

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Germinación asimbiótica en condiciones in vitro de *Oncidium pentadactylon* y *Elleanthus capitatus*: orquídeas nativas del Ecuador

Claudia Gissela Oña Arias

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Germinación asimbiótica en condiciones in vitro de *Oncidium pentadactylon* y *Elleanthus capitatus*: orquídeas nativas del Ecuador

claudia Gissela Oña Arias

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD

Quito, 4 de mayo de 2020

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 el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Claudia Gissela Oña Arias

Código: 00130417

Cédula de identidad: 1726338740

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

El cultivo *in vitro* de orquídeas puede ser una estrategia clave para su conservación. Las orquídeas son plantas monocotiledóneas que se caracterizan por poseer un pétalo de textura o color diferente a los demás, denominado labelo. Estas plantas son importantes a nivel ecológico, debido a las interacciones que tienen con otros organismos y a que cumplen con un servicio ecosistémico de regulación hídrica. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) cataloga a varias especies de orquídeas como especies vulnerables debido a la destrucción de su hábitat, el cambio de humedad y temperatura por el cambio climático, y la sobre colección de individuos. Además, la germinación de sus semillas en condiciones naturales es muy limitada ya que éstas no poseen endospermo. Para suplir la ausencia de endospermo hacen simbiosis con hongos micorrícicos, lo cual ayuda en la obtención de nutrientes necesarios para su desarrollo. El cultivo *in vitro* representa una alternativa para la propagación de este grupo de plantas, ya que el medio de cultivo puede proporcionar los nutrientes necesarios para su desarrollo. En este estudio se realizó el cultivo *in vitro* de la orquídea epífita *Oncidium pentadactylon* y la orquídea terrestre *Elleanthus capitatus*, ambas nativas del Ecuador. Se estudió la germinación *in vitro* asimbiótica donde se probaron 10 tratamientos, que resultan de la combinación de tres medios de cultivo (Murashige & Skoog, Knudson C y PhytamaxTM), ácido giberélico (GA₃ 2mg/L) y carbón activado (CA 2g/L). Se analizó la germinación, elongación y enraizamiento. El medio PhytamaxTM (Phy) más GA₃ fue el que se obtuvo más semillas germinadas para *O. pentadactylon* (81.6% en 3 meses); mientras que para *E. capitatus*, el mejor medio fue Knudson C más CA y GA₃ (58.7% en 3 meses). Adicionalmente, se realizó un ensayo de elongación y enraizamiento *in vitro* para *Oncidium pentadactylon*, donde el mejor medio para elongación fue Phy (16 mm en 3 meses) y el mejor medio para enraizamiento fue Phy más ácido indol butírico (IBA 1.5mg/L) (5 raíces-16mm por plántula). Los resultados obtenidos en este estudio ofrecen una alternativa eficiente para la propagación *in vitro* de estas dos especies, lo cual puede contribuir a la conservación de las orquídeas nativas en el Ecuador.

Palabras clave: *O. pentadactylon*, *E. capitatus*, orquídeas, cultivo *in vitro*, germinación, asimbiótica

ABSTRACT

In vitro culture of orchids may be a key strategy for their conservation. Orchids are monocotyledonous plants that possess a petal with a texture or color different from the others called the lip. These plants are necessary for the environment. They have significant interactions with other organisms, and they accomplish with an ecosystem service of water regulation. The International Union for Conservation of Nature (IUCN) lists several orchids as vulnerable species due to the destruction of their habitat, the change in humidity and temperature, and individual's over-collection. Besides, seeds germination in natural conditions is limited because they do not possess an endosperm. To supply the lack of endosperm, seeds acquire a symbiosis with mycorrhizal, which helps in getting the nutrients needed for its development. *In vitro* culture represents an alternative for the propagation of this group of plants, since the culture medium can provide the required nutrients for their development. This study introduces seeds of *Oncidium pentadactylon* and *Elleanthus capitatus* on *in vitro* conditions. It analyzes asymbiotic *in vitro* germination at 10 treatments. They combine three culture media (Murashige & Skoog, Knudson C, and PhytamaxTM), gibberellic acid (GA₃ 2mg/L), and activated carbon (CA 2g/L). It examines germination, elongation, and rooting. The highest germination rate was seen in PhytamaxTM (Phy)+GA₃ (81.6% in 3 months). While for *E. capitatus*, the best treatment was Knudson C+CA+GA₃ (58.7% in 3 months). Additionally, it presents an elongation and rooting analysis for *Oncidium pentadactylon*. The best treatment for elongation was Phy (16 mm in 3 months). The best medium for rooting was Phy+indole butyric acid (IBA 1.5mg / L) (5 roots-16mm per seedling). The results obtained in this study propose an efficient alternative for the *in vitro* propagation of *O. pentadactylon* and *E. capitatus*, which may contribute to the conservation of native orchids in Ecuador.

Key words: *O. pentadactylon*, *E. capitatus*, orchids, *in vitro* culture, germination, asymbiotic

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1	Morfología de las orquídeas.....	11
1.2	Hábito de crecimiento.....	12
1.3	Limitaciones de la germinación.....	12
1.4	Tipos de reproducción.....	14
1.5	Importancia a nivel ecológico.....	14
1.6	Estado de la conservación.....	15
1.7	Diversidad de las orquídeas.....	16
1.8	Cultivo in vitro de orquídeas.....	17
2	METODOLOGÍA.....	19
2.1	Recolección de material vegetal y almacenamiento.....	19
2.2	Desinfección.....	19
2.3	Introducción del material a condiciones in vitro.....	20
2.3.1	Germinación de <i>Oncidium pentadactylon</i> y <i>Elleanthus capitatus</i>	20
2.3.2	Prueba de viabilidad de las semillas.....	21
2.4	Ensayos de elongación para plántulas de <i>Oncidium pentadactylon</i>	22
2.5	Ensayo de enraizamiento para plántulas de <i>Oncidium pentadactylon</i>	22
2.6	Análisis de datos.....	23
3	RESULTADOS.....	24
3.1	Germinación de <i>Oncidium pentadactylon</i> a partir de semillas frescas.....	24
3.2	Desarrollo las plántulas de <i>Oncidium pentadactylon</i> hasta fase 5.....	25
3.3	Germinación de <i>Oncidium pentadactylon</i> a partir de cápsulas secas.....	26
3.4	Prueba de viabilidad de las semillas.....	26
3.5	Germinación de <i>Elleanthus capitatus</i> a partir de semillas frescas.....	26
3.6	Desarrollo de las plántulas de <i>Elleanthus capitatus</i> hasta fase 5 del ensayo de cápsulas frescas.....	27
3.7	Germinación <i>Elleanthus capitatus</i> a partir de cápsulas secas.....	27
3.8	Desarrollo de las plántulas de <i>Elleanthus capitatus</i> hasta fase 5 del ensayo de semillas frescas.....	28
3.8.1	Comparación de germinación y desarrollo a fase 5 entre el ensayo de semillas frescas y secas en <i>Elleanthus capitatus</i>	28
3.8.2	Comparación de germinación y desarrollo a fase 5 entre <i>Oncidium pentadactylon</i> y <i>Elleanthus capitatus</i> a partir de semillas frescas.....	29
3.9	Elongación de plántulas de <i>Oncidium pentadactylon</i>	29
3.10	Enraizamiento de plántulas de <i>Oncidium pentadactylon</i>	30
4	DISCUSIÓN.....	30
4.1	Germinación.....	30

4.2	Desarrollo de las plántulas hasta fase 5.....	34
4.3	Elongación.....	35
4.4	Enraizamiento.....	36
5	CONCLUSIONES.....	36
6	RECOMENDACIONES	37
7	REFERENCIAS	38
8	TABLAS.....	43
9	FIGURAS	45
10	ANEXO A.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Medios de cultivo utilizados en la germinación de <i>E. capitatus</i> y la germinación y elongación de <i>O. pentadactylon</i>	43
Tabla 2: Medios de cultivo utilizados en el enraizamiento de <i>O. pentadactylon</i>	43
Tabla 3: Comparación de los resultados de la germinación y avance hasta fase 5 entre semillas frescas y secas de <i>O. pentadactylon</i> y <i>E. capitatus</i>	43
Tabla 4: Resultados de germinación y avance hasta fase 5 entre <i>O. pentadactylon</i> y <i>E. capitatus</i>	44
Tabla 5: Resultados elongación de <i>O. pentadactylon</i>	44
Tabla 6: Resultados de enraizamiento de <i>O. pentadactylon</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fases de las semillas de orquídeas	45
Figura 2: Germinación <i>Oncidium pentadactylon</i>	46
Figura 3: Desarrollo de las plántulas de <i>Oncidium pentadactylon</i> hasta fase 5	47
Figura 4: Resultados prueba de viabilidad.	48
Figura 5: Elongación de <i>Oncidium pentadactylon</i>	48
Figura 6: Enraizamiento <i>Oncidium pentadactylon</i>	49
Figura 7: Germinación de <i>Elleanthus capitatus</i>	50
Figura 8: Avance hasta fase 5 <i>Elleanthus capitatus</i>	51

1 INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae pertenece al grupo de las monocotiledóneas y abarca aproximadamente 800 géneros y 35 000 especies (Castellanos & Torres, 2018). Las orquídeas están distribuidas en todo el mundo, especialmente en las regiones cálido-húmedas y con excepción de desiertos y glaciares (Menchaca, 2011). Existen varias zonas alrededor del globo que han sido identificadas con un porcentaje alto de endemismo de orquídeas, entre estas se encuentran: Ecuador, Colombia, Madagascar, Guayana, Nueva Guinea y la costa de Brasil (Pridgeon et al., 2009). Ecuador, al ser un país megadiverso, posee el 15.8% de especies de orquídeas a nivel mundial, superando a Colombia y Brasil, que poseen el 14% y 10%, respectivamente (MAE, 2015).

1.1 Morfología de las orquídeas

Las orquídeas se caracterizan principalmente por sus flores llamativas, las cuales generalmente son hermafroditas. Se distinguen por tener 3 sépalos y 3 pétalos. Uno de los pétalos siempre posee un color, tamaño o textura diferente a los demás y se lo conoce como labelo (Freuler, 2008). Otra característica morfológica de estas plantas es su fruto o cápsula, las cuales en su interior pueden almacenar hasta millones de semillas, las cuales miden de 0.5 mm a 0.6mm. Las semillas no tienen endospermo, están formadas solo por la testa y el embrión, por lo cual son de pequeño tamaño (Sedano et al., 2015).

Las hojas de las orquídeas son simples con márgenes enteros. Generalmente, se presentan alargadas y angostas. Dependiendo de la especie, las hojas pueden crecer desde la base apical o a lo largo de todo el tallo. Además, en la mayoría de los casos, las hojas no poseen peciolo (Freuler, 2008). Hablando del tallo de las orquídeas, estos pueden ser cilíndricos, cornos o pseudobulbos (Sedano et al., 2015). Estos últimos son tallos fotosintéticos que almacenan nutrientes y agua (Freuler, 2008).

Las raíces, dependiendo de la especie, pueden ser carnosas o tuberosas. Todas poseen una capa blanquecina de células muertas, denominada velamen, el cual tiene la función de absorber la humedad e impedir el desecamiento (Freuler, 2008).

1.2 Hábito de crecimiento

Las orquídeas presentan varios hábitos de crecimiento, pueden ser: epífitas o terrestres. (Castellanos & Torres, 2018). La gran parte de especies presentan hábitos epífitos, es decir, que viven sobre otros árboles sin tener una relación de parasitismo. Se caracterizan por tener hojas más gruesas y pseudobulbos, con el objetivo de retener agua y presentar transpiración limitada. Además, debajo del velamen poseen células que tienen clorofila, lo que les permite realizar fotosíntesis (Sedano et al., 2015). Por otra parte, las orquídeas terrestres presentan hojas más delgadas y en la mayoría de los casos presentan tallos cilíndricos. Además, poseen raíces gruesas que les permiten absorber nutrientes directamente de los suelos rocosos (Menchaca, 2011).

1.3 Limitaciones de la germinación

A pesar de que las cápsulas de orquídeas poseen millones de semillas, solo el 1 o 2% de las semillas germinan de forma natural debido a varias limitaciones que tiene el proceso de germinación (Menchaca, 2011).

Una de las limitaciones es la carencia de endospermo. La mayoría de las semillas de las plantas angiospermas tienen un endospermo que nutre al embrión. El suceso por el cual se genera el embrión es la doble fecundación, el cual es un proceso en el que uno de los dos núcleos del gametofito masculino (polen) se unen con la oófera formando el cigoto. Mientras que el otro núcleo se fusiona con el núcleo secundario del saco embrionario, originando un núcleo triploide que dará lugar al endospermo (Solís, 2012). En el caso de las orquídeas, existen pocos casos en los cuales no se da la doble fecundación, sin embargo, el endospermo no se

desarrolla completamente o se degenera. Varios autores sugieren que esto se debe al pequeño tamaño del embrión o a una ventaja adaptativa para poseer semillas pequeñas, ya que las semillas con tamaños menores pueden dispersarse con más facilidad y se pueden adaptar a varios ecosistemas (Teryokhin & Kamelina, 1969; Benzing, 1981).

Debido a que las semillas no poseen endospermo, necesitan asociarse a un hongo micorrícico, para que éste supla la acción del endospermo. Las micorrizas que se asocian a las orquídeas son de los filos *Basidiomycota* y *Ascomycota*, del género-forma *Rhizoctonia* (Beltrán & Carreón, 2015). La relación simbiótica de estos dos organismos se basa en el intercambio recíproco de carbono (Dearnaley et al., 2017). Los hongos micorrícicos se desarrollan de forma intracelular en las células corticales de las orquídeas, limitándose a las raíces de estas (Beltrán & Carreón, 2015). Estos proveen nutrientes minerales como carbono y nitrógeno, los cuales se obtienen desde aminoácidos y otras sustancias como la celulosa, que se producen o se encuentran naturalmente en el suelo (Batjes, 1996). Además, el micelio del hongo incrementa el volumen de suelo explorado, lo que ayuda a proveer de agua extraída del suelo a la planta hospedera. Adicionalmente, las orquídeas retribuyen al hongo brindándole protección, alojamiento y nutrientes como carbono obtenido desde la fotosíntesis (García & Landy, 2016).

Cabe recalcar que existe una gran especificidad entre la simbiosis de las orquídeas y los hongos micorrícicos. Generalmente, una especie de orquídea no puede asociarse a varios tipos de micorriza. Por tanto, el encuentro específico de las dos especies es complicado (Shefferson et al., 2005). Autores sugieren que esta especificidad se da porque cada hongo micorrícico produce metabolitos diferentes, lo que significa que cada hongo puede desarrollarse en un determinado lugar. Así mismo, las semillas, dependiendo de su morfología, pueden vivir en un lugar específico. Por tanto, ambas especies evolucionaron para formar dicha simbiosis y permitirles el desarrollo mutuo (Benzing & Atwood, 1984; Rasmussen & Rasmussen, 2009).

1.4 Tipos de reproducción

Las orquídeas pueden reproducirse sexual o asexualmente. Por la manera sexual, es esencial la polinización de las flores, la cual se puede dar por medio de viento, insectos o aves (Arditti & Ghani, 2000). Las flores de las orquídeas han adquirido diferentes características para facilitar su polinización, entre ellas están sus vistosas flores y sus dulces aromas. Además, su labelo produce néctar y sirve como soporte para los insectos polinizadores (Menchaca, 2011). Por otra parte, la reproducción asexual o vegetativa no está relacionada con la fecundación. Este tipo de reproducción puede estar mediada por *Keikis*, la cual consiste en la producción de un brote enraizado que nace desde la vara floral de la planta madre (Menchaca, 2011). El nuevo brote será un clon de la planta madre. Por tanto, este tipo de reproducción no contribuye a la variabilidad genética de las orquídeas, sin embargo, es más rápida que la reproducción sexual.

1.5 Importancia a nivel ecológico

Las orquídeas son organismos importantes a nivel ecológico, primero debido a que mantienen interacciones esenciales con otros organismos como hongos, plantas y animales (Newman et al., 2007). Una de las interacciones más importantes es su simbiosis con hongos micorrícicos, los cuales son importantes en el ciclo de nutrientes (Ospina, 1996). Por otra parte, las interacciones con animales producen beneficios para éstos, ya que reciben alimento y protección. Algunos de estos animales son polinizadores como abejas, avispas, mariposas y colibríes, además, de pequeñas ranas y aves (Ospina, 1996).

Adicionalmente, las orquídeas cumplen con la función ecosistémica de regulación hídrica, debido a que las orquídeas junto con otras plantas epífitas forman una barrera en el dosel del bosque, la cual aumenta la precipitación local, almacena y filtra el agua, y evita la erosión del suelo; debido a que estancan la neblina y las nubes bajas (Pypker et al., 2006).

1.6 Estado de la conservación

A nivel mundial, más de 1000 especies de orquídeas están en la Lista Roja Global (IUCN, 2018). Se estima que aproximadamente 100 especies de orquídeas del Ecuador se encuentran en algún tipo de amenaza, 2% de ellas está en peligro de extinción, 11% en peligro y una gran mayoría en estado vulnerable (Jiménez, 2014). Adicionalmente, en Ecuador, según la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) la mayoría de las orquídeas pertenecen al artículo II, lo que significa que se encuentran en estado de vulnerabilidad. La otra parte de las especies de orquídeas están en el artículo I, es decir, se encuentran en peligro de extinción. Cabe recalcar que en Ecuador la recolección de orquídeas se encuentra regulada por el Ministerio del Ambiente, única entidad que remite permisos de investigación y movilización de varias especies de orquídeas (Ministerio del Ambiente, 2015). Adicionalmente, según el código integral penal, se sanciona la recolección de orquídeas de los bosques (Ekos, 2015).

Existen diferentes factores que influyen para que estas especies estén consideradas en peligro, entre ellos están: la destrucción de su hábitat, la sobre colección de individuos y el cambio de temperatura y humedad en el ambiente (Newman et al., 2007). En cuanto a la destrucción de su hábitat, este se ha dado por la pérdida o fragmentación de áreas naturales debido a la expansión de actividades antropogénicas como: ganadería, agricultura e industria petrolera. Adicionalmente, en Ecuador solamente el 13% de las orquídeas están dentro el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, el cual se encarga de monitorear y proteger varias especies vulnerables (Ministerio de Turismo, 2013). Hablando de la sobre colección de individuos, este se da por el interés comercial de las flores de estas plantas. El comercio de orquídeas inició en el siglo XIX al transportar grandes cantidades de plantas de esta familia desde los trópicos a Europa. En la actualidad, a pesar de las regulaciones que existen, se sigue recolectando orquídeas de manera no sostenible, lo que ha provocado una disminución de las

poblaciones de algunas especies (Jiménez, 2014). Por otra parte, el cambio de temperatura y humedad del ambiente que se da debido al cambio climático afecta especialmente a las orquídeas con hábitos epífitos, ya que estas son más susceptibles debido a que dependen de los factores ambientales, recursos biológicos y atmosféricos para obtener nutrientes y agua desde la lluvia y árboles en los cuales habitan (Pypker et al., 2006). Así mismo, los hongos con los que las orquídeas forman simbiosis son sensibles al cambio climático. Por ejemplo, los hongos *Rhizoctonia* spp. no pueden desarrollarse si no se encuentran con las condiciones de temperatura y humedad óptimas para su crecimiento (Ramírez, 2011).

1.7 Diversidad de las orquídeas

Ecuador fue declarado “País de las orquídeas” por el Ministerio de Turismo en 2014 debido a que presenta las características geográficas y biofísicas necesarias para el crecimiento de esta familia de plantas (Endara et al., 2010). Posee 4 de las 5 subfamilias de orquídeas existentes a nivel global, las cuales se desarrollan en ecosistemas templados, tropicales y subtropicales. Hay un total de 4032 especies de las cuales 1724 son endémicas y aproximadamente 400 están en proceso de estudio y descripción (Ministerio de Turismo, 2014). El mayor número de orquídeas endémicas habitan en un rango altitudinal desde los 1500 hasta los 2500 msnm. Dentro de las orquídeas que habitan en Ecuador se encuentran en mayor porcentaje las subtribus Pleurothallidinae con un 65%, seguida de Laeliinae con un 12% y seguido se Oncidiinae con un 9% (Endara et al., 2010).

Oncidium pentadactylon está dentro de la subtribu Oncidiinae, es una orquídea epífita que crece a más de 2000 msnm. Es nativa de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. También se la denomina *Oncidium millei*. En Ecuador se encuentra a lo largo de la Sierra ecuatoriana y en el norte de la Amazonía. Presenta un pseudobulbo definido carnoso con hojas alargadas y carnosas. Sus inflorescencias son ramificadas con flores múltiples. Poseen flores

pequeñas de color amarillo y manchas pardas. Dentro de la flor, su labelo es la parte más prominente, caracterizado por la posesión de callosidades (Cueva & Moya, 2015).

Por otro lado, *Elleanthus capitatus* está dentro de la subtribu Elleanthinae, es una orquídea terrestre nativa de América Central y del Sur. También se la denomina *Bletitia capitata*, *Evelyna capitata*, *Evelyna casapensis* y *Elleanthus casapensis*. Igual que *O. pentadactylon* se encuentra en la Sierra y Amazonia ecuatoriana. Se caracteriza por tener raíces largas y tallos robustos; estos últimos cubiertos de vainas de hojas. Su inflorescencia es terminal racemosa, con varias flores de color morado cubiertas de líquido mucilaginoso. Se encuentra en alturas entre 2000 a 3800 msnm, alcanzando su máximo desarrollo en los Andes de Colombia, Ecuador y Perú (Cueva & Moya, 2015).

1.8 Cultivo *in vitro* de orquídeas

El cultivo *in vitro* de orquídeas consiste en sembrar el material vegetal en un medio de cultivo que permita la germinación de las semillas bajo condiciones controladas, asépticas incluyendo o no hongos micorrícicos (Mayo et al., 2010). Esta técnica permite sobrellevar las limitaciones de germinación de las orquídeas, ayudando así a la propagación de esta especie tan importante a nivel ecológico y que se encuentra en vulnerabilidad (Freuler, 2008). Cuando se incluye hongos micorrícicos, se denomina cultivo *in vitro* simbiótico. Esta técnica consiste en que el hongo sembrado coloniza la semilla y empieza la relación simbiótica como sucedería en la naturaleza. Se ha reportado que con esta técnica se logra la germinación y desarrollo de plántulas, sin embargo, posee la desventaja de que el aislamiento de la micorriza específica de cada especie es complicado (Rasmussen & Rasmussen, 2009). Por otro lado, cuando no se incluye el hongo micorrícico se denomina cultivo *in vitro* asimbiótico. Esta técnica empezó en 1992 en Estados Unidos con Lewis Knudson, quien desarrolló un medio de cultivo con los nutrientes necesarios para que germinen las semillas de orquídeas sin estar en simbiosis con los hongos micorrícicos (McKendrick, 2000). Cabe recalcar que cada especie de orquídea

presenta requerimientos nutricionales para su germinación y desarrollo dependiendo de si son epífitas o terrestres (McKendrick, 2000). Un medio de cultivo estándar tiene sales minerales, una fuente de carbono y un agente gelificante. Adicionalmente, pueden poseer vitaminas, aminoácidos, fitohormonas y/o carbón activado. Los medios sencillos más usados para la germinación de orquídeas son Knudson C y Murashige y Skoog; mientras que para el desarrollo se recomienda usar medios más concentrados o con más componentes, como vitaminas, aminoácidos y fitohormonas (Cevallos, 2016).

En cuanto a las fitohormonas u hormonas vegetales, estas actúan como mensajeros químicos afectando a la regulación celular en procesos dentro del desarrollo de la planta. Dependiendo de la concentración en la que se utilice, estas pueden actuar como estimulantes o como inhibidores en varios procesos. El tipo y concentraciones de las fitohormonas dependen del objetivo del estudio (Cevallos, 2016). Una de las fitohormonas más utilizadas son las giberelinas denominadas por las siglas GA₃, estas influyen en varios procesos del desarrollo de la planta, como la estimulación del crecimiento del embrión, la germinación de semillas y elongación del tallo. Otras hormonas comúnmente usadas son las auxinas como el ácido indol butírico, el cual interviene en el proceso de enraizamiento (Cevallos, 2016).

Por todo lo mencionado anteriormente, en este trabajo se realizó el cultivo *in vitro* de la orquídea epífita *Oncidium pentadactylon* y la orquídea terrestre *Elleanthus capitatus*. Se estudió la germinación *in vitro* asimbiótica de ambas especies, identificando el mejor tratamiento para este proceso. Además, se analizó la elongación y enraizamiento de *O. pentadactylon*, determinando los mejores tratamientos para los mencionados procesos.

2 METODOLOGÍA

2.1 Recolección de material vegetal y almacenamiento

Se recolectaron 5 cápsulas de *Oncidium pentadactylon* en la Reserva Geobotánica Pulumahua en marzo del 2019. Se identificó la especie por su hábito epífita, su inflorescencia ramificada y sus múltiples flores de color amarillo con manchas pardas, con la ayuda de un experto en orquídeas de dicha reserva. Todas las cápsulas recolectadas fueron de la misma planta. Además, se recolectaron 8 cápsulas de *Elleanthus capitatus* en agosto del 2019 en la misma reserva. Con ayuda de expertos se identificó a la especie por su hábito terrestre, su inflorescencia terminal racimosa con sus flores moradas. Las dos recolecciones están bajo la autorización científica N°003-2019-IC-FLO-DPAPCH-MA del Ministerio del Ambiente. Todas las cápsulas fueron almacenadas a temperatura ambiente.

Se realizó un ensayo con cápsulas frescas y otro con semillas secas para cada una de las especies: *O. pentadactylon* y *E. capitatus*. Se usó como guía la metodología de Valencia (2019). Para el ensayo de cápsulas frescas, las cápsulas de ambas especies se guardaron en fundas de papel hasta su uso. En cambio, para el ensayo de semillas secas se cortaron las cápsulas longitudinalmente y se transfirieron las semillas con una cucharilla estéril, a un sobre de papel filtro. Éste sobre se colocó en un frasco hermético que contenía sílica gel por 15 días. Luego de este tiempo se almacenó el sobre en un tubo Falcon™ a temperatura ambiente.

2.2 Desinfección

Las cápsulas de *O. pentadactylon* y *E. capitatus* se desinfectaron dentro de una cámara de flujo laminar. Para el ensayo de las semillas frescas se colocó a las cápsulas dentro de un vaso de precipitación, se les sumergió en etanol al 75% por 5 minutos. Luego se desechó el alcohol y se sumergieron a las cápsulas en hipoclorito de sodio a 2.5% con 4 gotas de Tween20 por 15 minutos. Finalmente, se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril (Valencia, 2019). Para el ensayo de las semillas secas, se colocó el sobre de papel filtro, con las semillas dentro,

en un vaso de precipitación y se siguió el mismo protocolo de desinfección dado para el protocolo de las semillas frescas.

2.3 Introducción del material a condiciones *in vitro*

Para las dos especies, en el ensayo de las semillas frescas, se realizó un corte longitudinal de las cápsulas desinfectadas con un bisturí, dentro de una cámara de flujo laminar. Mientras que, para el ensayo de semillas secas, se cortó el sobre que contenía las semillas con una tijera en condiciones estériles. Para cada uno de los ensayos, se distribuyeron de forma equitativa las semillas en todos los tratamientos, al agregar en cada caja Petri las que alcanzaran en una cucharilla de laboratorio estéril. Se pudo estimar aproximadamente 200 semillas en cada caja Petri, dicha estimación se obtuvo en base al número promedio que se observaron bajo el estereomicroscopio.

2.3.1 Germinación de *Oncidium pentadactylon* y *Elleanthus capitatus*

Las semillas, tanto secas como frescas, de las dos especies fueron sembradas en 10 diferentes tratamientos que combinan 3 variables: el medio de cultivo, el carbón activado y la hormona GA₃. Los medios de cultivo utilizados fueron Murashige y Skoog modificado (20g/L de sacarosa), Knudson C modificado (20g/L de sacarosa) y Phytamax™. Se escogieron estos medios para el análisis debido a que otros estudios han demostrado que son eficientes para la germinación de varios tipos de orquídeas (Rahman et al., 2005; Cueva & Moya, 2015; Escobar et al., 2008; Setiti & Hariyanto, 2019).

El GA₃ o ácido giberélico y CA o carbón activado se eligieron, ya que, se reporta que favorecen la germinación y desarrollo de orquídeas en general (Srivastava, 2002; Rey & Llópiz, 2007). De esta forma, se combinaron los medios de cultivo con las dos variables mencionadas, dando como resultado los medios que se encuentran en la Tabla 1.

Se realizó una siembra en 4 cajas Petri de plástico, de 6 cm de diámetro, por cada tratamiento. Las semillas sembradas en las cajas Petri se ubicaron en un cuarto de cultivo con condiciones controladas de temperatura a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ y con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad (Valencia, 2019). Se realizaron subcultivos cada 3 meses y se tomaron datos cualitativos y cuantitativos cada tres semanas del desarrollo de las semillas/plántulas bajo un estereomicroscopio. Para esto se consideraron seis fases de desarrollo: Fase 0: semillas con embrión no germinado. Fase 1: embrión con tamaño mayor y con coloración verde. Fase 2: ruptura inicial de la testa. Fase 3: formación de protocormos (embrión ensanchado varias veces su volumen) con rizoides. Fase 4: formación de protocormos con brote inicial. Fase 5: elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior (Seaton & Ramsay, 2009). (Figura 1). En cuanto a los datos cualitativos se observó el desarrollo de todas las fases en las dos especies en cada uno de los tratamientos. Los datos cuantitativos se obtuvieron al realizar el conteo de las semillas germinadas (fase 1 o posteriores fases) y de las plántulas en fase 5 en cinco campos diferentes dentro de cada caja Petri. Se estimó el porcentaje de semillas germinadas a los 3 meses en cada tratamiento, tomando en cuenta el número de semillas germinadas en las 4 réplicas (cajas Petri). A dicho número se lo dividió por el total de semillas sembradas en cada tratamiento (200 semillas por caja Petri). Por otro lado, el porcentaje de plántulas que llegaron a fase 5 en cada tratamiento a los 6 meses se estimó en relación el número de semillas que habían germinado en cada tratamiento, no en relación con el número total de semillas sembradas.

2.3.2 Prueba de viabilidad de las semillas

Debido a que las semillas secas de *O. pentadactylon* no germinaron, se realizó un ensayo para determinar la viabilidad. Para este ensayo se usaron semillas secas de *O. pentadactylon* y *E. capitatus*. Además, se usaron semillas de *E. capitatus* frescas.

Se utilizaron aproximadamente 100 semillas secas de *O. pentadactylon* que ya estaban sembradas en los diferentes tratamientos. Además, se utilizaron aproximadamente 100 semillas de *E. capitatus* que provenían de las cápsulas frescas y aproximadamente 100 semillas secas.

A cada grupo de semillas se las ubicó en una caja Petri estéril y se las sumergió en una solución de tetrazolio al 1% con 6.5 de pH durante 24 horas de oscuridad, como lo reportan Salazar & Gélvez (2015). Posteriormente, se observaron las semillas en la caja Petri con el estereomicroscopio y se contaron las semillas que estaban viables, considerando que estas se tiñen de color rojo a comparación de las otras semillas no viables que permanecen de color blanco (Salazar & Gélvez, 2015).

2.4 Ensayos de elongación para plántulas de *Oncidium pentadactylon*

Una vez que las semillas alcanzaron la fase 5 de desarrollo a los 6 meses, se seleccionaron 300 plántulas para los ensayos de elongación. Para estos ensayos se probaron los mismos tratamientos empleados en la etapa de germinación. Se transfirieron a las plántulas elegidas a frascos de vidrio de 6 cm de diámetro con 9 cm de alto. Las plántulas se cultivaron con las mismas condiciones detalladas para la germinación. Se estimó la tasa de elongación mediante un registro del crecimiento de las plántulas, por un periodo de 3 meses, mediante la toma de fotografías de las plántulas con una regla escalada a su lado. Usando el programa ImageJ se determinó el tamaño de las plántulas, siendo este considerado la distancia entre la base de la hoja más larga hasta la punta de esta (Valencia, 2019).

2.5 Ensayo de enraizamiento para plántulas de *Oncidium pentadactylon*

Debido a que las plántulas de *Oncidium pentadactylon* no presentaron raíces lo suficientemente desarrolladas para pasar a la etapa de aclimatación, se realizó un ensayo de enraizamiento. Para el ensayo de enraizamiento se trabajó con dos medios de la etapa de elongación con los que se obtuvieron los mejores resultados. Estos medios de cultivo fueron

suplementados con la hormona ácido indol butírico (IBA) en tres distintas concentraciones. Se escogió esta hormona debido a que se reporta que ayuda al crecimiento de raíces (Cevallos, 2016). De esta forma se trabajó con 10 tratamientos indicados en la Tabla 2.

Las plántulas obtenidas en el ensayo de elongación, se subcultivaron en cada uno de los tratamientos de enraizamiento independientemente de su procedencia en el ensayo de elongación. Para la toma de datos se extrajeron las plántulas de los medios dentro de la cámara de flujo laminar, y se las colocaron en cajas Petri estériles. Se tomaron fotografías de las plántulas que se encontraban en las cajas Petri con una regla escalada a su lado. Con el uso del programa ImageJ se determinó el tamaño de la raíz (Valencia, 2019). Adicionalmente, se contó el número de raíces. El tamaño de la raíz se estableció como la distancia entre la base de la raíz más larga y la punta de esta.

2.6 Análisis de datos

Los datos de germinación, elongación y enraizamiento se recopilaron en tablas en MS Excel y se analizaron con ayuda del software Minitab 18 (Statistical Software Minitab, 2019). Las variables de respuesta: porcentaje de semillas germinadas en 3 meses y porcentaje de plántulas en fase 5 en 6 meses se analizaron para las semillas frescas y secas de *Elleanthus capitatus* y *Oncidium pentadactylon*. Puesto que los datos obtenidos fueron normales, para analizar las dos variables se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple Tukey con 95% de confiabilidad, con el fin de encontrar el tratamiento o los tratamientos más significativos. El análisis se realizó con los datos brutos obtenidos del estudio, después se los transformó a porcentajes.

Adicionalmente, se comparó la germinación para las dos variables en *Elleanthus capitatus* y *Oncidium pentadactylon*, con ayuda de una Prueba “t” de Student con 95% de confiabilidad. Por último, se compararon los resultados de los ensayos de semillas secas y frescas en *Elleanthus capitatus* con ayuda de una Prueba “t” de Student con 95% de

confiabilidad. No se realizó esto con *Oncidium pentadactylon* debido a que no se obtuvo germinación con las semillas secas.

También se analizó la elongación y el enraizamiento de *Oncidium pentadactylon*. Se estudió el crecimiento de la plántula y raíz, respectivamente, tomando en cuenta la diferencia del tamaño de la primera medición con la última. Con respecto al ensayo de enraizamiento se analizaron las variables: tamaño de la raíz y número de raíces en 3 meses. Para los ensayos de elongación y enraizamiento se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple Tukey con 95% de confiabilidad, con el fin de encontrar el tratamiento o los tratamientos más significativos para la elongación y enraizamiento para *Oncidium pentadactylon*.

3 RESULTADOS

3.1 Germinación de *Oncidium pentadactylon* a partir de semillas frescas

A las 2 semanas de siembra en Phy+GA₃(0.2mg/L) se observaron las primeras semillas germinadas de *O. pentadactylon*. A los tres meses de cultivo *in vitro* se analizaron los datos de germinación y visualmente se identificó que, con el mencionado tratamiento, la mayor cantidad de semillas estaban en la fase 1, o ya habían pasado la misma. (Figura 2A y 2B). De igual manera se evidenció que en Phy+GA₃(0.2mg/L) existe la tasa de germinación más alta (81.6%) a comparación de los otros tratamientos. (Figura 2A). Mientras que las semillas que fueron cultivadas en MS+GA₃(0.2mg/L) no germinaron en seis meses.

La prueba ANOVA con 95% confiabilidad sustentó que existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados ($p < 0.05$). Esto quiere decir que existen uno o más tratamientos que son los más eficientes, debido a que en ellos se lograron los mejores resultados. La prueba de comparación múltiple Tukey con un 95% de confiabilidad informó que Phy+GA₃(0.2mg/L) es estadísticamente diferente del resto de tratamientos utilizados

($p > 0.05$). Por tanto, se tiene el sustento para decir que este tratamiento es el mejor para inducir la germinación en esta especie.

Después de Phy+GA₃(0.2mg/L), los tratamientos en los que se obtuvo un porcentaje de germinación más altos fueron MS+CA(2 mg/L), MS+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) y Phy. En los cuales se observó una tasa de germinación de 65.1%, 62.5% y 61.8%, respectivamente (Figura 2A y 2B). Según la prueba de comparación múltiple Tukey no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero sí con respecto a los demás tratamientos ($p > 0.05$). Por tanto, se considera que: MS+CA(2 mg/L), MS+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) y Phy fueron los medios en los que se obtuvo los segundos mejores resultados en cuanto a la germinación de semillas en esta especie.

3.2 Desarrollo las plántulas de *Oncidium pentadactylon* hasta fase 5

Se analizó el porcentaje de las plántulas que llegaron a la fase 5 de desarrollo al cabo de 6 meses de cultivo *in vitro*. El análisis de los datos sustentó que existen diferencias significativas entre los tratamientos probados ($p < 0.05$ para ANOVA). Para comparar todos los tratamientos e identificar en cuál/es se obtienen mejores resultados se realizó una prueba de comparación múltiple Tukey.

Al comparar los resultados de cada tratamiento, se observó que los mejores resultados se obtuvieron con Phy+GA₃(0.2mg/L), Phy, MS+CA(2g/L) y KC. Con estos medios se logró el 17.1%, 16.75%, 14.5%, 13.5%, respectivamente, de plántulas que llegaron a fase 5 (Figura 3A y 3B). Los cuatro tratamientos mencionados no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero si con respecto a los demás tratamientos ($p > 0.05$ para la prueba de Tukey).

Cabe recalcar que en MS y KC+GA₃(0.2mg/L) se evidenciaron semillas germinadas a los 3 meses de cultivo, pero estas no llegaron a fase 5 al cumplir los 6 meses de cultivo *in vitro*.

3.3 Germinación de *Oncidium pentadactylon* a partir de cápsulas secas

No se obtuvo germinación en los dos ensayos que se realizaron con cápsulas secas en ninguno de los tratamientos en 6 meses de cultivo *in vitro*. Las semillas se mantuvieron en fase 0 durante todo ese tiempo.

3.4 Prueba de viabilidad de las semillas

Las semillas secas de *O. pentadactylon* obtuvieron un porcentaje de viabilidad del 0%, es decir, que ninguna de las semillas se observó de color rojo bajo el microscopio. Las semillas frescas de *E. capitatus* tuvieron un porcentaje de viabilidad de 93%, mientras que las semillas secas de la misma especie lograron un porcentaje de viabilidad de 64%. (Figura 4).

3.5 Germinación de *Elleanthus capitatus* a partir de semillas frescas

En el caso de *E. capitatus*, las primeras semillas germinadas se observaron a las 2 semanas en KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L). A los tres meses se analizaron los datos de germinación. En KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) se observó la tasa de germinación más alta (58.7%) en comparación con los otros tratamientos. (Figura 7A y 7B). En MS+GA₃(0.2mg/L) no se obtuvo germinación hasta los tres meses de cultivo *in vitro*.

El análisis de los datos sostuvo que existen diferencias significativas entre los tratamientos probados ($p < 0.05$ para ANOVA). La prueba de comparación múltiple Tukey con un 95% de confiabilidad mantuvo que KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás tratamientos ($p > 0.05$). Por tanto, se tiene el soporte para decir que este tratamiento es el mejor para inducir la germinación en esta especie.

3.6 Desarrollo de las plántulas de *Elleanthus capitatus* hasta fase 5 del ensayo de cápsulas frescas

En cuanto porcentaje de plántulas en fase 5 de desarrollo, a los 6 meses se analizaron los datos y se observó que en KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) existe un mayor número de plántulas en esta fase. (Figura 8B). Además, en este tratamiento se obtuvo el porcentaje más alto de plántulas en fase 5 (41.7%) en comparación con los otros tratamientos. (Figura 8A). Cabe recalcar que en MS y MS+CA(2g/L) se evidenció la germinación de las semillas a los tres meses, pero no se logró observar plántulas en fase 5 a los seis meses de cultivo *in vitro*.

El análisis de los datos sustentó que existen diferencias significativas entre los tratamientos probados ($p < 0.05$ para ANOVA). La prueba de comparación múltiple Tukey con 95% de confiabilidad, indicó que KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás tratamientos ($p > 0.05$). Por tanto, se tiene el apoyo para decir que este tratamiento es el mejor para inducir el desarrollo de las plántulas hasta fase 5 en esta especie.

3.7 Germinación *Elleanthus capitatus* a partir de cápsulas secas

En el caso de las semillas secas de *E. capitatus*, las primeras semillas germinadas se observaron a las 3 semanas en KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L). A los 3 meses de cultivo, se analizaron los datos y se encontró que dicho tratamiento poseía más semillas que estaban o ya habían pasado fase 1 de desarrollo (Figura 7B). En KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) se obtuvo la tasa de germinación más alta (25%) en comparación con los otros tratamientos. (Figura 7A). De igual forma que en el ensayo con semillas frescas, no hubo germinación en el medio MS+GA₃(0.2mg/L) después de tres meses del cultivo *in vitro*.

El análisis de los datos sustentó que existen diferencias significativas entre los tratamientos probados ($p < 0.05$ para ANOVA). La prueba de comparación múltiple Tukey con un 95% de confiabilidad sostuvo que KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) presenta diferencias

estadísticamente significativas con los demás tratamientos ($p > 0.05$). Por tanto, se puede decir que este tratamiento es el mejor para lograr la germinación de esta especie.

3.8 Desarrollo de las plántulas de *Elleanthus capitatus* hasta fase 5 del ensayo de semillas frescas

Al cabo de 6 meses de cultivo *in vitro*, se analizó el porcentaje de plántulas que alcanzaron la fase 5 de desarrollo. Se encontró que igual que en el ensayo de semillas frescas de esta especie los mejores resultados se obtuvieron con en $KC+GA_3(0.2mg/L)+CA(2g/L)$, ya que en este tratamiento se observó el porcentaje de plántulas en fase 5 más alto (40.1%) comprado con otros medios. (Figura 8A y 8B). Igualmente, en los medios MS y $MS+CA(2g/L)$ se obtuvo la germinación de semillas a los tres meses, pero no se observó plántulas en fase 5 a los seis meses de cultivo *in vitro*.

Asimismo, la prueba de comparación múltiple Tukey con 95% de confiabilidad, sustentó que $KC+GA_3(0.2mg/L)+CA(2g/L)$ presentó diferencias estadísticamente significativas con los demás tratamientos ($p > 0.05$). Por tanto, se puede decir que este tratamiento fue el mejor para inducir el desarrollo de las plántulas hasta fase 5 de esta especie.

3.8.1 Comparación de germinación y desarrollo a fase 5 entre el ensayo de semillas frescas y secas en *Elleanthus capitatus*

A los tres meses del cultivo se observó que había una mayor tasa de germinación en los ensayos realizados con semillas frescas (26%), mientras que en los ensayos realizados con semillas secas hubo un menor porcentaje de germinación (11%). (Tabla 3). La prueba “t” de Student soportó que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de germinación entre ambos ensayos ($P < 0.05$).

Por otra parte, a los 6 meses se compararon los resultados de desarrollo de las plántulas germinadas provenientes de semillas frescas y secas. En el primer ensayo un 50% de las plántulas germinadas llegaron a fase 5 de desarrollo, mientras que en el ensayo de las semillas

secas fue un 44% de plántulas. (Tabla 3). Se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de plántulas en fase 5 de desarrollo entre los dos ensayos ($P>0.05$ para prueba “t” de Student).

3.8.2 Comparación de germinación y desarrollo a fase 5 entre *Oncidium pentadactylon* y *Elleanthus capitatus* a partir de semillas frescas

A los tres meses del cultivo se analizaron los resultados obtenidos en la tasa de germinación de las dos especies en el ensayo de las semillas frescas y se observó que *O. pentadactylon* tuvo un porcentaje mayor de semillas germinadas (43%) en comparación de *Elleanthus capitatus* (26%). (Tabla 4). La prueba “t” de Student sostuvo que hay diferencias estadísticamente significativas entre la tasa de germinación de las dos especies ($P<0.05$).

Por otro lado, a los 6 meses se determinó que entre ambas especies no había diferencias en cuanto al porcentaje de plántulas que llegaron a fase 5 de desarrollo. En *O. pentadactylon* se logró el 54% y en *E. capitatus* el 44%. (Tabla 4). Se vio que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de semillas que llegaron a fase 5 entre estas dos especies ($P>0.05$ para prueba “t” de Student).

3.9 Elongación de plántulas de *Oncidium pentadactylon*

Después de los tres meses del ensayo se midió el crecimiento de las plántulas de *O. pentadactylon* en los diferentes tratamientos. El tratamiento en el que hubo mayor crecimiento fue Phy ($16\text{mm}\pm 0.37$). Después de este, los tratamientos KC, $\text{KC}+\text{GA}_3(0.2\text{mg/L})$ y $\text{KC}+\text{GA}_3(0.2\text{mg/L})+\text{CA}(2\text{g/L})$ se alcanzaron los segundos mejores resultados, ya que las plántulas en dichos medios crecieron $15.13\text{mm}\pm 0.26$, $15\text{mm}\pm 1.36$ y $15.25\text{mm}\pm 0.34$ respectivamente en el mismo periodo de tiempo. (Tabla 5 y Figura 5).

La prueba de comparación múltiple Tukey sustentó que Phy es estadísticamente diferente en comparación con los otros medios ($p<0.05$). Por tanto, se puede decir que este medio es el mejor para lograr una elongación mayor en esta especie.

Además, prueba de comparación múltiple Tukey sustentó que KC, KC+GA₃(0.2mg/L) y KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero sí entre los demás medios ($p < 0.05$).

3.10 Enraizamiento de plántulas de *Oncidium pentadactylon*

Al finalizar el ensayo (3 meses) se analizó el crecimiento de la raíz y el número de raíces de *O. pentadactylon*. En Phy+IBA(1.5 mg/L) se obtuvo en promedio 5 ± 1.09 raíces por plántula, las cuales crecieron $15.00\text{mm} \pm 0.93$. Estos fueron los mejores resultados en comparación con los otros tratamientos. Cabe mencionar que las plántulas que estuvieron en los tratamientos control (Phy y KC) no presentaron crecimiento en el periodo de duración del ensayo (3 meses). (Tabla 6 y Figura 6).

La prueba de comparación múltiple Tukey con 95% de confiabilidad, apoyó en que Phy+IBA(1.5 mg/L) es estadísticamente diferente con respecto a otros tratamientos ($p < 0.05$). Por tanto, se puede decir que este medio es el mejor para lograr un enraizamiento mayor en esta especie.

4 DISCUSIÓN

4.1 Germinación

El cultivo *in vitro* de orquídeas presenta una gran ventaja comparado al cultivo en condiciones naturales, ya que es posible obtener una mayor germinación. Según, Luan, et al (2006) en condiciones naturales germinan solo el 2 o 3% de las semillas que están dentro de una cápsula, no obstante, en este trabajo se obtuvo un 43% de germinación en condiciones *in vitro* con *O. pentadactylon*, una orquídea epífita, y 26% con *E. capitatus*, una orquídea terrestre. Otros estudios también han reportado que en condiciones *in vitro* se logran altos porcentajes de germinación (Valencia, 2019; Aucapiña & López, 2016; McKendrick, 2000).

Dentro del cultivo *in vitro* existen diversos medios de cultivo que pueden estar suplementados con varias sustancias adicionales como: hormonas de crecimiento, carbón activado, vitaminas, entre otros. Estas mezclas se prueban para lograr resultados más eficientes tanto en la germinación como en el posterior desarrollo de la planta (Rahman et al., 2005). El medio de cultivo en el que se obtenga los mejores resultados será el que se adapte mejor a las necesidades nutricionales específicas de cada especie (Castellanos & Torres, 2018). Por esta razón, para identificar cuál es el medio de cultivo óptimo para la germinación, se probaron 10 tratamientos diferentes.

En el caso de *O. pentadactylon* el tratamiento en el que se obtuvo los mejores resultados en germinación fue Phy+GA₃(0.2mg/L); mientras que para *E. capitatus*, el mejor tratamiento fue KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L). (Figura 2A, 2B y Figura 7A, 7B). Ambos tratamientos poseen la fitohormona GA₃ y carbón activado. Se reporta en la literatura que la hormona GA₃ favorece a la activación del embrión y la producción de hidrolasas que están involucradas en la ruptura de la testa (Cevallos, 2016). Aucapiña y López (2016) reportan que al usar dicha hormona en una concentración de 0.1mg/L lograron un porcentaje de germinación de 96% en la orquídea *Cymbidium* sp.

Además, Phy+GA₃(0.2mg/L) y KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) poseen carbón activado. Se ha reportado que el carbón activado se utiliza para impulsar la germinación de orquídeas epífitas más que terrestres debido a que adsorbe compuestos fenólicos y carboxílicos que producen las semillas de las orquídeas epífitas en sus primeras etapas (Nadarajan et al., 2011).

El contraste entre ambos tratamientos es el diferente medio de cultivo: Phy y KC. Ambos poseen micro, macronutrientes y sacarosa. Sin embargo, el medio Phy, además, posee otros componentes como vitaminas, peptonas, mioinositol y carbón activado. (ANEXO A). Las vitaminas sirven como catalizadores en diversos procesos metabólicos ayudando así al crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Abrahamian & Kantharajah, 2011). Por otro

lado, el mioinositol desempeña un papel en la división celular aumentando así el desarrollo de todas las partes de este organismo (Singh et al., 2018). Por último, las peptonas son utilizadas como fuentes de carbono y nitrógeno, los cuales tienen un efecto positivo en la germinación de las semillas de orquídeas debido a que nutren al embrión para que empiece el proceso de imbibición (Shekarriz et al., 2014).

Los resultados obtenidos coinciden con otros estudios que reportan buenos resultados con el medio Phy en orquídeas epífitas. Por ejemplo, Hossain (2008) reporta que con este medio de cultivo logró porcentajes altos de germinación (70%) en la orquídea epífita *Epidendrum ibaguense*. Musharof, et al., (2009) también reportan altos porcentajes de germinación (90%) en la orquídea epífita *Cymbidium aloifolium* utilizando dicho medio.

Por otro lado, el medio KC se caracteriza por poseer una gran concentración de amonio en comparación con los otros dos medios (ANEXO A). Las orquídeas terrestres como *E. capitatus* necesitan de gran cantidad de nitrógeno para germinar y desarrollarse (Kauth et al., 2007), por tanto, es posible que por eso los resultados de esta especie hayan sido mayores en este medio.

Cabe recalcar que en *E. capitatus* se obtuvo un porcentaje menor de germinación comparado con *O. pentadactylon*. (Tabla 4). Estos porcentajes son coherentes con lo descrito por la literatura. Valencia (2019) reportó un porcentaje de germinación menor en la orquídea terrestre *P. punchela* (16.41%) en comparación con la orquídea epífita *E. jaimsonis* (65%). Además, Luan et al., (2006) obtuvo que el porcentaje de germinación de la orquídea epífita *Esmeralda clarkei* fue mayor en comparación con la orquídea terrestre *Phaius tankervilleae*. Los porcentajes difieren entre orquídeas epífitas y terrestres debido a sus diferentes requerimientos nutricionales (Hicks & Lynn, 2007). Es posible que este estudio se hayan utilizado variables que favorecen más a la germinación de orquídeas epífitas como: el carbón activado y el medio Phy.

En las dos especies de estudio no se obtuvo germinación en el tratamiento MS+GA₃(0.2mg/L) es posible que esto haya dado porque las orquídeas en general no requieren de una concentración muy alta de nutrientes minerales (Bacuilima, 2015). El medio Murashige & Skoog posee el doble de la concentración de minerales a comparación de los otros dos medios (ANEXO A). Por tanto, es posible que la alta cantidad de nutrientes haya inhibido el desarrollo. Varios estudios reportan que han obtenido buenos resultados con el medio $\frac{1}{2}$ MS, el cual posee la mitad de la concentración de Murashige & Skoog (Akatar et al., 2008; Escobar et al., 2008).

Otro factor que se analizó fue la germinación de las semillas frescas con respecto a las semillas secas, puesto que Valencia (2019) y Cueva & Moya (2015) reportan diferencias en la tasa de germinación dependiendo del almacenamiento de las semillas. En *O. pentadactylon*, la germinación solo fue posible en el ensayo de las semillas frescas, en cambio en *E. capitatus*, la germinación se obtuvo tanto en el ensayo de las semillas frescas como en las semillas secas. (Tabla 3).

Los resultados anteriores concuerdan con los que se obtuvieron en la prueba de viabilidad con tetrazolio. Esta prueba se basa en que las semillas viables tendrán deshidrogenasas, las cuales al liberar iones hidrógeno reducen al tetrazolio en formazán, el cual tiene un color rojo (Salazar & Gélvez, 2015). Por tanto, las semillas viables se verán rojas, en comparación con las no viables, que se verán blancas (Salazar & Gélvez, 2015).

Las semillas de *O. pentadactylon* tuvieron un porcentaje de viabilidad de 0%. (Figura 4). Durante el secado, las semillas pierden humedad y oxígeno, en el caso de *O. pentadactylon*, la pérdida de estos ocasiona que las células del embrión mueran (Cueva & Moya, 2015). Esto es debido a que la falta de oxígeno produce alteraciones fisiológicas irreversibles causando la muerte celular del tejido (Cabrera, 2008).

En cambio, para *E. capitatus*, las semillas provenientes de la cápsula fresca obtuvieron una mayor viabilidad (93%) comparada con las semillas secas (64%). (Figura 4). La pérdida de humedad y oxígeno, en esta especie, ocasionó la pérdida de viabilidad y además desencadenó un estado de dormancia que produce un retardo en la germinación (Taiz & Zeiger, 1998). Concordante a eso, la germinación de las semillas secas se dio en menor porcentaje en comparación con las semillas frescas. (Tabla 3). Estos resultados coinciden con lo reportado por Valencia (2019), ya que en dicho estudio también se observó que el porcentaje de germinación fue más bajo en el ensayo de semillas secas de *Epidendrum jamiesonis*, en comparación con el de las semillas secas. También, Cueva & Moya (2015) reportan que para orquídeas de los géneros *Oncidium*, *Elleanthus*, *Epidendrum* y *Odontoglossum* se observa que los porcentajes de germinación disminuyen cuando se trabaja con semillas que hayan pasado por un proceso de secado.

4.2 Desarrollo de las plántulas hasta fase 5

La fase 5 de desarrollo se caracteriza por la formación de la primera hoja o raíz. Se considera a esta fase como la última dentro del desarrollo de las orquídeas, ya que es la formación de la plántula como tal (Seaton & Ramsay, 2009). Para *O. pentadactylon* los tratamientos en los que se obtuvieron los mejores resultados fueron: Phy+GA₃(0.2mg/L), Phy, MS+CA(2g/L) y KC. (Figura 3). Mientras que para *E. capitatus* tanto para las semillas secas como para las frescas el tratamiento fue KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L). (Figura 8A).

Según los resultados obtenidos en *O. pentadactylon* para el avance hasta fase 5 de desarrollo no hay diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro diferentes tratamientos. Sin embargo, al observar las fotografías (Figura 3) se puede sugerir que Phy+GA₃(0.2mg/L) es el mejor debido a que posee más plántulas en comparación con los otros tratamientos. Además, cabe recalcar que Escobar et al., (2008) reportan que para la especie *Oncidium stramineum* el medio que obtuvo los mejores resultados en cuanto al porcentaje de

plántulas en fase 5 contenía carbón activado y la hormona GA₃, al igual que Phy+GA₃(0.2mg/L).

Por otro lado, en *E. capitatus* sí se observa una tendencia en la que KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) es el que tenga los mejores resultados en germinación y desarrollo hasta fase 5. Como ya se mencionó antes el medio KC es indicado para orquídeas terrestres debido a que suple su necesidad de altas concentraciones de nitrógeno (Kauth et al., 2007).

Se observa que los tratamientos: Phy+GA₃(0.2mg/L), Phy, MS+CA(2g/L) y KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) poseen carbón activado. Pacek et al., (2010) reportan que para orquídeas epífitas tanto terrestres se obtiene un mayor porcentaje de plantas que crecieron hasta tener su primera hoja, en tratamientos que poseen carbón activado.

4.3 Elongación

Al analizar el crecimiento de *O. pentadactylon* se observa que el mejor tratamiento fue Phy. (Tabla 5 y Figura 5). Como ya se mencionó antes, este medio posee componentes que favorecen el crecimiento de la planta en general. Después del tratamiento Phy, los mejores resultados se obtuvieron con KC, KC+GA₃(0.2mg/L) y KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L). (Tabla 5 y Figura 5). Estos tres tratamientos tienen en común el medio de cultivo Knudson C. Lo mencionado concuerda con la literatura debido a que Aktar, et al. (2008) reportan que para la orquídea epífita *Dendrobium* sp. dicho medio fue el que logró los mejores resultados de elongación.

El medio Phy y KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) poseen carbón activado, se ha reportado que se utiliza carbón activado para la conversión de la fase 4 (protocormo avanzado) a fase 5 (brote de la primera hoja) (Kim, Kang, Enkhtaivan, Jan, & Sivanesa, 2019).

4.4 Enraizamiento

Al analizar las dos variables de enraizamiento de *O. pentadactylon* se observa que el mejor tratamiento fue Phy+IBA(1.5mg/L). (Tabla 6 y Figura 6). Resultados similares se observaron en Rahman et al., (2005), quienes reportan que utilizando dicha hormona en una concentración de 1.5mg/L se obtiene un mayor número de raíces y mayor crecimiento en la orquídea *Oncidium taka*. (Cueva & Moya, 2015). La hormona ácido indol butírico (IBA) es una auxina que sirve principalmente para inducir el crecimiento de las raíces debido a que induce la división celular repetitiva de dicho órgano (Rizwan et al., 2012).

El medio Phy posee carbón activado, Sipayung (2018), reporta que el carbón activado oscurece el medio, lo que estimula a las sustancias de crecimiento endógeno para que trabajen activamente en el proceso de crecimiento y desarrollo de las raíces.

5 CONCLUSIONES

Se logró establecer un protocolo para la germinación asimbiótica y desarrollo *in vitro* de *Oncidium pentadactylon* y *Elleanthus capitatus*, obteniendo un porcentaje de germinación de 81.6% con el tratamiento Phy+GA₃(0.2mg/L) y 58.7% con el tratamiento KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L) respectivamente.

Los tratamientos Phy+GA₃ (0.2mg/L), Phy, MS+CA(2g/L) y KC fueron los óptimos para obtener el desarrollo hasta fase 5 de las plántulas de *O. pentadactylon*. Mientras que para *E. Capitatus*, tanto en el ensayo de semillas secas como en el de las frescas el mejor tratamiento fue KC+GA₃(0.2mg/L)+CA(2g/L).

El mejor tratamiento para la elongación de *O. pentadactylon* fue Phy con un crecimiento de 16.24mm±0.39 en tres meses. Para el enraizamiento el mejor tratamiento fue Phy+IBA(1.5mg/L) con 5±1.09 raíces por plántula y un crecimiento en promedio de 15.00mm±0.93 en tres meses.

Por último, se concluye que los resultados obtenidos aportan para la propagación *in vitro* de especies de orquídeas en el Ecuador.

6 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el ensayo de elongación de la orquídea *E. capitatus*, empleando los mismos medios utilizados en este trabajo para la germinación. En el caso de que las plántulas no desarrollen raíces suficientemente grandes, se recomienda realizar un ensayo enraizamiento considerando su cultivo en medios suplementados con IBA, lo cual se ha visto que funciona en otras especies.

Una vez que se obtengan plántulas con raíces bien desarrolladas, se recomienda realizar un ensayo de aclimatación, tanto para *O. pentadactylon* como para *E. capitatus*.

7 REFERENCIAS

- Abrahamian, P., & Kantharajah, A. (2011). *Effect of Vitamins on In Vitro Organogenesis of plant*. Retrieved from https://file.scirp.org/pdf/AJPS20110500007_58789879.pdf
- Akatar, S., Nisiruddin, M., & Hossain, K. (2008). *Effects of Different Media and Organic Additives Interaction on In Effects of Different Media and Organic Additives Interaction on In*.
- Aucapiña, C., & López, P. (2016). *Definición de protocolos para el uso de fitohormonas para el crecimiento de orquídeas a nivel in vitro*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12147/1/UPS-QT09895.pdf>
- Bacuilima, P. (2015). *Respuesta fisiológica de la orquidea Maxilaria grandis*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8155/1/UPS-CT004909.pdf>
- Batjes, N. (1996). *Total Carbon and Nitrogen in the Soils of the World*. Retrieved from DOI: 10.1111/j.1365-2389.1996.tb01386.x
- Beltrán, M., & Carreón, Y. (2015). *UNA AMISTAD ANCESTRAL: ORQUÍDEAS Y HONGOS*. Retrieved from <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/259-numero-30/467-una-amistad-ancestral-orquideas-y-hongos.html>
- Benzing, D., & Atwood, J. (1984). Orchidaceae: ancestral habitats and current status in forest canopies. *Systematic Botany* 9: 155 –165.
- Cabrera, L. (2008). *Las semillas*. Retrieved from http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec_5.htm
- Castellanos, C., & Torres, M. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible*. Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica.
- Cevallos, M. (2016). *Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel in vitro*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12147/1/UPS-QT09895.pdf>
- CITES. (2020). *Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres*. Retrieved from <https://www.cites.org/esp/disc/text.php#II>
- Cueva, E., & Moya, M. (2015). *Evaluación de tres crioprotectores para el almacenamiento de itrogeno liquido de semillas de orquideas nativas del ecuador: elleathus, epidendrum, odontoglossum y Oncidium*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9218/1/UPS-QT06860.pdf>
- Dearnaley, J., Silvia, P., & Selosse, M. (2017). *Structure and development of orchids mycorrhizas in Molecular mycorrhizal symbiosis. First Edition*. . John Wiley and sons, Inc. .
- Ekos. (2015). *Regulan la comercialización de orquídeas*. Ekos.

- Endara, L., Williams, N., & León, S. (2010). Explorando los patrones de endemismo de las orquídeas ecuatorianas: implicaciones para su conservación. *Congreso Latinoamericano de Botánica*, 110-130.
- Escobar, G., Solano, L., Vásquez, G., & Colinas, L. (2008). *In vitro propagation of Oncidium stramineum Lindl., an endangered endemic mexican orchid*. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300017
- Freuler, M. (2008). *Orquídeas*. Buenos Aires, Argentina: Albatros.
- García, G., & Landy, O. (2016). *AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL CERRO ABUGA EN LA PROVINCIA*. Retrieved from <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26627/1/tesis.pdf>
- Hicks, A., & Lynn, K. (2007). Orchid Seed Germination Media. A Compendium of Formulations. *The Orchid Seedbank Project, Chandler*.
- Hossain, M. (2008). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth.(Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*, 3614-3619.
- ImageJ. (2018). *Scientific Image Analysis*.
- IUCN. (2018). *The IUCN red list of threatened species*. Retrieved from Recuperado el 1 de marzo del 2019 desde: <https://www.iucnredlist.org/search?query=orchids&searchType=species>
- Jiménez, M. (2014). *Orquídeas del Ecuador-Número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/268632113_Orquideas_del_Ecuador-Numero_de_especies_endemismo_especies_amenazadas_y_su_manejo_adecuado
- Kauth, P., Dutra, D., Johnson, T., Lynn, S. K., & Vendrame, W. (2007). Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Global Science Books.
- Kim, D., Kang, K., Enkhtaivan, G., Jan, U., & Sivanesa, I. (2019). Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron non-symbiotic in vitro seed germination of *Pecteilis radiata*(Thunb.) Raf. *South African Journal of Botany*, 144-150. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/333331688_Impact_of_activated_charcoal_culture_medium_strength_and_thidiazuron_on_non-symbiotic_in_vitro_seed_germination_of_Pecteilis_radiata_Thunb_Raf#pf6
- Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 14, 214-217.
- Luan, V., Thien, N., Khiem, D., & Nhut, D. (2006). In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. *Ho Chin City*, 175-177.

- MAE. (2015). *Quinto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Quito, Ecuador. Retrieved from <https://www.cbd.int/doc/world/ec/ec-nr-05-es.pdf>
- Mayo, A., Cazares, J., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). *Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco*. alberto Mayo Mosqueda.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Ceiba Foundation for Tropical conservation.
- Menchaca, R. (2011). *Manual de propagación de orquídeas*. Retrieved from https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPA GACION_DE_ORQUIDEAS.PDF.
- MERK. (2020). *Orchid Culture Media Formulations*. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/orchid-culture-media.html>
- Merk-Sigma-Aldrich. (2020). *Formulaciones de medios de cultivo de orquídeas*. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/orchid-culture-media.html>
- Ministerio de Turismo. (2014). *Ecuador, el primer "País de las Orquídeas" del mundo*. Retrieved from <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-el-primer-pais-de-las-orquideas-del-mundo/>
- Ministerio de Turismo, E. (2013). Informe técnico para proyecto de decreto ejecutivo "Ecuador País de las Orquídeas".
- Ministerio del Ambiente. (2015). *MAE regula comercialización de orquídeas*. Retrieved from <https://www.ambiente.gob.ec/mae-regula-comercializacion-de-orquideas/>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-481.
- Musharof, M., Sharma, M., & Pathak, P. (2009). Cost effective protocol for in vitro mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.- A medicinally important orchid. *Engineering in Life Sciences*, 444-453.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T., & Seaton, P. &. (2011). Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 204-212.
- Newman, B., Ladd, P., Batty, A., & Dixon, K. (2007). Ecology of orchids in urban bushland reserves- can orchids be used as indicator of vegetation conditions? *Lankesteriana*, 7, 313-315.
- Ospina, M. (1996). Orchids and ecology in Colombia: to the rescue of paradise. *Santafé de Bogotá, Colombia: Panamericana Formas e Impresos*.
- Pacek, A., Dyduch, M., & Rudás, M. (2010). Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). Retrieved from DOI: 10.2478/fhort-2013-0158

- Pridgeon, A., Cribb, P., Chase, M., & Rasmussen, F. (2009). *Genera Orchidacearum*. volumen 5. Oxford University Press, Oxford.
- Pypker, T., Unsworth, M., & Bond, B. (2006). The role of epiphytes in rainfall interception by forest in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Forest Research*, 36, 809-818.
- Rahman, S., Isaam, M., & Sen, P. B. (2005). *In vitro Propagation of Oncidium taka*. Retrieved from <https://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2005.225.229>
- Rahman, S., Shahidul, M., Kumar, P., & Begum, F. (2005). In vitro propagation of *Oncidium taka*. *Biotechnology*, 225-229. Retrieved from <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/biotech/2005/225-229.pdf>
- Ramírez, A. (2011). *EL CAMBIO CLIMÁTICO y el estado simbiótico de los árboles del bosque*. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v2n5/v2n5a2.pdf>
- Rasmussen, H., & Rasmussen, F. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos Journal*, 118, 334-345.
- Rey, C., & Llopiz, J. &. (2007). Estudio comparativo del carbón activado M1 de producción nacional para su uso como antídoto. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 38(3).
- Rizwan, R., Balquees, F., & Salman, M. (2012). Effect of indole-3-butyric acid (IBA) on in vitro root induction in dendrobium orchid (*Dendrobium sabin H.*). *African Journal of Biotechnology*. doi:DOI: 10.5897/AJB11.2319
- Salazar, S., & Gélvez, J. (2015). Determining the Viability of Orchid seeds using the Tetrazolio and Carmín Índigo Tests. *Revista de Ciencias*, 59-69.
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2009). *Cultivo de orquídeas por semillas*. Richmond, Surrey, UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Sedano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. (2015). Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 451-456. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263139243061.pdf>
- Seeman, A. (1993). *Utilización de técnicas de micro propagación*. Chile: Avances en producción y sanidad vegetal: cultivos no tradicionales.
- Setiti, E., & Hariyanto, S. (2019). *In Vitro Seed Germination and Seedling Development of a Rare Indonesian Native Orchid Phalaenopsis amboinensis J.J.Sm*. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2019/8105138>
- Shefferson, R., Weiss, M., Kull, T., & Taylor, D. (2005). High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular ecology*, 14(2), 613-626.
- Shekarriz, P., Kafi, M., & Dianati, S. M. (2014). *Coconut Water and Peptone Improve Seed Germination and Protocorm Like Body Formation of Hybrid Phalaenopsis*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/317674144_Coconut_Water_and_Peptone_I

mprove_Seed_Germination_and_Protocorm_Like_Body_Formation_of_Hybrid_Phal
aenopsis

- Singh, R., Khamba, S., Kaushik, S., & Kumar, R. (2018). *Role of Vitamins in Plant Growth and their Impact on Regeneration of Plants under Invitro Condition*. Retrieved from <https://www.ijraset.com/files/serve.php?FID=14089>
- Sipayung, P., Matanari, J., Lafau, M., Sri, Y., Giting, B., Restuana, D., . . . 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. *IOP publishing*. doi:doi:10.1088/1755-1315/205/1/012025
- Solis, M. (2012). *Reprogramación del polen a embriogénesis inducida por estrés: identidad celular, muerte celular programada y papel de la metilación de DNA* . Retrieved from https://digital.csic.es/bitstream/10261/143805/1/Tesis_Maria_Teresa_Solis_UCM_2012.pdf
- Srivastava, L. (2002). *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. California: Associated Press.
- Statistical Software Minitab. (2019). *Minitab18*. Retrieved from <https://www.minitab.com/es-mx/>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology*. United States: Sinauer.
- Valencia, N. (2019). *Germinación asimbiótica y cultivo in vitro de la orquídea epífita Epidendrum jamiesonis y de la orquídea terrestre Pleurothallis pulchella*.

8 TABLAS

Tabla 1: Medios de cultivo utilizados en la germinación de *E. capitatus* y la germinación y elongación de *O. pentadactylon*. Cada letra en mayúscula representa a cada tratamiento. MS: Murashige y Skoog modificado. KC: Knudson C modificado. Phy: (Phytamax™ Orchid Medium with charcoal Sigma). GA₃: Ácido giberélico.

Letra	Tratamiento
A	MS (Murashige & Skoog, F., 1962) sin hormona sin carbón activado
B	MS con carbón activado (2000 mg L ⁻¹)
C	MS con hormona: ácido giberélico (GA ₃) (0.2 mg L ⁻¹)
D	MS con hormona GA ₃ (0.02 mg L ⁻¹) y carbón activado (2000 mg L ⁻¹)
E	KC (Knudson, 1946) sin hormonas y sin carbón activado
F	KC con carbón activado (2000 mg L ⁻¹)
G	KC con hormona GA ₃ (0.2 mg L ⁻¹)
H	KC con hormona GA ₃ (0.2 mg L ⁻¹) y carbón activado (2000 mg L ⁻¹)
I	Phy (MERK, 2020)
J	Phy con hormona GA ₃ (0.2 mg L ⁻¹)

Tabla 2: Medios de cultivo utilizados en el enraizamiento de *O. pentadactylon*. Cada letra en mayúscula representa a cada tratamiento. KC: Knudson C modificado. Phy: (Phytamax™ Orchid Medium with charcoal Sigma). IBA: Ácido indol butírico.

Letra	Tratamientos
A	KC sin hormona IBA
B	KC con hormona IBA (0.5mg/L)
C	KC con hormona IBA (1mg/L)
D	KC con hormona IBA (1.5mg/L)
E	Phy sin hormona IBA
F	Phy con hormona IBA (0.5mg/L)
G	Phy con hormona IBA (1mg/L)
H	Phy con hormona IBA (1.5mg/L)

Tabla 3: Comparación de los resultados de la germinación y avance hasta fase 5 entre semillas frescas y secas de *O. pentadactylon* y *E. capitatus*. Porcentaje de la germinación en los ensayos de semillas frescas y secas. No se evidenció germinación en el ensayo de semillas secas de *O. pentadactylon*.

	<i>Oncidium pentadactylon</i>		<i>Elleanthus capitatus</i>	
	Frescas	Secas	Frescas	Secas
% Semillas germinadas	43%	0%	26%	11%
% Plántulas que llegaron a fase 5	54%	0%	50%	44%

Tabla 4: Resultados de germinación y avance hasta fase 5 entre *O. pentadactylon* y *E. capitatus*. Porcentaje de la germinación y plántulas en fase 5 evidenciado en todos los tratamientos con los que se trabajó.

	<i>Oncidium pentadactylon</i>	<i>Elleanthus capitatus</i>
%Semillas germinadas	43%	26%
%Plántulas que llegaron a fase 5	54%	44%

Tabla 5: Resultados elongación de *O. pentadactylon*. Media y la desviación estándar del crecimiento de las plántulas que se obtuvo en los tratamientos que se mencionan en la Tabla 1. Las letras en minúscula diferentes representan diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

Tratamiento	Media del crecimiento en tres meses (mm)
A	10.08±0.37 ^e
B	15.13±0.26 ^b
C	15.00±1.36 ^b
D	11.00±0.63 ^d
E	16.24±0.39 ^a
F	10.21±1.62 ^e
G	10.00±0.16 ^e
H	15.24±0.34 ^b
I	10.21±0.29 ^d
J	14.44±0.85 ^c

Tabla 6: Resultados de enraizamiento de *O. pentadactylon*. Media y la desviación estándar del número de raíces su el crecimiento en los tratamientos que se mencionan en la Tabla 2. Las letras en minúscula diferentes representan diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

Tratamiento	Media número de raíces	Tamaño de la raíz (mm)
A	0 ^e	0 ^e
B	1.42±0.49 ^c	4.31±1.10 ^c
C	3.31±0.59 ^b	11.48±0.58 ^b
D	5.00±1.09 ^a	15.00±0.93 ^a
E	0 ^e	0 ^e
F	1.00±0.81 ^c	2.00±1.14 ^d
G	1.62±0.49 ^c	4.60±0.54 ^c
H	3.17± ^b	11.26±1.13 ^b

9 FIGURAS

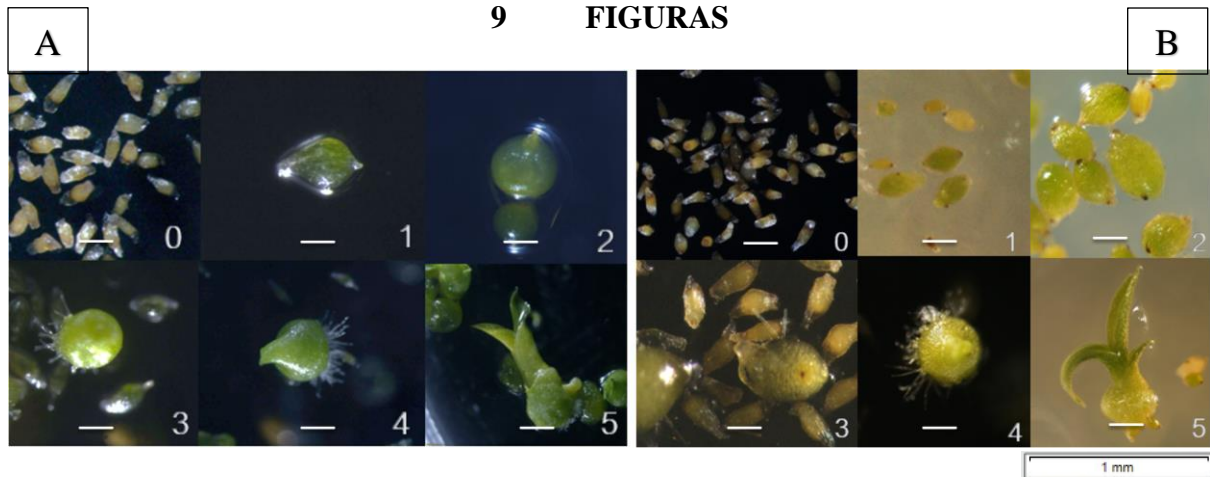


Figura 1: Fases de las semillas de orquídeas. Fotos tomadas con un estereomicroscopio indicando las 6 fases en el desarrollo de las orquídeas. (0) semillas sin germinar. (1) semillas con embrión engrosado y verde. (2) semilla con embrión engrosado, rompimiento de la testa. (3) protocormo inicial. (4) protocormo avanzado. (5) plántula. (A) fotos pertenecientes a *Oncidium pentadactylon* (B) fotos pertenecientes a *Elleanthus capitatus*. La línea blanca debajo de cada imagen corresponde a la escala de la imagen y representa 1mm.

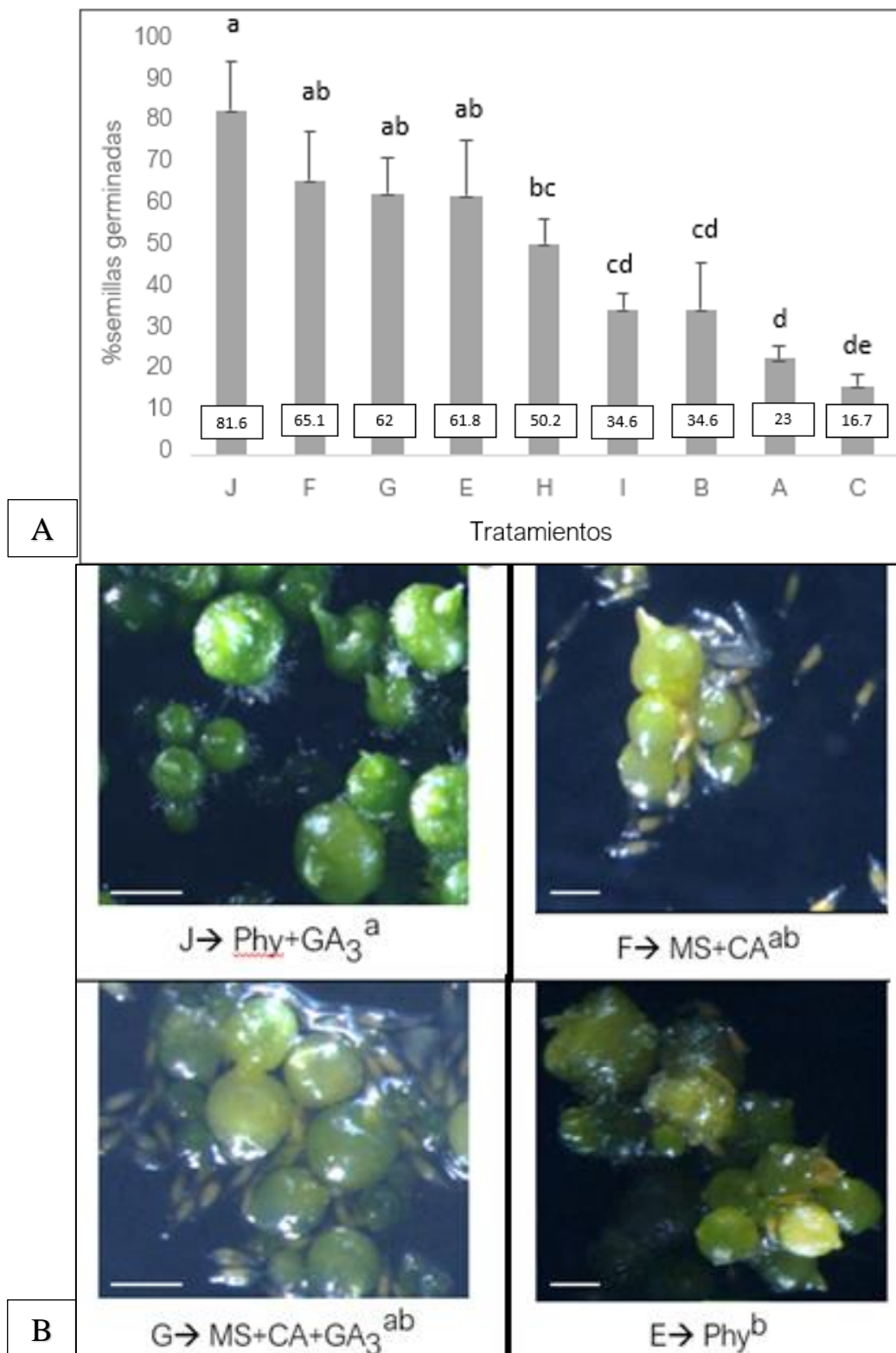


Figura 2: Germinación *Oncidium pentadactylon*. (A) Porcentaje de semillas germinadas que se obtuvo en los tratamientos que se mencionan en la Tabla 1 con su respectiva desviación estándar. Las letras en minúscula diferentes representan diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$). (B) Fotos representativas tomadas con un estereomicroscopio. Debajo de cada imagen está el nombre de cada tratamiento. En cuanto a la escala de las fotos, la línea blanca debajo de cada imagen representa 1mm.

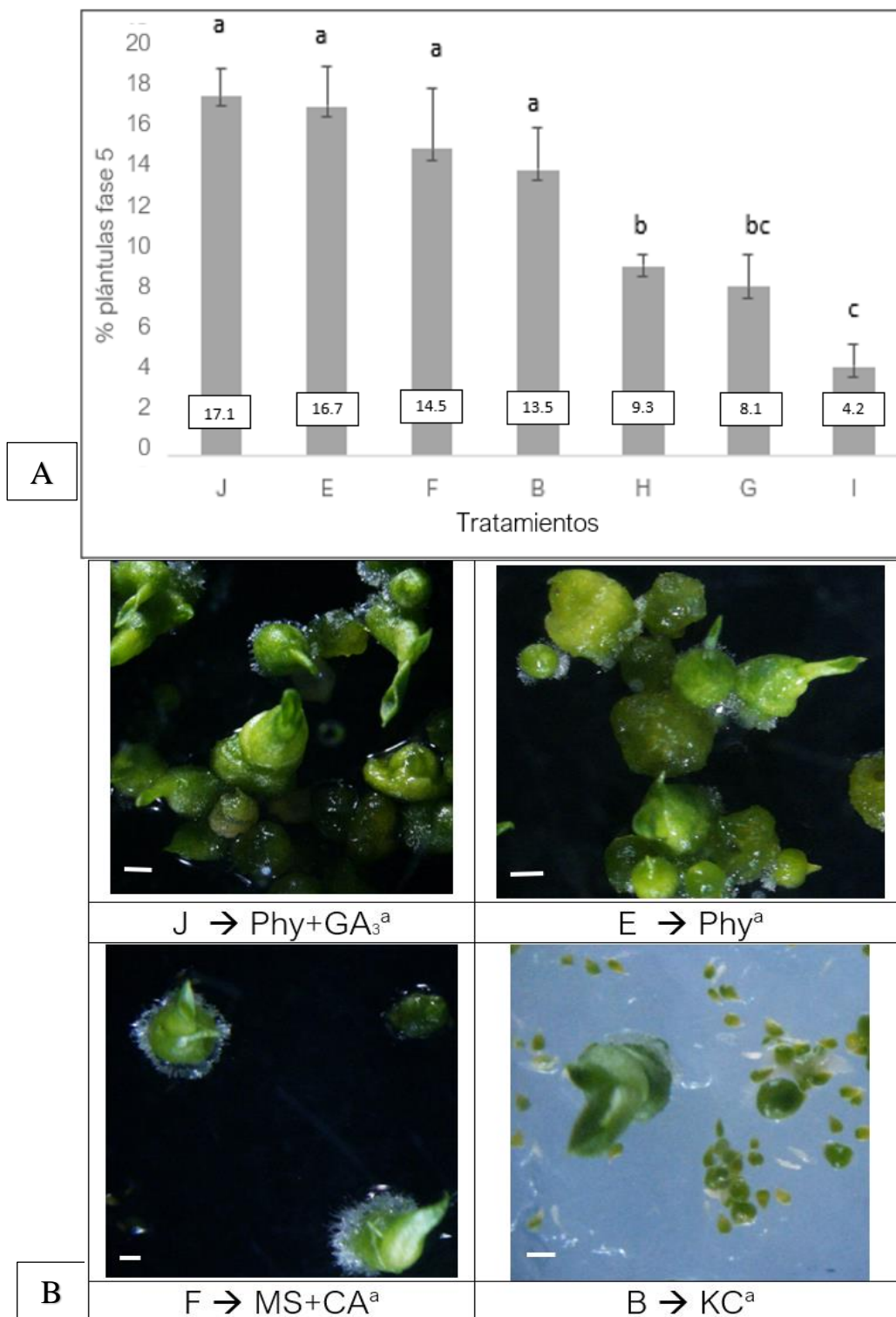


Figura 3: Desarrollo de las plántulas de *Oncidium pentadactylon* hasta fase 5. (A) Porcentaje de plántulas en fase 5 que se obtuvieron en los tratamientos que se mencionan en la Tabla 1 con su respectiva desviación estándar. Las letras en minúscula diferentes representa diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$). (B) Fotos representativas tomadas con un estereomicroscopio. Debajo de cada imagen está el nombre de cada tratamiento. En cuanto a la escala de las fotos, la línea blanca debajo de cada imagen representa 1mm.

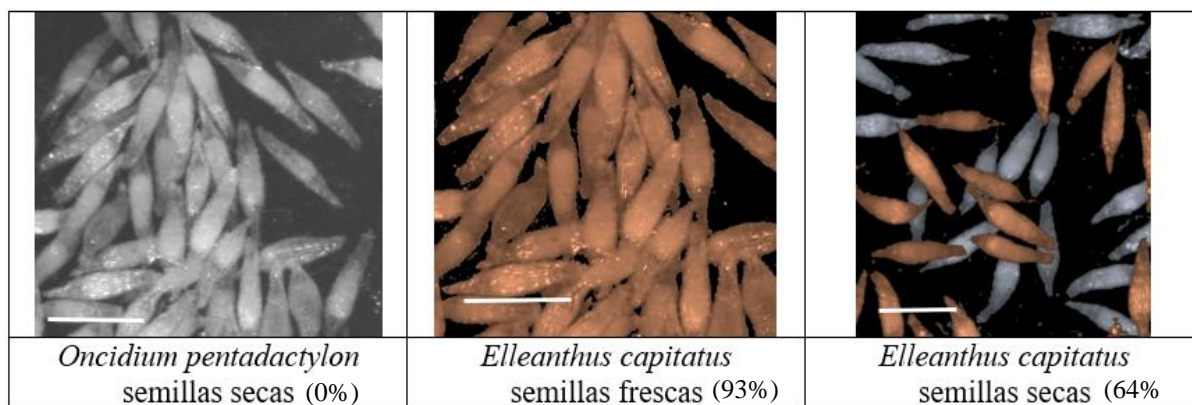


Figura 4: Resultados prueba de viabilidad. Fotos representativas tomadas con un estereomicroscopio. Debajo de cada imagen está el nombre del origen de cada grupo de semillas. Además, en paréntesis se indica el porcentaje de viabilidad que obtuvo cada grupo de semillas. En cuanto a la escala de las fotos, la línea blanca debajo de cada imagen representa 1mm.

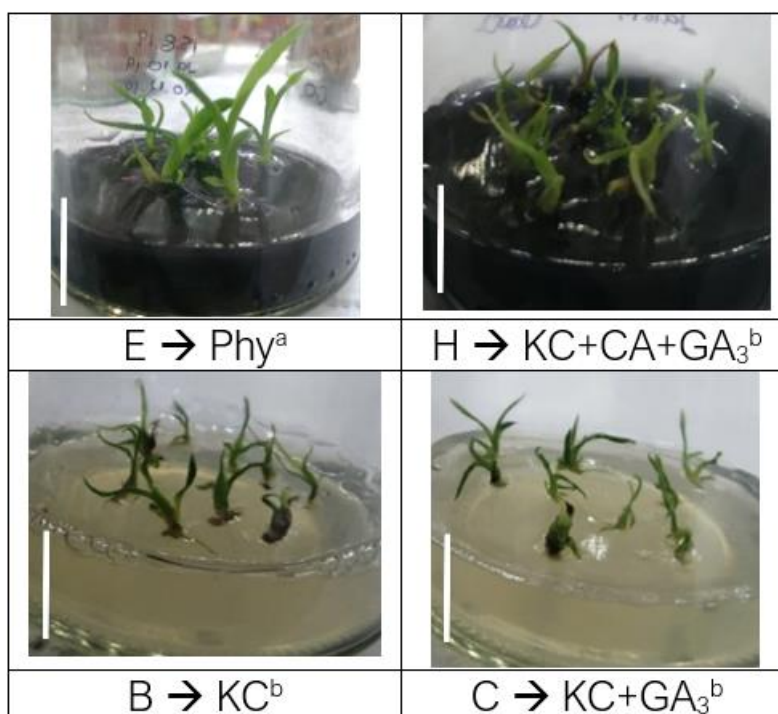


Figura 5: Elongación de *Oncidium pentadactylon*. Fotos representativas de las plántulas. Debajo de cada imagen está el nombre de cada tratamiento. Las letras en minúscula diferentes representan diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$). En cuanto a la escala de las fotos, la línea blanca en la esquina izquierda de cada imagen representa 1cm.

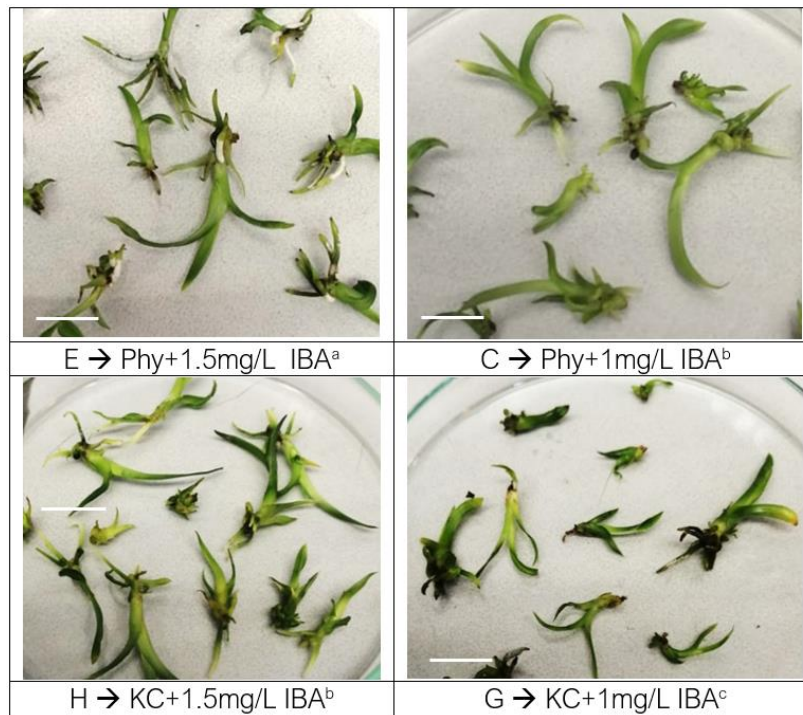


Figura 6: Enraizamiento *Oncidium pentadactylon*. Fotos representativas de las plántulas. Debajo de cada imagen está el nombre de cada tratamiento. Las letras en minúscula diferentes representan diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$). En cuanto a la escala de las fotos, la línea blanca en la esquina izquierda de cada imagen representa 1cm.

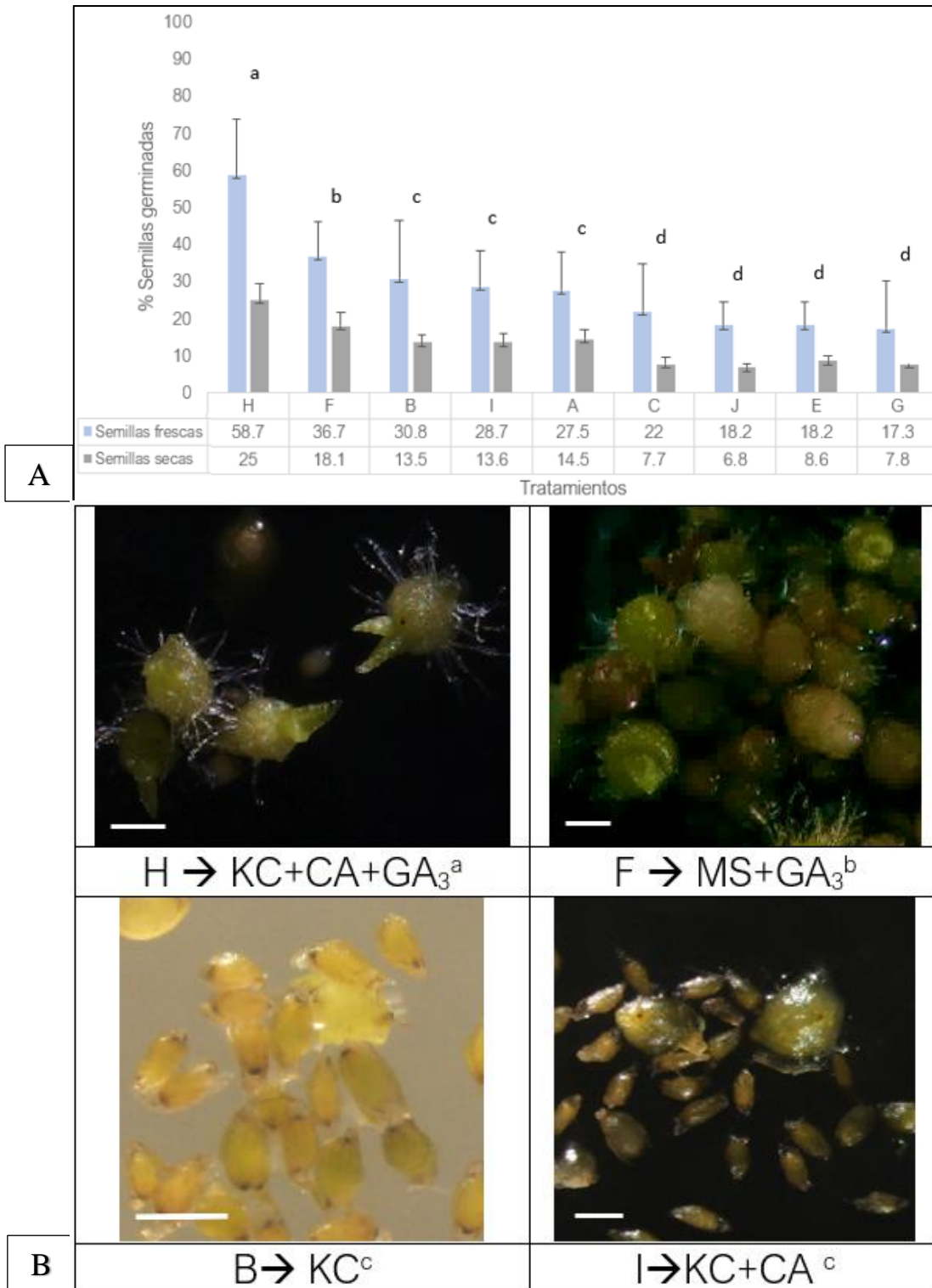


Figura 7: Germinación de *Elleanthus capitatus*. (A) Porcentaje de semillas germinadas en los tratamientos que se indican en la Tabla 1 con su respectiva desviación estándar, de las semillas secas y frescas. Las letras en minúscula diferentes representa diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$). (B) Fotos representativas tomadas con un estereomicroscopio. Debajo de cada imagen está el nombre de cada tratamiento. En cuanto a la escala de las fotos, la línea blanca debajo de cada imagen representa 1mm.

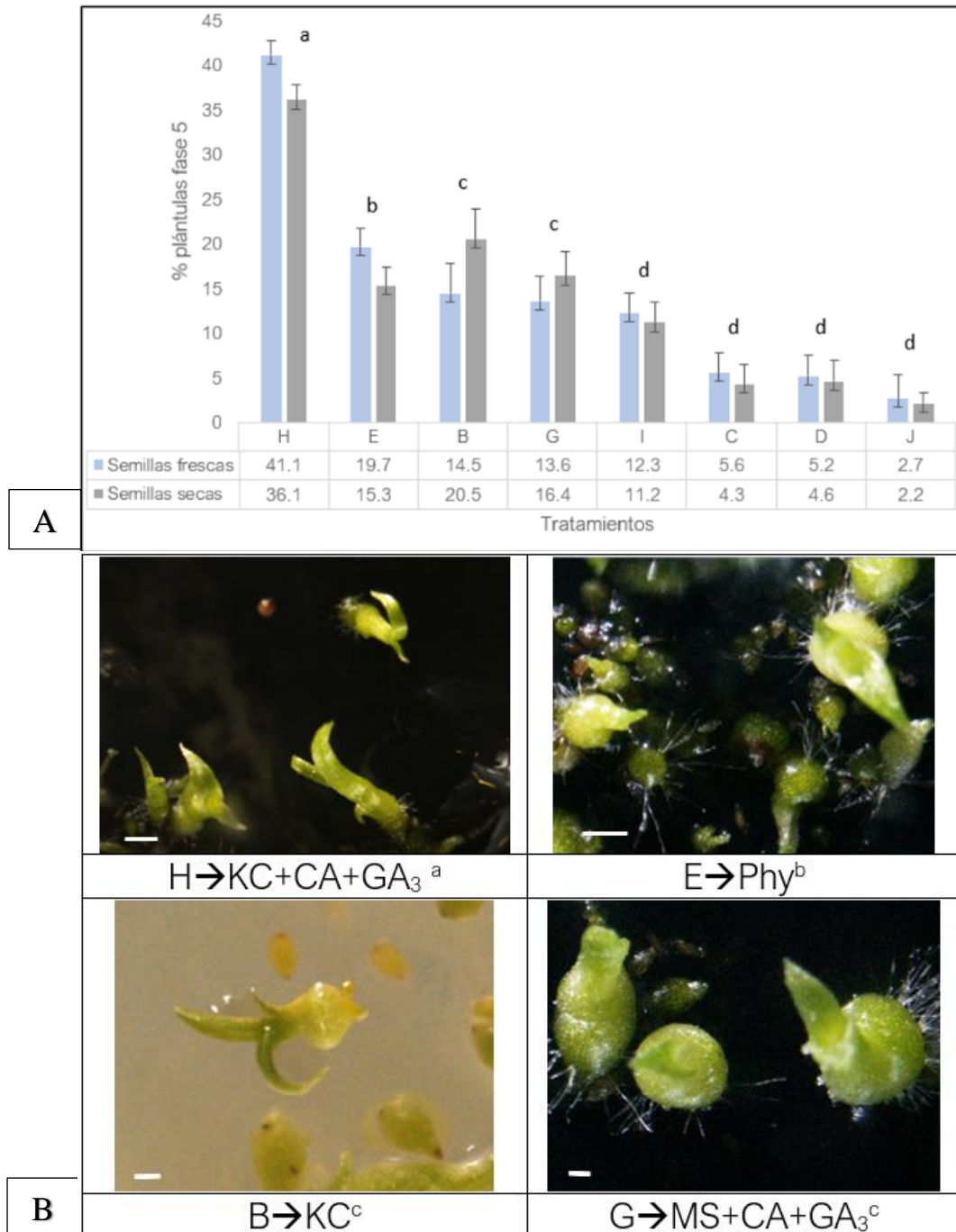


Figura 8: Avance hasta fase 5 *Elleanthus capitatus*. (A) Porcentaje de plántulas en fase 5 en los tratamientos que se indican en la Tabla 1 con su respectiva desviación estándar, del ensayo de las semillas secas y frescas. Las letras en minúscula diferentes representa diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$). (B) Fotos representativas tomadas con un estereomicroscopio. Debajo de cada imagen está el nombre de cada tratamiento. En cuanto a la escala de las fotos, la línea blanca debajo de cada imagen representa 1mm.

10 ANEXO A: Componentes de los medios de cultivo utilizados

Componente (mg/L)	KC	Phy	MS
Nitrato de Amonio		825	1650
Sulfato de amonio	500		
Ácido bórico	0.056	3.1	6.2
Anhidrido clorhídrico de calcio		166	332.2
Nitrato de calcio	694.4		
Clorhídrico de cobalto • 6H ₂ O		0.0125	0.025
Sulfato cúprico • 5H ₂ O	0.0624	0.0125	0.025
Na ₂ -EDTA		37.24	37.26
Sulfato ferroso • 7H ₂ O	25	27.85	27.8
Sulfato de magnesio	122.125	90.35	180.7
Clorhídrico de magnesio • 4H ₂ O			
Sulfato de magnesio • H ₂ O	5.682	8.45	16.9
Trióxido de molibdeno	0.016		
Sal sódica • 2H ₂ O		0.125	0.25
Yodato de potasio		0.415	0.83
Nitrato de potasio		950	1900
Fosfato de potasio monobásico	250	85	170
Zinc sulfato • 7H ₂ O	0.331	5.3	8.6
Carbón activado		2000	
MES		1000	
Mioinositol		100	
Ácido nicotínico		1	
Peptona		2000	
Piridoxina • HCl		1	
Sacarosa	20000	20000	20000
Tiamina • HCl		10	