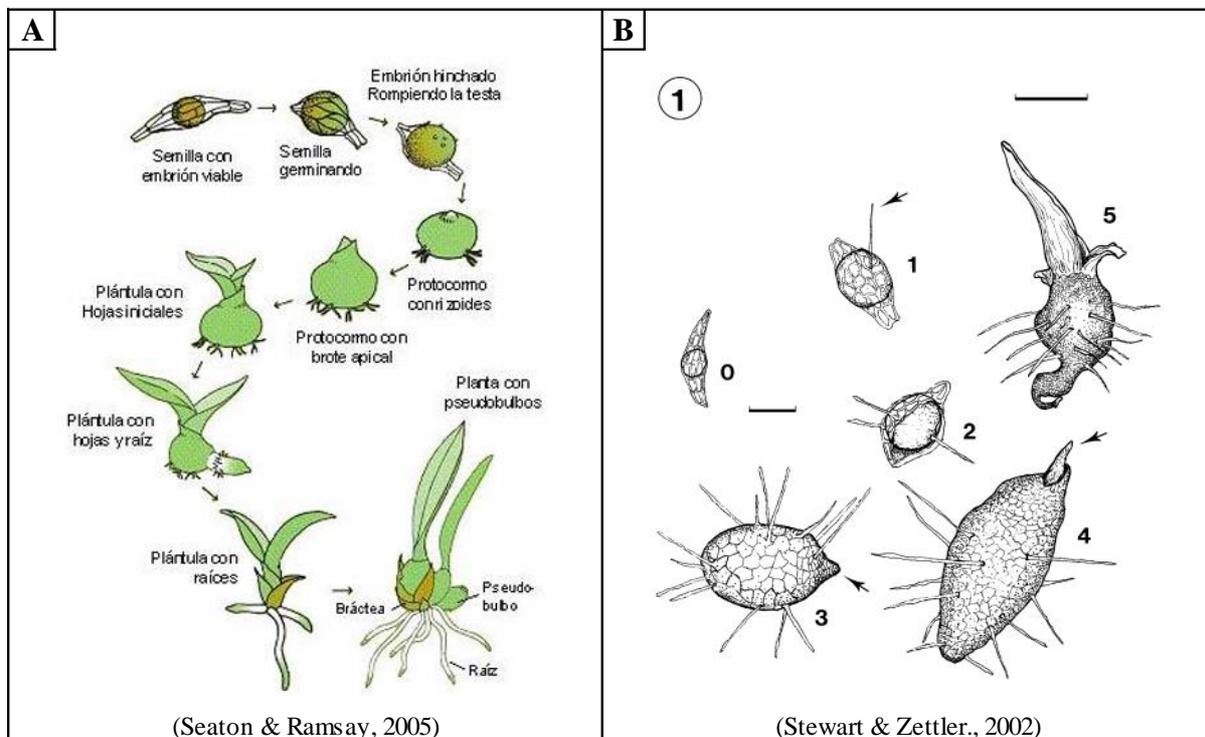
9. ANEXOS

ANEXO 1: Fases de germinación y desarrollo germinativo de las especies de orquídea estudiadas.

Fase	<i>Oncidium pentadactylon</i>
0	Semilla con embrión viable.
1	Ensanchamiento del embrión, germinación.
2	Rotura de la testa por crecimiento de embrión.
3	Crecimiento de protocormo y formación de rizoides.
4	Desarrollo de brote apical.
5	Generación de hojas iniciales.
Fase	<i>Govenia tingens</i>
0	Semilla con embrión viable.
1	Ensanchamiento del embrión, germinación.
2	Rotura de la testa por crecimiento de embrión, formación de rizoides.
3	Crecimiento de protocormo y aumento de rizoides.
4	Desarrollo de promeristema.
5	Generación de región subterránea engrosada, producción de pigmentos fotosintéticos.
Brote apical	Desarrollo del brote apical, con morfología globular en la sección distal.
Brote de hoja	Desarrollo de brote de hoja inicial desde brote apical.
Hoja	Crecimiento del brote de hoja inicial.

ANEXO 2: Referencias de germinación y desarrollo germinativo para *Oncidium*

pentadactylon y *Govenia tingens*. A. Referencia para *O. pentadactylon*: desarrollo de *Laelia*, género de orquídeas epífitas. B. Referencia para *G. tingens*: desarrollo de *Habenaria*, género de orquídeas terrestres.



ANEXO 3: Diseño experimental para el lanzamiento de ensayos de germinación *in vitro* en
O. pentadactylon y *G. tingens*.

<i>Oncidium pentadactylon</i>		
Protocolo de desinfección	Medios de cultivo	Número de cajas/medio
Cápsulas sumergidas en:		
1) Et-OH (70%) por 5 min.	Phy	4
2) NaClO (2,5%) + 2 gotas Tween-20®/100 mL Solución por 12 min.	Phy+CA (2 g/L) + GA3 (0,2 mg/L)	6
3) Lavados con H2O destilada estéril		
<i>Govenia tingens</i>		
Protocolo de desinfección	Medios de cultivo	Número de cajas/medio
	Phy	3
	Phy+CA (2 g/L)	3
Cápsulas sumergidas en:	Phy+CA (2 g/L) + GA3 (0,2 mg/L)	3
1) Et-OH (70%) por 5 min.	KC	3
2) NaClO (2,5%) + 2 gotas Tween-20®/100 mL Solución por 12 min.	KC+CA (2 g/L)	3
	KC+CA (2 g/L) + GA3 (0,2 mg/L)	3
3) Lavados con H2O destilada estéril	MS	3
	MS+CA (2 g/L)	3
	MS+CA (2 g/L) + GA3 (0,2 mg/L)	3

ANEXO 4: Diseño experimental para el lanzamiento de ensayos de elongación en *O. pentadactylon* y *G. tingens*. Las concentraciones de aditivos son las mismas utilizadas en los medios de cultivo en la germinación.

<i>Oncidium pentadactylon</i>				
Medios de cultivo	Material vegetal de inicio	No. De protocormos totales en fase 5	No. de frascos	No. de protocormos por frasco
Phy		36	6	6
Phy+CA	Fase 5, germinación en Phy	36	6	6
Phy+GA3		36	6	6
Phy+CA+GA3		36	6	6
<i>Govenia tingens</i>				
Medios de cultivo	Material vegetal de inicio	No. De protocormos totales en fase 5	No. de frascos	No. de protocormos por frasco
Phy	Brote apical/Brote de hoja, germinación en Phy	13	4	3
Phy+CA		13	4	3
Phy	Brote apical/Brote de hoja, germinación en Phy+CA	7	3	2-3
Phy+CA		7	3	2-3