



# Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de protocormos de *Epidendrum catillus* Rchb. F & Warsz. (Orchideaceae), en diferentes medios de cultivo

## In vitro seed germination and protocorm development of *Epidendrum catillus* Rchb. F & Warsz. (Orchideaceae), in different culture media

Javier J. Gonzales-Arteaga<sup>1</sup>; Juan Rodríguez-Layza<sup>1</sup>; Ladislao C. Romero-Rivas<sup>1,\*</sup>; Adelmo Párraga-Quintanilla<sup>1</sup>; Julio A. Olivera-Soto<sup>2</sup>

1 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Filial Oxapampa, Carretera Central km 3,5, Barrio Miraflores, Oxapampa, Perú.

2 Laboratorio de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales, Centro Internacional de Investigación para la Sustentabilidad (CIIS) Lunahuaná, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú.

\* Autor correspondiente: [lromero@undac.edu.pe](mailto:lromero@undac.edu.pe) (L. C. Romero-Rivas).

ID ORCID de los autores

J. J. Gonzales-Arteaga: <https://orcid.org/0000-0001-6196-707X>

J. Rodríguez-Layza: <https://orcid.org/0009-0008-8521-8629>

L. C. Romero-Rivas: <https://orcid.org/0000-0002-6598-3277>

A. Párraga-Quintanilla: <https://orcid.org/0000-0001-7392-9599>

J. A. Olivera-Soto: <https://orcid.org/0000-0002-3470-1601>

### RESUMEN

La aplicación de técnicas es importante para la propagación masiva y eficiente de orquídeas, sin afectar el entorno natural y su conservación. El objetivo fue establecer un protocolo para la germinación *in vitro* de semillas y formación de protocormos de la orquídea *E. catillus*, donde se probaron seis medios de cultivo, t1, Knudson; t2, MS 75% + ANA (1,0 mg L<sup>-1</sup>) + AG3 (3,0 mg L<sup>-1</sup>); t3, MS 75% + 100 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco; t4, MS 100% + AG3 (3,0 mg L<sup>-1</sup>); t5, MS 100% + ANA (1,0 mg L<sup>-1</sup>) + AG3 (5,0 mg L<sup>-1</sup>); t6, MS 100% + 100 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco. Las semillas fueron obtenidas de una cápsula en estado de madurez fisiológica, del sector Grapanazú, Huancabamba, provincia de Oxapampa-Pasco, Perú. Se utilizó el diseño en bloques completos al azar (DBCA). Se encontró que, a los 64 y 71 dds los tratamientos t1, t3, t4 y t6 igualaron en la germinación de semillas y desarrollo de protocormos *in vitro* y todos ellos fueron superiores a t2 y t5. Se concluye que los medios Knudson, MS al 75 y 100% + 100 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco y MS 100% + AG3 (3,0 mg L<sup>-1</sup>), favorecieron la germinación *in vitro*.

**Palabras clave:** Protocormo; germinación *in vitro*; regulador de crecimiento; agua de coco; orquídea.

### ABSTRACT

The application of techniques is important for the massive and efficient propagation of orchids, without affecting the natural environment and its conservation. The objective was to evaluate the effects of six culture media: t1, Knudson; t2, MS 75% + NAA (1,0 mg L<sup>-1</sup>) + GA3 (3,0 mg L<sup>-1</sup>); t3, MS 75% + 100 mL L<sup>-1</sup> coconut water; t4, MS 100% + GA3 (3,0 mg L<sup>-1</sup>); t5, MS 100% + NAA (1,0 mg L<sup>-1</sup>) + GA3 (5,0 mg L<sup>-1</sup>); t6, MS 100% + 100 mL L<sup>-1</sup> coconut water on *in vitro* seed germination and protocorms formation of the orchid *E. catillus*. Seeds were obtained from a capsule in stage of physiological maturity from sector Grapanazú, Huancabamba, province of Oxapampa-Pasco, Peru. A randomized complete block design was used. It was found that, at 64 and 71 days, the treatments t1, t3, t4 and t6 had the same seed germination and development of *in vitro* protocorms, however, all of them were higher than t2 and t5. We concluded that Knudson media, MS 75% and 100% + 100 mL L<sup>-1</sup> coconut water and MS 100% + GA3 (3,0 mg L<sup>-1</sup>), enhanced seed germination.

**Keywords:** Protocorm; *in vitro* germination; plant growth regulator; coconut water; orchid.

Recibido: 27-12-2023.

Aceptado: 12-04-2024.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

## INTRODUCCIÓN

Las orquídeas pertenecen a una familia de las más diversas y son muy vulnerables por la destrucción de sus ambientes y extracción (Ávila & Salgado-Garciglia, 2006); en Costa Rica, en los Cerros La Carpintería, constituye el reservorio de la diversidad de orquídeas, donde el género *Epidendrum* fue el más diverso, comparado a otros (Cascante-Marín & Trejos, 2019); asimismo, en Colombia, en un relicto de bosque alto andino *E. caliptratoides* fue la más frecuente en seis de nueve transectos evaluados (Califa & Estupiñán, 2020); en la reserva de Biosfera de México del Estado de Tamaulipas, se han encontrado 39 especies y 20 géneros de orquídeas (Baltazar & Solano, 2020); en Perú, en bosque de llanura, Paujil, Oxapampa, se ha registrado mayores índices de diversidad en bosque ribereño (Damian, 2015); por otro lado, *E. catillus*, se reporta entre los 860-1500 msnm, monte siempre verde, subxerófilo, de hojas más o menos dura (Trujillo, 2022).

Por otro lado, las principales actividades que amenazan el crecimiento y desarrollo natural de las orquídeas son la alteración de su ecosistema y la extracción de éstas para su comercio ilegal (Martínez-Meléndez et al., 2020). Por la belleza de sus flores, son muy cotizadas en el mercado; debido a esto, tiene efecto sobre su estado de conservación en ambientes naturales, como *Laelia speciosa*, endémica de Aguas Calientes, México, con protección especial y que está amenazada (González, 2014); asimismo, *Hadrolaelia grandis* en peligro de extinción por destrucción de su hábitat y recolección como ornamental, frente a ello se ha probado varios tipos de medios con miras a la conservación y propagación (Vudala & Ribas, 2017); pero existen otras que se encuentran amenazadas, como es el caso de *Telipogon papili* y *T. bowmanii* (Martel, 2020).

La germinación natural de las semillas de orquídeas es alrededor del 5% (Mamani et al., 2022b); presenta dificultades en las primeras etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas (Harris et al., 2021); donde, dependen de la asociación con un hongo (McKendrick, 2000); se ha sugerido que existiría una asociación específica entre las especies intervinientes (Otero & Bayman, 2009). Al respecto, en *Dendrobium officinale*, con hongos micorrícicos compatibles: *Tulasnella* sp. TPYD-2, y *Piriformospora indica* PI y *Tulasnella* sp. FDd1 incompatibles, la germinación de semillas fue superior en PI con 67,80%, se obtuvo plántulas con dos hojas, comparado a TPYD-2, con 37,10%, y en cuanto a FDd1 no produjo plántulas (Chen et al., 2022); sin embargo, el hongo micorrítico DXY033, tiene una alta especificidad con *Paphiopedilum hirsutissimum* (Lindl.ex Hook.) Stein, en medio PDA produjo el agrandamiento de la semilla para dar origen al protocormo (Tian et al., 2023). La germinación asimbiótica in vitro de diferentes especies de orquídeas, ha permitido introducir y germinar semillas con una alta tasa de germinación, obtención de plantas sanas y vigorosas en algunas de ellas (Velázquez et al., 2016); sin embargo, las respuestas de cada una de

éstas en los medios nutritivos es variable (Flores-Hernández et al., 2017); también, tiene que ver el estado de madurez fisiológica y el estado indehisciente de las cápsulas (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2016).

Los embriones se transforman en estructuras diferenciadas denominadas protocormo (Pujasatria et al., 2020), donde sucede la morfogénesis que a veces demora años (Mendoza, 2016); *Eulophia flava* (Lindl.) Hook.f. en MS sin suplementos, es suficiente para germinar semillas en un 26,39%, y formaron plántulas en pos protocormo en 11,50% (Vasupen et al., 2023). Es importante el contenido de los nutrientes en el medio de cultivo y del genotipo de la especie; en *Cattleya crispa* la germinación en MS + 30 g L<sup>-1</sup> + 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, produjo la germinación a los 7 ddi, formación de protocormos a los 30 ddi y plantas a los 150 ddi (Vargas et al., 2023); asimismo, diferentes orquídeas, resultaron mejores en medio MS + jugo de piña, variando la germinación entre ocho a doce semanas y con agregado de plátano se diferenciaron órganos axiales a la quinta semana (Chacón-Campana et al., 2017); también en, *Dendrobium cunninghamii*, en los medios Nor-Stog 1973 y Vacin y Went 1949, cada uno + sacarosa al 2%, se obtuvo una germinación de alrededor del 50% en ambos medios (Diantina et al., 2020); por otro lado, en *Paraphalaenopsis labukensis* Shim, A. Lamb & CL Chan, la mayor tasa de germinación se dio con el medio Knudson C, seguido de MS, con 98,78% y 92,80, respectivamente y Knudson + 0,5 mg L<sup>-1</sup> con 17,25% (Nelson et al., 2023); y en *Cremastra appendiculata* var. *variabilis* (Blume) I.D. Lund. tuvo un mayor porcentaje de germinación, 48,7%, en un medio MS + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa + 8 g L<sup>-1</sup> de agar vegetal + 500 mg L<sup>-1</sup> de carbón activado, comparado a otros medios (Faisal et al., 2022); También, el uso de agua de coco al 20% dio una germinación del 86,4% (Mamani et al., 2022a). asimismo, en medio MS al 50% + 0,3% de carbón activado se ha obtenido la germinación del híbrido intergenérico *Laeliocattleya* (Gonçalves et al., 2016). La orquídea *Coelogyne pandurata* Lindl. se desarrolló mejor en un medio a base de fertilizante foliar que contenía emulsión de pescado + fenolatos y añadido una mezcla de macro y micronutrientes de hidroponía + agar 7 g L<sup>-1</sup> + 2 g L<sup>-1</sup> de carbón activado, comparado a otros medios (Dwiyani et al., 2022).

Las semillas de cápsulas inmaduras de *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E. Higgins, inoculadas en el medio MS modificado con vitaminas Morel más agua de coco y carbón activado, luego de un mes se evidenció la aparición de tejidos verdes y por ende la germinación, seguida por el rápido desarrollo de los protocormos (Salgado & Peñaranda, 2019). Asimismo, en tres especies de *Chloraea* (*C. crispa*, *C. gaviu* y *C. virescens*), *C. crispa* logró la máxima germinación cercana al 85%, en medio de cultivo de tomate, seguida del medio Malmgren Modified (MM) y medio de cultivo de banano con un 70% de germinación; sin embargo, los embriones de todas las especies en medio MM alcanzaron el mayor

desarrollo, evidenciando brotación distinta en cada una de ellas (Pereira et al., 2017). Igualmente, el porcentaje de semillas que germinaron en la especie *Anacamptis longicornu* fue diferente en los medios Orchimax + carbón activado y 30 g L<sup>-1</sup> y MS con 20 g L<sup>-1</sup> en las diferentes fechas de evaluación entre 60 a 180 dds (Arcidiacono et al., 2021).

Por tanto, la propagación masiva in vitro de diferentes especies de orquídeas se considera una alternativa biotecnológica efectiva como medida preventiva para disminuir la presión de la extracción y tráfico ilegal de las poblaciones silvestres (Castillo-Pérez et al., 2020). Por otro lado, existen varios medios de germinación in vitro,

como Knudson y otros, pero los requerimientos nutricionales de orquídeas, pueden ser mucho más variados, aún en las especies del mismo género (Mayo et al., 2010); éstas no se realizan como otras semillas, sino en simbiosis con hongos micorrízicos que les proporcionan energía para la germinación porque carecen de reservas (Barbery & Morales, 2011); esto hace que, se desarrollen investigaciones sobre diferentes medios en la germinación in vitro de orquídeas. El objetivo de la presente investigación fue determinar un medio de cultivo para la germinación y formación de protocormos de *E. catillus*, colectada en la zona de Grapanazú, Huancabamba, Oxapampa-Perú.

## METODOLOGÍA

### Ubicación

El trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de La Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, filial Oxapampa, Carretera Central s/n, km 3,5, Barrio Miraflores, distrito y provincia Oxapampa, región Pasco, Perú.

### Colecta y pretratamiento de material biológico

La colecta de las cápsulas fue en el sector Grapanazú (18 L; 451097,56E - 8844665,98N UTM) a 2071 msnm (GPS Garmin Monterra), distrito Huancabamba, provincia de Oxapampa. El monitoreo de la cápsula de *E. catillus*, OZ-007-HB, Figura 1a, se realizó hasta observar la madurez fisiológica; cinco días antes de ser colectada, se aplicó Azoxyestrobil + Difeconazole (1 mL L<sup>-1</sup>) con un pulverizador manual. Con una tijera de podar desinfectada con alcohol al 70%, se procedió a extraer la cápsula, seguido se trasladó al invernadero donde se sumergió durante 10 min en el mismo fungicida a 0,8 mL L<sup>-1</sup>, luego en una solución de acaricida (Etoxazole + Abamectin) 0,15 mL L<sup>-1</sup> durante 15 min y envuelta en papel toalla e introducida en bolsa de polipropileno con su respectivo código para el ingreso al laboratorio.

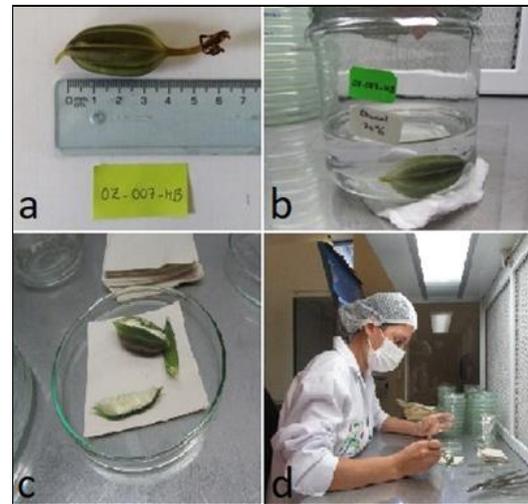
### En laboratorio

La cápsula se lavó con una solución de jabón líquido antibacterial (100 mL L<sup>-1</sup>) por cinco min, seguido se sumergió durante 15 min en NaOCl al 3% más una gota de Tween 20 por cada 100 mL. En la cámara de flujo laminar se realizó un triple enjuague con agua destilada estéril en agitación, después se sumergió en etanol al 70%, Figura 1b, durante 10 min, finalmente un triple enjuague en agua destilada estéril.

### Siembra e incubación de semillas

La cápsula, previamente desinfectada, se cortó con un bisturí N° 21 sobre una placa de Petri estéril, en secciones longitudinales, Figura 1c; se extrajeron las semillas y se inocularon en los diferentes medios de cultivo (tratamientos), contenidos en las placas de Petri, dispersándolas en forma uniforme sobre la superficie, Figura 1d; se rotularon y sellaron con Parafilm, luego fueron llevadas a la sala de incubación en los anaqueles a 23 °C, 59,57

μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (LP 471 PAR) de luminosidad, 60% de humedad relativa y fotoperíodo de 16 horas luz (ALION CE AHC 15A).



**Figura 1.** Cápsula de *E. catillus* en madurez fisiológica (a), en etanol al 70% (b), en corte longitudinal (c) y dispersión de semillas en medio de cultivo (d).

### Diseño estadístico

El diseño utilizado fue el de bloques completamente al azar, DBCA, (Melo et al., 2020), de seis tratamientos, Tabla 1, y cinco repeticiones; la unidad experimental estuvo constituida por una placa de Petri.

**Tabla 1**

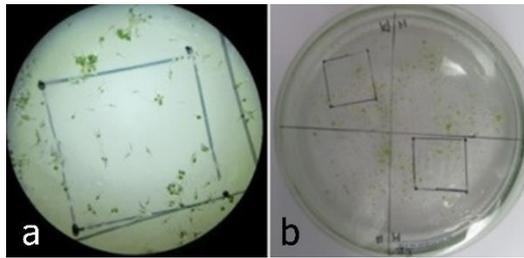
Tratamientos para germinación in vitro de semillas de *E. catillus*

Tratamiento	Descripción / Medio
t1	Formulación Knudson (HIMEDIA, PTO66)
t2	MS 75% + ANA (1,0 mg L <sup>-1</sup> ) + AG3 (3,0 mg L <sup>-1</sup> )
t3	MS 75% + 100 mL L <sup>-1</sup> de agua de coco
t4	MS 100% + AG3 (3,0 mg L <sup>-1</sup> )
t5	MS 100% + ANA (1,0 mg L <sup>-1</sup> ) + AG3 (5,0 mg L <sup>-1</sup> )
t6	MS 100% + 100 mL L <sup>-1</sup> de agua de coco

### Variables

Las variables, fueron el porcentaje de germinación y de protocormos; la germinación fue establecida

por la presencia de una coloración verde, y para el estadio de protocormo fue la coloración verde y de aspecto globoso (Nava, 2010), Figura 2a.



**Figura 2.** Semillas de *E. catillus*, en germinación y formación de protocormos (a) y distribución de cuadrículas para evaluación (b).

Cada placa de Petri se dividió en 4 cuadrantes, y se marcó una cuadrícula de 4 cm<sup>2</sup> solo en dos cuadrantes opuestos, Figura 2b; con la ayuda de un estereoscopio ACCU-SCOPE a 6,7 aumentos se registró el total de semillas germinadas y las transformadas en protocormos. Las evaluaciones fueron realizadas a los 32, 40, 49, 53, 57, 60, 64 y 71 días después de la siembra (dds).

**Análisis estadístico**

Los datos de porcentaje fueron transformados en Arcoseno y procesados con el software estadístico R v4.0.4, mediante análisis de variancia para encontrar significancia entre los tratamientos y prueba de comparación múltiple de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El análisis de varianza, ANOVA, Tabla 2, muestra diferencias altamente significativas para tratamientos (medios de cultivo) en porcentaje de germinación y protocormos en las fechas evaluadas, excepto a los 40 dds; y a los 32 dds en germinación no fueron significativos. La prueba de comparación múltiple de Duncan,  $\alpha = 0,05$ , Figura 3, muestra que en la germinación de las semillas, a los 32 y 40 dds, en los seis medios de cultivo, cinco de ellos respondieron de manera similar, el t2 tuvo menor porcentaje; a los 49, 53 y 57 dds, los tratamientos t1, t3 y t6 fueron superiores con respecto a los demás; a los 60 dds, el t1 fue superior e igual a t3; sin embargo, los tratamientos t2 y t5 fueron inferiores a los demás y calificados como un tercer grupo; a los 64 y 71 dds, los tratamientos t1, t3, t4 y t6 igualaron en la respuesta y fueron superiores sin diferencias significativas entre ellos; y t2 y t5 continuaron con menor respuesta en la germinación de las semillas y sin diferencias significativas entre éstos. La germinación de las semillas a los 32 y 40 dds, la respuesta fue de manera similar en cinco tratamientos a excepción de t2, que fue menor, al

respecto se observa que, el uso de AG3 en combinación con ANA en el medio, presentó efecto negativo importante en la germinación in vitro, porque hubo diferencias entre las semillas germinadas, en comparación que no contenía esta combinación, esto indicaría que el ANA, estaría bloqueando la acción del AG3, en el medio de cultivo, en base a que en el t4, que contiene solamente AG3, la germinación ha progresado igual a los demás medios; es importante que, en la introducción in vitro la cápsula debe encontrarse en madurez fisiológica y en estado indehiscente; además, han determinado que, en medio MS reducido al 50% en sus sales con pulpa de banano 60 g L<sup>-1</sup>, canela en polvo 1,5 g L<sup>-1</sup> y sin o con AIB a 2,5 mg L<sup>-1</sup> fueron favorables para la germinación de cuatro especies de orquídeas (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2016); sin embargo, en el presente trabajo, con un 75% (t3) y 100% (t6) de sales del MS, ambos con 100 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco, también favorecieron la germinación; esta etapa es crítica en las orquídeas, debido a que el embrión carece de reserva o endospermo (Lallana et al., 2016), que provee de energía para la germinación.

**Tabla 2**

Anova, coeficiente de variación (CV) y valores descriptivos en la germinación de *E. catillus* en seis medios de cultivo en diferentes fechas de evaluación después de la siembra (dds)

Tiempo (dds)		32		40		49		53	
Fuente de variación	gl	Germ.	Protoc.	Germ.	Protoc.	Germ.	Protoc.	Germ.	Protoc.
Bloques	4	0,0022	0,0011	0,0145	0,0145	0,0035	0,0035	0,0036	0,0036
Tratamientos	5	0,0058	0,0159**	0,0150	0,0150	0,0687**	0,0732**	0,1517**	0,1517**
CV%		36,97	32,93	31,60	31,60	14,49	14,42	16,35	16,35
Promedio		0,13	0,11	0,25	0,25	0,49	0,49	0,63	0,63
Mínimo		0,000	0,000	0,000	0,000	0,248	0,248	0,299	0,299
Máximo		0,217	0,188	0,405	0,405	0,754	0,754	0,981	0,981
Tiempo (dds)		57		60		64		71	
Fuente de variación	gl	Germ.	Protoc.	Germ.	Protoc.	Germ.	Protoc.	Germ.	Protoc.
Bloques	4	0,0031	0,0078	0,0109	0,0109	0,0094	0,0094	0,0195	0,0253
Tratamientos	5	0,2552**	0,2226**	0,3429**	0,3429**	0,3253**	0,3253**	0,4251**	0,4357**
CV%		13,59	16,57	11,50	11,50	11,88	11,88	10,64	11,12
Promedio		0,76	0,75	0,83	0,83	0,85	0,85	0,92	0,92
Mínimo		0,379	0,379	0,364	0,364	0,413	0,413	0,378	0,378
Máximo		1,076	1,076	1,249	1,249	1,180	1,180	1,298	1,300

Nota: Germ. = Germinación, Protoc. = Protocormo.

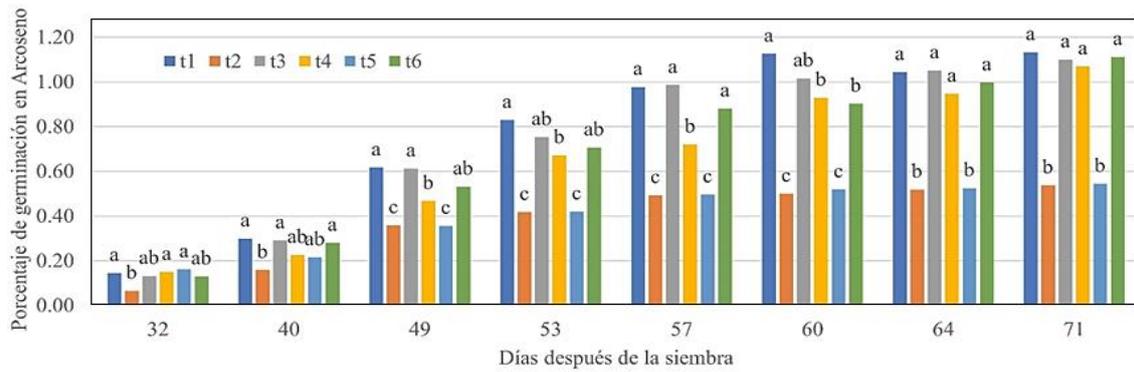


Figura 3. Germinación de semillas de *E. catillus* en seis medios de cultivo evaluados después de la siembra.

Por otro lado, el inicio de la germinación de la especie en estudio no concuerda con *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, que tuvo lugar a los 60 días en medio MS + vitaminas + 30 y 5 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y carbón activado, respectivamente (Carranza-Álvarez et al., 2021), esta diferencia es debido a que se trata de otra especie, y la germinación depende mucho del medio nutritivo y genotipo (Flores-Hernández et al., 2017). Los tratamientos t3 y t6 que igualaron a t1 (Knudson) considerado como medio específico para la germinación de varias especies de orquídeas, esto evidencia que es posible la germinación de *E. catillus* con MS + agua de coco a la concentración utilizada, resultados que concuerdan con otros autores, donde reportan que es posible hacer germinar semillas de orquídeas con el agregado de sustancias orgánicas; se ha inducido la germinación in vitro de semillas de *Rodriguezia longifolia*, *Bletia catenulata* y *Epidendrum spilatatum* en medio MS suplementado con jugo de piña variando entre ocho a doce semanas; asimismo, para *Epidendrum secundum*, La organogénesis fue mejor con el suplemento de plátano (Chacón-Campana et al., 2017); en *Dendrobium cruentum* Rchb. f. en medio VW complementado con homogeneizado de plátano y papa (1000 mg L<sup>-1</sup>), germinaron semillas in vitro en un 94,69%, y en agua de coco (100 mL L<sup>-1</sup>) ha favorecido en la formación de protocormos en 47,38% y la combinación de éste con el homogeneizado de papa con 52,13% (Samala & Thipwong, 2023); por otro lado, en *Anacamptis longicornu* se obtuvo la germinación de 95,5% en medio Orgcimax y 21,4% en medio MS (Arcidiacono et al., 2021). En caso de t4, que contenía MS + AG3, respondió bien a la germinación de la orquídea en estudio, similar a lo reportado que, a los 30 días de incubación, semillas de *Cattleya mendelii* y *C. quadricolor* en medio MS con 1,5 µM de GA3 y 0,5 µM de NAA se encontraron la mayor

tasa de germinación, 9,2% y 96,4%, respectivamente, con respecto al medio Knudson 41,7% y 84,3% sin reguladores de crecimiento (Díaz-Álvarez et al., 2015), en caso del medio Knudson es contrario al resultado del presente trabajo que resultó favorable; asimismo, en *Laelia anceps* subsp. Anceps se ha logrado la germinación de semillas en MS basal adicionado con 1% (p/v) de carbón activado y sin la adición de reguladores de crecimiento vegetal (Castillo-Pérez et al., 2020).

Los resultados a 64 y 71 dds, concuerdan en tiempo de germinación con los obtenidos de semillas de cápsulas de tamaño intermedio de 9 a 10 cm de longitud, que germinaron alrededor del 90% a los dos meses de cultivo en medio MS sin carbón activado y mantenidas en total oscuridad; pero, las semillas cultivadas igualmente en la oscuridad, en medio con carbón activado no germinaron (Flores et al., 2017). Por otro lado, en medio MS reducido al 50% en sus sales con pulpa de banano 60 g L<sup>-1</sup>, canela en polvo 1,5 g L<sup>-1</sup> y sin o con AIB a 2,5 mg L<sup>-1</sup> fueron favorables para la germinación de cuatro especies de orquídeas; sin embargo, estos medios no lograron romper la latencia de embriones inmaduros de las cápsulas (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2016). Las especies de orquídeas responden de diferente manera a un medio de germinación in vitro, *Dactylorhiza majalis* mejoró en cierta manera cuando la concentración de nitrato fue de 1 mg L<sup>-1</sup> (Figura et al., 2020).

La prueba de comparación múltiple de Duncan, α = 0,05, Figura 4, muestra que a los 32 y 40 dds, la formación de protocormos en los seis medios de cultivo, cinco de ellos respondieron de manera similar, sin diferencias estadísticas entre ellos y el t2 tuvo menor porcentaje; mientras que, a los 49, 53 y 57 dds, t1, t3 y t6 fueron superiores con respecto a los demás tratamientos.

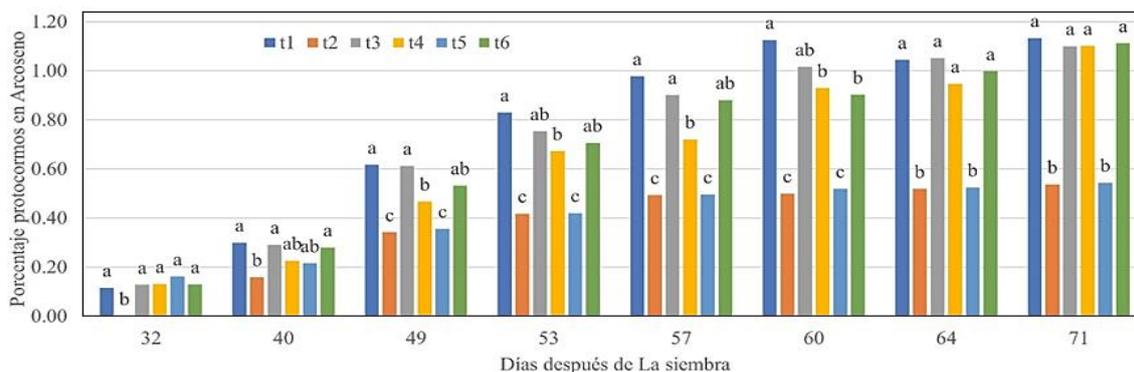


Figura 4. Formación de protocormos de *E. catillus* en diferentes medios de cultivo evaluados después de la siembra.

Asimismo, t2 igualó estadísticamente a t5 y fueron de menor porcentaje comparado al resto de tratamientos; a los 60 dds, el t1 fue superior e igual a t3; sin embargo, los tratamientos t2 y t5 fueron inferiores a los demás y calificados como un tercer grupo; a los 64 y 71 dds, tuvieron igual comportamiento, los tratamientos t1, t3, t4 y t6, sin diferencias significativas entre ellos y superiores a t2 y t5 los que tuvieron una menor respuesta en la formación de protocormos, sin diferencias significativas entre éstos.

La formación de protocormos, a los 32 y 40 dds, concuerda con los resultados que, en *Prosthechea fragrans* (Sw.) W. E. Higgins en el medio MS + vitaminas Morel, agua de coco y carbón activado que luego de un mes originó tejidos verdes y rápido desarrollo de protocormos (Salgado y Peñaranda, 2019); mientras que, la combinación de BAP 1,5 mg L<sup>-1</sup> + ANA 0,15 mg L<sup>-1</sup>, resultó mejor con un promedio de 6,75 brotes, y observaron la organogénesis de *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.), en el rango de BAP 1,0 a 3,0 mg L<sup>-1</sup> (Cazarez et al., 2016). En *Trichopilia tortilis* Lindl. se observa la formación de protocormos a los 45 días en medio MS líquido y sólido; sin embargo, a los 120 días en el medio sólido se encontró mayor germinación,

91,64% con respecto al medio líquido 78,94% (Mendoza, 2016); por otro lado, en *Serapias vomeracea* germinó 58,77% en medio Knudson, superior a los medios Vacin and Went y Lindemann y a sus diluciones al 50% incluido a Knudson (Acemi & Özen, 2019).

El desarrollo de protocormos, en *E. catillus* de 49 a 60 dds, muestra una variación en los seis medios de cultivo, donde se observa tres grupos; t2 y t5 fueron los tratamientos de menor repuesta, resultados que concuerdan con lo reportado para *Hadrolaelia grandis*, donde encontraron una variación entre los medios dentro de cada periodo de evaluación (Vudala & Ribas, 2017); en *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Epidendrum radicans*, *Euchile citrina*, *Laelia albida*, *L. autumnalis*, *Oncidium cavendishianum*, y *O. tigrinum* la adición de reguladores como auxinas, citoquininas y giberelinas al medio MS, favorece el crecimiento a partir de protocormos provenientes de semillas (Ávila & Salgado-Garciglia, 2006). Por otro lado, el desarrollo en *Laelia rubescens* Lindl. fue mejor en medio, Phytamax + jugo de piña comparado a Phytamax + agua de coco, ambos a una dosis de 100 mL L<sup>-1</sup> (Mayo-Mosqueda et al., 2020).

## CONCLUSIONES

De los seis medios de cultivo utilizados para la germinación y formación de protocormos de *E. catillus*, cuatro de ellos a partir de los 64 dds, resultaron ser superiores frente a t2 y t5, estos fueron la formulación Knudson (t1), los que

tuvieron MS en un 75% (t3) y 100% (t6) ambos con 100 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco y MS 100% + 3,0 mg L<sup>-1</sup> de AG3 (t4), respectivamente. En base a los resultados, se recomienda probar otras combinaciones de MS con agua de coco.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección del Instituto Central de Investigación - Vicerrectorado de Investigación - de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión (UNDAC), Pasco-Perú, por el financiamiento del proyecto "Desarrollo de protocolos en la propagación in vitro de Orquídeas y cultivos de importancia económica para la provincia de Oxapampa", a través del cual se realizó el presente trabajo como parte de sus objetivos. También

expresan su agradecimiento a Ing. Marilyn C. Enciso Waller; Bach. Odalyz L. Zúñiga Salcedo e Ing Mayra Y. Monago Curi por el soporte técnico brindado. Al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), por la autorización concedida mediante resoluciones RDG N° D000428-2020-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS y RD N° D000044-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF para realizar la presente investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acemi, A., & Özen, F. (2019). Optimization of in vitro asymbiotic seed germination protocol for *Serapias vomeracea*. *The EuroBiotech Journal*, 3(3), 143–151. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2019-0017>
- Arcidiacono, M., Catalano, C., Motisi, A., Sajeve, M., Carimi, F., & Carra, A. (2021). Influence of culture conditions on in vitro asymbiotic germination of *anacamptis longicornu* and *ophrys panormitana* (Orchidaceae). *Plants*, 10, 2–12. <https://doi.org/10.3390/plants10112543>
- Ávila, I., & Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biologicas*, 8, 138–149.
- Baltazar, S., & Solano, R. (2020). Diversidad y rasgos funcionales de orquídeas terrestres en bosques de un área natural protegida del noreste de México. *Botanical Sciences*, 98(4), 468–485. <https://doi.org/10.17129/botsci.2600>
- Barbery, R., & Morales, I. (2011). Manual para el cultivo in vitro de la orquídea *Cattleya nobile* "Flor símbolo de Concepción." In *Centro para la Participación y el Desarrollo Humano Sostenible CEPAD - Bolivia*. El País.
- Califa, S. D., & Estupiñán, L. H. (2020). Patrones de distribución de orquídeas en un relicto de bosque altoandino, Cundinamarca-Colombia. *Colombia Forestal*, 23(1), 5–19. <https://doi.org/10.14483/2256201X.14816>
- Carranza-Álvarez, C., Trinidad-García, K., Reyes-Hernández, H., Castillo-Pérez, L., & Fortanelli-Martínez, J. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de *Jacks*. ex *Andrews* (Orchidaceae). *Biotechnia*, 23(1), 5–12.
- Cascante-Marín, A., & Trejos, C. (2019). Diversidad y vulnerabilidad de la flora orquideológica de un bosque montano nuboso del valle central de Costa Rica. *Lankesteriana*, 19(1), 31–55. <https://doi.org/10.15517/lank.v19i1.37031>

- Castillo-Pérez, L. J., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, Á. J., & Carranza-Álvarez, C. (2020). Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación in vitro de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). *Biocencia*, 22(1), 32–38. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v22i1.1122>
- Cazarez, T. L., Graciano, J. de J., Solís, S., Díaz, B., Nájera, J. A., & Montoya, J. B. (2016). Propagación in vitro de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 67, 19–25. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2016672269>
- Chacón-Campana, M. A., Ponce-Aranibar, L. M., Muñiz-Luna, S. B., Huaracha-Quispe, D. P., & Flores-Huisa, K. (2017). Propagación *in-vitro* de cuatro especies de orquídeas nativas de la región Cusco. *Cantua*, 16, 26–43. <https://doi.org/10.51343/cantua.v16i0.630>
- Chen, X. G., Wu, Y. H., Li, N. Q., & Gao, J. Y. (2022). What role does the seed coat play during symbiotic seed germination in orchids: an experimental approach with *Dendrobium officinale*. *BMC Plant Biology*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03760-0>
- Damian, A. (2015). Distribución vertical y horizontal de la familia Orchidaceae en tres tipos de bosques en el sector Paujil, al interior del Parque Nacional Yanachaga Chemillen (Pasco-Perú). *Q'EUÑA*, 6, 67–76.
- Diantina, S., Kartikaningrum, S., McCormick, A. C., Millner, J., McGill, C., Pritchard, H. W., & Nadarajan, J. (2020). Comparative in vitro seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(3), 619–633. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01947-7>
- Díaz-Alvarez, E., Torres-Galiano, C., Rojas-Cortés, Á., & De La Barrera, E. (2015). Germinación y desarrollo in vitro de dos orquídeas amenazadas endémicas de Colombia, *Cattleya mendelii* y *Cattleya quadricolor*. *Gayana Botánica*, 72(2), 213–220. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432015000200005>
- Dwiyani, R., Fitriani, Y., & Mercuriani, I. S. (2022). The Alternative Media Supporting the Protocorm and Plantlet Growth of the Indonesian Black Orchid (*Coelogyne pandurata* Lindl.) Grown In Vitro. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*, 37(1), 152–160. <https://doi.org/10.20961/carakatani.v37i1.55956>
- Faisal, M., Seob, P. K., Kang, K. W., & Sivanesan, I. (2022). In Vitro Propagation of *Cremastra appendiculata* var. *variabilis* by Asymbiotic Seed Germination. *Horticulturae*, 8(926), 2–11. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100926>
- Figura, T., Weiser, M., & Ponert, J. (2020). Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content. *Plant Biology*, 22(1), 21–29. <https://doi.org/10.1111/plb.13044>
- Flores, O., Cuéllar, J., Montes, M., Gámez, M., Gónzales, M., Guevara, M., & Aguilar, N. (2017). Germinación in vitro de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. *Avances En Investigación Agropecuaria*, 21(2), 69–83.
- Flores-Hernández, L. A., Robledo-Paz, A., & Jimarez-Montiel, M. J. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, 8(6), 1315–1328.
- Gonçalves, L. de M., Machado, M. de F. P. S., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M. A., & Mangolin, C. A. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo in vitro del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia*, 34(1), 47–54. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>
- González, L. de A. (2014). *Propagación in vitro de Laelia speciosa (Orchidaceae) nativa de Aguascalientes* [Univeresidad Autónoma de Aguascalientes].
- Harris, C., Landero, I., Alvarado, J. F., & Hernández, R. (2021). Germinación de orquídeas utilizando un método sencillo y económico, reproducible en ambientes no óptimos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(5), 915–919. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2555>
- Lallana, V., Billard, C., Martínez, V., García, L., Barsanti, M., Di Persia, J., Dalzotto, C., Scimpft, K., & De la Cruz, V. (2016). Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos “in vitro.” *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 6(6), 94–121.
- Mamani, B., Muriel, A., Maquera, A., & Nova, M. (2022a). Germinación in vitro de *Epidendrum secundum* con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco. *ACTA NOVA*, 10(3), 345–359.
- Mamani, B., Nova, M., & Espinal, J. A. (2022b). Germinación in vitro de *Zigopetalum maculatum* con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(2), 26–36. <https://doi.org/10.53287/szsf13441s18k>
- Martel, C. (2020). Análisis de la categorización del estado de conservación de las orquídeas en el Perú: el caso del género *Telipogon*. *Revista Peruana de Biología*, 27(2), 267–270. <https://doi.org/10.15381/rpb.v27i2.16886>
- Martínez-Meléndez, N., Martínez-Meléndez, M., Hernández-Rodríguez, J. P., & Jiménez López, D. A. (2020). Orquídeas silvestres: amenazas y acciones locales para su conservación en el Parque Nacional de Lagos de Montebello y su zona de influencia, Chiapas, México. *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.*, 12, 238–245.
- Mayo, A., Cázares, J., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. In *Colección José N. Rovirosa, Biodiversidad, Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Mayo-Mosqueda, A., Maceda-López, L. F., Andrade-Canto, S. B., Noguera-Savelli, E., Caamal-Velázquez, H., Cano-Sosa, J. del 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. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.030>
- McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de orquídeas. In *Ceiba Foundation for Tropical Conservation*.
- Melo, O., López, L., & Melo, S. (2020). *Diseño de Experimentos. Métodos y Aplicaciones* (2da. ed.). Universidad Nacional de Colombia.
- Mendoza, I. E. (2016). Eficiencia de los medios nutritivos basales: sólido y líquido en la etapa de establecimiento in vitro de la orquídea “Tripita” *Trichopilia tortilis* Lindl. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 5, 43–57. <https://doi.org/10.5377/payds.v5i0.5429>
- Nava, J. J. (2010). *Propagación in vitro y establecimiento en invernadero de las orquídeas Trichocentrum carthagenense (Jacq.) Sw y Laelia eyermaniana Rchb. f. para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable* [Instituto Politécnico Nacional Secretaría de Investigación y Posgrado].
- Nelson, H. V., Gansau, J. A., Mus, A. A., Mohammad, N. N., Shamsudin, N. A., Amin, J., & Rusdi, N. A. (2023). Developing *Paraphalaenopsis labukensis* (Shim, A. Lamb & C.L. Chan), an Orchid Endemic to Sabah, Borneo, Asymbiotic Seed Germination and In Vitro Seedling Development. *Horticulturae*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060681>

- Otero, J., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270–276.
- Pereira, G., Albornoz, V., Romero, C., Lara, S., Sánchez-Olate, M., Rios, D., & Atala, C. (2017). Germinación asimbiótica en tres especies de *Chloraea* (Orchidaceae) de Chile. *Gayana. Botánica*, 74(1), 131–139. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432017005000107>
- Pérez-Martínez, B. A., & Castañeda-Garzón, S. L. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Bioteología Vegetal*, 16(3), 143–151.
- Pujasatria, G. C., Miura, C., & Kaminaka, H. (2020). In vitro symbiotic germination: A revitalized heuristic approach for orchid species conservation. In *Plants* (Vol. 9, Issue 12, pp. 1–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants9121742>
- Salgado, J. M., & Peñaranda, L. V. (2019). Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción in-vitro de orquídeas. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 17–28. <https://doi.org/10.23850/24220582.1815>
- Samala, S., & Thipwong, J. (2023). Influences of Organic Additives on Asymbiotic Seed Germination of *Dendrobium cruentum* Rchb. f. for In Vitro Micropropagation. *Trends in Sciences*, 20(3), 1–11. <https://doi.org/10.48048/tis.2023.4181>
- Tian, F., Wang, J. C., Bai, X. X., Yang, Y. B., Huang, L., & Liao, X. F. (2023). Symbiotic seed germination and seedling growth of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum hirsutissimum* (Lindl. ex Hook.) Stein from China. *Plant Signaling and Behavior*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2293405>
- Trujillo, D. (2022). Las orquídeas en el mundo vegetal de los Andes peruanos: Una revisión y actualización taxonómica. *Revista Peruana de Biología*, 29(3), 1–44. <https://doi.org/10.15381/rpb.v29i3.22929>
- Vargas, B., Corredor-Prado, J. P., Pescador, R., Montoya-Serrano, F. S., Vesco, L. L. D., & Suzuki, R. M. (2023). Morpho-anatomy of in vitro germination and cryopreservation of the orchid *Cattleya crispata* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 71(1), 1–13. <https://doi.org/10.15517/REV.BIOL.TROP.V71I1.52338>
- Vasupen, E., Bundithya, W., & Potapohn, N. (2023). Effects of Coconut Water, Benzylaminopurine, and Naphthalene Acetic Acid on Seed Germination and Rhizome Food Reserve: In Vitro Culture of *Eulophia flava* (Lindl.) Hook. f. *Current Applied Science and Technology*, 23(3), 1–12. <https://doi.org/10.55003/cast.2022.03.23.006>
- Velázquez, V., Quijano-Avila, J., & Rodríguez-Avila, N. (2016). Análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación in vitro de orquídeas silvestres del estado de Campeche. *Revista Del Centro de Graduados e Investigación*, 31(63), 27–31.
- Vudala, S. M., & Ribas, L. L. F. (2017). Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, 108, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.008>