

Germinación *in vitro* de *Epidendrum secundum* con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco

In vitro germination of Epidendrum secundum with different gelling agents and concentrations of coconut water

Beatriz Mamani Sánchez¹, Ana Eva Muriel Mamani², Andreina Noelia Maquera Pardo² Máximo Nova Pinedo²

¹Departamento de Investigación y Proyectos - Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP). Universidad Católica Boliviana “San Pablo”.
<https://orcid.org/0000-0002-9513-6941>

²Carrera de Ingeniería Agronómica, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP) - Universidad Católica Boliviana “San Pablo”

bmamani@uac-cp.edu.bo

Resumen: Las orquídeas carecen de endospermo, es por ello que la germinación es baja, y además en condiciones naturales dependen de hongos micorrizicos para su sobrevivencia. Se tiene la alternativa de cultivarlas en condiciones *in vitro* para garantizar la germinación, debido a que le facilita condiciones químicas (medio de cultivo) y físicas para el establecimiento, para este fin los medios más empleados son Murashige y Skoog (MS), Vacin Wein (VW), Knudson C (KC), pero también, en otros trabajos emplearon medios basales de calidad baja (PA), como sales para la fertilización química de cultivos. En el presente estudio se realizó pruebas de germinación en *Epidendrum secundum* en medios alternativos con sales de cultivo hidropónico (macro y micronutrientes) suplementados con 10% y 20% de agua de coco (AC) y tipos de gelificantes (gelrite, agar y carragenina). Las semillas fueron desinfectadas con 0.5% de NaClO por 15 min. Fueron cultivados en la cámara de crecimiento a 25°C fotoperiodo de 16/8 horas luz y oscuridad, durante 105 días. Se evaluó el porcentaje de germinación, mortalidad y descripción de fases de desarrollo en la germinación. *Epidendrum secundum* presentó un 85,8% de germinación en el medio con gelrite con sales de macro y micronutrientes de hidroponía y con la adición de 20% de agua de coco. La germinación fue mejor (86,4%) con 20% de AC, que con 10% de AC que fue de (78,1%). No obstante, con la adición de carragenina, los protocormos germinados tienden a morir en un 1,8%.

Palabras claves: Orchidacea, carragenina, gelrite, agar y agua de coco

Abstract: Orchids lack endosperm, which is why germination is low, and under natural conditions, they depend on mycorrhizal fungi for their survival. There is the alternative of cultivating them *in vitro* conditions to guarantee germination,

because it facilitates chemical (culture medium) and physical conditions for the establishment, for this purpose the most used media are Murashige and Skoog (MS), Vacin Wein (VW), Knudson C (KC), but also, in other works, low-quality basal media (PA) were used, such as salts for chemical fertilization of crops. In the present study, germination tests were carried out on *Epidendrum secundum* in alternative media with hydroponic culture salts (macro and micronutrients) supplemented with 10% and 20% coconut water (AC) and types of gelling agents (gelrite, agar and carrageenan). . The seeds disinfected with 0.5% NaClO for 15 min. They were cultivated in the growth chamber at 25°C with a photoperiod of 16/8 hours of light and darkness, for 105 days. The percentage of germination, mortality and description of development phases in germination evaluated. *Epidendrum secundum* presented 85.8% germination in the gelrite medium with macro and micronutrient salts from hydroponics and with the addition of 20% coconut water. Germination was better (86.4%) with 20% CA, than with 10% CA, which was (78.1%). However, with the addition of carrageenan, germinated protocorms tend to die by 1.8%.

Key words: Orchidaceae, carrageenan, gelrite, agar and coconut water

1 Introducción

La familia de las orquídeas es el grupo más diverso y extenso de plantas con flor que existe sobre el planeta. La diversidad en tamaño, forma y colores, especialmente de sus flores, las convierte en un atractivo como plantas ornamentales, aunque también se han utilizado como comestibles, aromatizantes y medicinales. El gran valor comercial que poseen ciertas especies de orquídeas ha provocado el saqueo indiscriminado de individuos silvestres, y la falta de conocimientos en el cultivo de estas plantas provoca grandes pérdidas de material valioso, con la consecuente erosión genética (Alvarado, 2000).

La familia Orchidaceae con 1.500 especies registradas hasta el año 2003, es el grupo de plantas más diverso del país y representa el 10% de la flora boliviana. Los bosques montanos húmedos de la región de Los Yungas albergan 66% de todas las especies conocidas y por tanto se convierte en la zona más rica en orquídeas (Vásquez, Ibsch, & Gerkmann, 2003).

Entre las orquídeas, *Epidendrum secundum* Jacp, es de amplia distribución y nativa de América. Se caracteriza por ser de hábito geófito como litófito. Hierba terrestre, cespitosa, con tallos 40 - 90 cm y con hojas rígidas coriáceas. Inflorescencia en racimos terminales. Flores de diversos colores, sépalos laterales similares en largo que el sépalo dorsal, pero ligeramente más anchos; pétalos más angostos que los sépalos, labelo profundamente 3-lobulado, lóbulos laterales fimbriados, lóbulo medio 2-lobado, fimbriado (Santa Cruz *et al.*, 2020).

Las semillas de las orquídeas son tan pequeñas que contienen poca o ninguna reserva para llevar a cabo la germinación, es decir, no presentan endospermo, por lo que en condiciones naturales se asocian con hongos que digieren la materia orgánica y transfieren los carbohidratos al embrión de la orquídea, permitiendo que se desarrolle la planta. Además, requieren polinizadores específicos para que se efectúe la fecundación. La sumatoria de estos factores hace que el número de semillas que germinan en condiciones naturales sea muy bajo en comparación con el número de semillas producido (Abdelnour & Muñoz, 1997).

En orquídeas se tienen dos vías de geminación en medios asimbiótico y simbióticos, ambas contribuyen en programas de reintroducción. En medios asimbióticos, se da a través de cultivo de tejidos, en medios específicos, las cuales proporcionan nutrientes para promover la germinación. Es así, que Lewis Knudson desarrolló el método para la germinación asimbiótica, que fue el primer procedimiento práctico para la propagación *in vitro* de cualquier planta en condiciones axénicas, demostrando así que es posible la germinación en un medio que tiene sales y azúcar (Knudson, 1991) citado en (Salazar-Mercado, 2012). Entretanto, la germinación simbiótica requiere de hongos micorrizicos principalmente con hongos basidiomicetos del grupo de Rhizoctonia (Rasmussen, 1995).

Los medios basales en orquídeas generalmente están constituidos por las sales de (Murashige y Skoog, 1962), Knudson C (1922), Vacin y Went (1949) entre otros, un agente gelificante y suplementos naturales como el agua de coco, pulpa de plátano y jugo de tomate.

Por las características de hábito de crecimiento de las orquídeas epifitas, terrestres y rupícolas sus requerimientos nutricionales son mínimos, y contrastando esto en medios de cultivo son necesarios que tengan los macroelementos (N, P, K), pudiendo contener además otros elementos como Mg, B, Zn, Fe (García y Cuevas, 2000) citado en (Rodríguez, 2013). En trabajos en cultivo *in vitro*, emplean fertilizantes comerciales como alternativa de minimizar costos. De los cuales, el kit de fertilizante, que es ampliamente usado en medios de cultivo son de hidroponía de la FAO, mismo que contiene macro y micronutrientes. De la misma forma, el uso de agentes alternativos al phytigel, agar como la carragenina, ya que el agar según (Mejía & Vitorelli, 1988) el costo representa el 80% del costo total en la preparación de medios de cultivo.

En ese sentido el presente trabajo tiene como objetivo describir el proceso ontogénico de *Epidendrum secundum* en condiciones *in vitro* y determinar el porcentaje de germinación de *Epidendrum secundum* en el medio de cultivo con sales de hidroponía con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco.

2 Materiales y métodos

Localización de la investigación. El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología en las instalaciones de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP) de Coroico, de la provincia Nor Yungas el Departamento de La Paz, Bolivia. Geográficamente se sitúa a 16° 20' 30" de latitud Sur y 67° 50' 00" de longitud Oeste a una altura de 1850 m.s.n.m. y una distancia de 90 km de La Paz a la comunidad de Carmen Pampa (Alarcón, 2008).

2.1 Colecta de cápsula de *Epidendrum secundum*

Las cápsulas de las *E. secundum* fueron colectada de la zona Puerta del Viento cercanías a la Cerro Uchumachi a 16° 20' 30" de latitud Sur y 67° 50' 00" de longitud Oeste. Esta especie se caracteriza por ser abundante con bastantes frutos por planta.



Inflorescencia

Fruto

Figura 1: Inflorescencia y fruto de *E. secundum*

2.2 Preparación de medios con sales de cultivo hidropónico

En base a las sales comerciales que se emplean soluciones nutritivas en cultivo hidropónico se procedió a preparar dos soluciones A (macronutrientes) y B (micronutrientes), ver **tabla 1**.

Tabla 1. Composición del medio basal

Solución	Nombre	Fórmula	Solubilidad g/l
A	Nitrato de Calcio	Ca(NO ₃) ₂	1.220
	Nitrato de Potasio	KNO ₃	130
	Nitrato de Magnesio	Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	279
	Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	230
B	Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .6H ₂ O	710
	Sulfato de Potasio	K ₂ SO ₄	111
	Sulfato de Manganeso	MnSO ₄	980
	Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	60
	Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	310
	Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	960
	Molibdato de Amonio	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	430

Fuente: Carrasco e Izquierdo (1996)

Para el preparado de 1 litro de medio de cultivo se añadió 5 ml de la solución A y 2 ml de la solución B. Al mismo, se adicionó agua de coco (10% y 20% dependiendo del tratamiento empleado), 20 gr de azúcar de mesa, el pH fue ajustado a 5.6 y se adicionó el agente gelificante (gelrite, agar y carragenina). Seguidamente los medios fueron autoclavados a 15 PSI a 121°C durante 15 minutos. La batería de tratamientos de los medios a emplear estaba en función a la siguiente combinación descrita en la siguiente tabla:

Tabla 2. Tratamientos resultantes de la combinación de los factores de estudio

Tratamiento	Factor A	Factor B
	Tipo de agente gelificante	Concentración de agua de coco (%)
T1	8 g/L	10
T2	Carragenina	20
T3	Agar.	10
T4	6 g/L	20
T5	Gelrite.	10
T6	2 g/L	20

2.3 Siembra en medios de cultivo

Las semillas fueron desinfectadas con 0,5% de hipoclorito de sodio durante 15 min, posteriormente se enjuago 3 veces dentro de la cámara de flujo laminar. Para la siembra las semillas, estas fueron colocadas en cajas Petri con agua destilada estéril, para formar una solución y proseguir a la siembra con una jeringa en tubos de ensayo. Seguidamente, las semillas sembradas en los medios de cultivo fueron trasladadas a la cámara de crecimiento a 25°C fotoperiodo de 16/8 horas luz y oscuridad.



Soluciones nutritivas empleadas para la preparación de medios de cultivo



Ajuste de Ph del medio de cultivo



Dispensación y vaciado de medios de cultivo en tubos de ensayo



Autoclavado de medios de cultivo



Desinfección de semillas

Siembra de las semillas en
medios de cultivo

Figura 2: Procedimiento experimental de la metodología

3 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño aplicado en la presente investigación fue diseño completamente al azar. El factor de estudio corresponde, el tipo de agente gelificante (carragenina, agar y gelrite) y la adición de agua de coco (10 y 20%) en los medios de cultivo. Resultado de la combinación de ambos factores de estudio resulta 6 tratamientos cada uno de ellos con 15 repeticiones (Calzada-Benza, 1970).

Para el análisis estadístico se realizó el análisis de varianza para determinar si existe o no una diferencia significativa entre los tratamientos en relación a las variables de respuesta (porcentaje de fases de desarrollo del proceso de germinación y porcentaje de germinación) a un nivel de 5% de error experimental. De encontrarse diferencias significativas se aplicó la prueba Duncan a un nivel de 5% de error experimental. El procedimiento estadístico se realizó en el programa estadístico INFOESTAT-L v.2008.

3.1 Variables de respuesta

Se evaluó porcentaje de individuos en 4 fases de desarrollo para la germinación en orquídeas corresponden a: Fase 0: Son semillas que no son viables, Fase I: Son semillas con embrión viables. Fase II: Son semillas que empiezan a aumentar su tamaño en forma de redondo que está apunto de germinar. Fase III: Semillas germinadas con la aparición de brote apical y protocormos. Fase IV: plántula con brote apical y protocormos desarrollados.

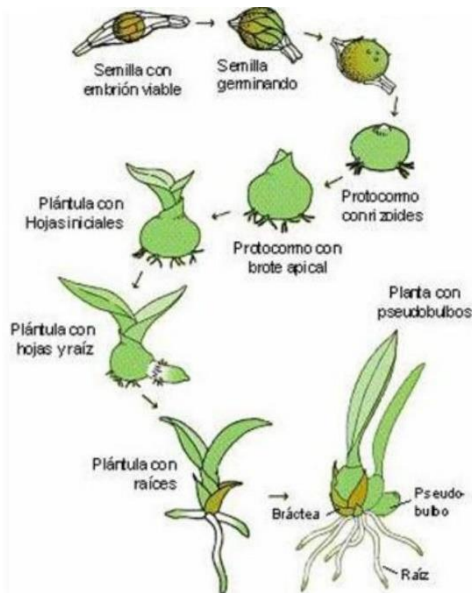


Figura 3: Esquema del proceso de germinación en orquídeas. Fuente: Seaton y Ramsay (2005)

Porcentaje de germinación para este cálculo en base a la siguiente fórmula, donde se consideró como semillas germinadas desde la fase II, III y IV.

$$\% \text{Germinación} = \frac{FII + FIII + FIV}{FO + FI + FII + FIII + FIV} * 100\%$$

Porcentaje de mortalidad se consideró en base a la siguiente fórmula el número de semillas muertas sobre el total de semillas sembradas:

$$\% \text{Mortalidad} = \frac{\text{Número de semillas muertas}}{\text{Total de semillas sembradas}} * 100\%$$

Porcentaje de semillas viables Las semillas fueron sumergidas en tetrazolium al 0.5% por 24 horas y posteriormente se evaluó las semillas que tiñeron de color rosado el embrión a las cuales se les considero semillas viables y las que no tiñeron como semillas inviables y se calculó del porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula.

$$\% \text{Viabilidad} = \frac{\text{Número de semillas teñidas}}{\text{Total de semillas}} * 100\%$$



Figura 4: Semillas colocadas en solución de tetrazolium

Las evaluaciones se realizaron con la ayuda de un estereoscopio cada 3 semanas durante 105 días.

4 Resultados y discusión

4.1 Viabilidad

La viabilidad de las semillas de *E. secundum* fue de $93,03 \pm 4,97\%$, el cual se expresó debido a que estos mostraron una tinción rojo intensa (ver **figura 5**). Las semillas viables se tiñen, debido a la reducción del tetrazolium por la actividad respiratoria de las células y en una especie del género *Epidendrum* se presentó 85,4% (Salazar & Gélvez, 2015). En cambio, en otra especie *Epidendrum dalstromii* con la prueba de tinción de tetrazolium registró un 50,80% de viabilidad de las semillas (Quishpe, 2018). No obstante, en *Epidendrum dalstrom* presentaron un 93% de viabilidad (Salazar & Gélvez, 2015). La diferencia de resultados probablemente se deba a la expresión de cada especie, esta afirmación es respaldada por los anteriores autores que señalan, que en 10 especies de orquídeas la viabilidad es diferente, varía desde 69,2% en *Elleanthus* sp a 93,8% en *Maxillaria* sp.

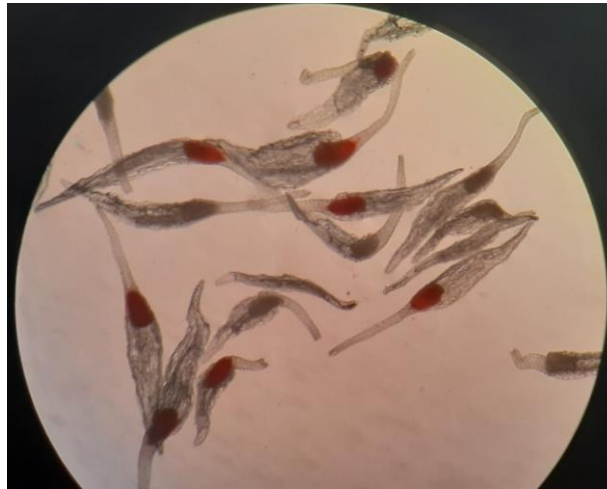


Figura 5: Semillas teñidas con tetrazolium indican que son viables y las que no muestran coloración rojiza del embrión son inviables

4.2 Descripción de fases de la germinación

A continuación, se detalla las fases por la cual se pasaron las semillas de *E. secundum* durante la germinación en condiciones *in vitro*:



Semillas sin embrión
No viable



Semillas con embrión viable



Semillas con embrión
abultado

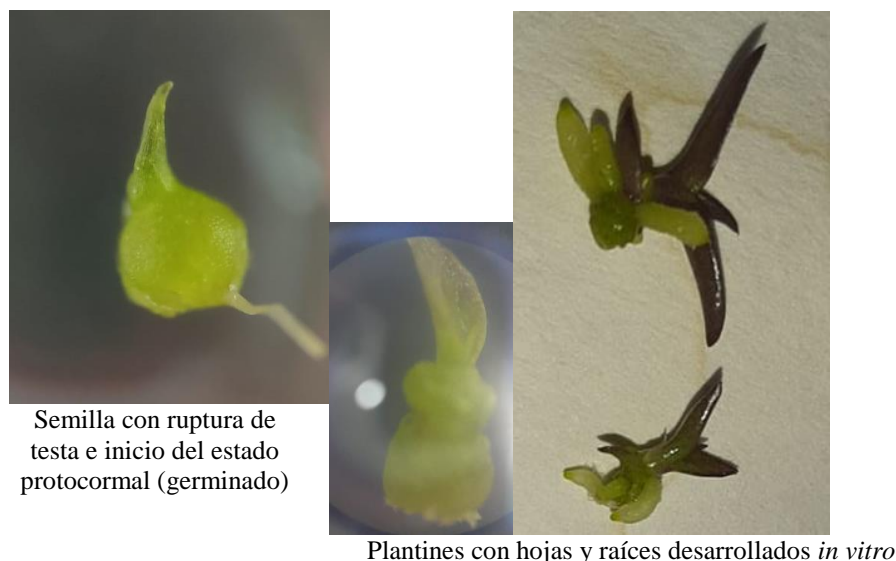


Figura 6: Esquema del proceso de germinación *E. secundum*

4.3 Porcentaje de germinación

En la **tabla 3** se denota que, al cabo de 21, 42, 63, 84 días de evaluación no presentaron diferencias significativas como efecto del agente gelificante en el medio de cultivo, sin embargo, hay diferencias significativas al cabo de 105 días. Entre tipo de agentes gelificantes, la cartagenina y el gelrite fueron estadísticamente similares en la germinación, de 82,4% y 85,8% respectivamente. Con relación a la aplicación de agua de coco presentaron diferencias significativas entre las concentraciones a lo largo de la evaluación. La adición de 20% de agua de coco favorece en el porcentaje de germinación de un 86.4%. Finalmente, no se presentaron diferencias entre la interacción de factores, que indica son independientes.

Tabla 3. Efecto de diferentes tipos de agentes gelificantes y dos niveles de concentración de agua de coco en el porcentaje de germinación de *Epidendrum secundum* cada 21 días de evaluación.

Fuente de variación	Tiempo de evaluación				
	21 días	42 días	63 días	84 días	105 días
Agente gelificante (FA)					
Agar	38,1 ^a	55,3 ^a	67,3 ^a	75,0 ^a	82,4 ^{ab}
Gelrite	31,9 ^a	57,5 ^a	69,7 ^a	78,7 ^a	85,8 ^a
Carragenina	29,3 ^a	50,8 ^a	61,4 ^a	70,3 ^a	78,6 ^b

F cal.	2,83 NS	1,73 NS	2,65 NS	3,60 NS	4,33*
Pr > F	0,0645	0,1833	0,0763	0,0317	0,0162
Concentración de agua de coco (FB)					
AC2 (20%)	36,6 ^a	59,6 ^a	71,2 ^a	79,5 ^a	86,4 ^a
AC1 (10%)	29,6 ^b	49,4 ^b	61,1 ^b	69,8 ^b	78,1 ^b
F cal.	4,51*	8,02**	11,44**	14,40**	17,45**
Pr > F	0,0366	0,0058	0,0011	0,0003	<0,0001
FA*FB					
F cal.	1,53 NS	0,45 NS	0,31 NS	0,23 NS	0,27 NS
Pr > F	0,2222	0,6385	0,7322	0,7948	0,7607
	(41,1%)	(29,8%)			
Coef. Var.	8,8%	8,0%	21,5%	16,1%	11,4%

Dónde: ^{a,b} Prueba Duncan al 5%. ** Altamente significativo (<1%). * Significativo (1%). NS no significativo.

Los agentes gelificantes son empleados como medio de soporte, y tienen algunos componentes orgánicos que pueden estimular o inhibir el crecimiento de los brotes en cultivo *in vitro*, y se parte de los componentes del medio de cultivo y proporciona sostén al explante McLachan (1985) citado por (Babbar & Jain, 1998). De los resultados encontrados en la germinación de *E. secundum*, la carragenina no favoreció en la germinación, esto probablemente se deba, a que es un producto empleado en la industria alimentaria, es un gel de color opaco, con mucha celulosa y fibra, bajo grado de pureza (semi refinada), que tiene alto grado de impureza en relación a gelrite y el agar (Porto, 2003), En un estudio realizado en una especie cactácea con agar, gelrite reporta 98% y 97,7% de germinación (Lopez & Lopez, 2016). Con ello se constata que estos dos agentes gelificantes no influyen de forma negativa en la germinación en condiciones *in vitro*.

Con relación a los costos, de cada agente gelificante para 1 L de medio de cultivo con agar se invierte Bs. 9,6; gelrite Bs. 7 y garragenina Bs. 1,6, de las cuales, la carragenina es la más económica. Al respecto, (Mamani, 2009) menciona, que el agar o phytigel puede representar hasta 70% del costo de las plantas y desde un punto de vista de ganancias la carragenina podría ser interesante para reducir los costos producción.

Por otra parte, en cuanto al porcentaje de germinación en *E. secundum* fue de 85,8%, y es similar al trabajo realizado por (Sarbi & Guzman, 2007) con 10% de agua de coco fue al 100% y con la adición de pulpa de plátano fue 86,37% ambos en el

medio MS. En otra especie de *Epidendrum barbaricum* indican que el porcentaje de germinación es de 93% en el medio MS (Salazar *et al.*, 2019).

El líquido de la semilla de coco se ha usado en varias especies establecidas *in vitro*, incluyendo las orquídeas, ya que contiene vitaminas, enzimas, azúcares, fuentes nitrogenadas, reguladores de crecimiento y una fracción de sales inorgánicas (Hicks, 2007) citado en (Bertolini *et al.*, 2015). Al respecto se tienen reportados en germinación de orquídeas con el endospermo líquido de coco.

Según Bertolini *et al.*, (2013) menciona, que con la aplicación de 260 ml/1000 ml de agua de coco en *Rhynchostele bictoniensis* mejora la germinación en un 97% que sin este aditamento la germinación reporto 83%. En el presente estudio con *E. secundum*, el mayor porcentaje de germinación fue con 20% agua de coco que con 10%, esto probablemente se deba a una duplicidad de este aditamento sea más favorable, ya demás puede deberse a que las sales medio de hidroponía, su calidad es baja en relación a los medios comerciales que emplean en cultivo de tejidos vegetales, como Murashige y Skoog, Knudson C entre otros.

En cuanto a la mortalidad de los protocormos en el medio con carragenina, agar y carragenina fue de 1,8%; 0,8% y 0% respectivamente.

5 Conclusiones

Epidendrum secundum presentó un 85,8% de germinación en el medio gelrite al cabo de 105 días de evaluación en el medio de cultivo con sales de hidroponía con la adición de 20% de agua de coco. No obstante, con la adición de carragenina los protocormos germinados tienden a morir en un 1,8%.

Referencias bibliográficas

- [1] Abdelnour, A., & Muñoz, A. (1997). Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
- [2] Alarcón, E. (2008). Biodiversidad de insectos de las familias Syrphidae y Carabidae entre nichos ecológicos (Bosque. Borde del bosque y Área de cultivo) en tres comunidades del municipio de Coroico Nor Yungas. Universidad Católica Boliviana Unidad Académica Campesina de Carmen Pampa, Coroico, Bolivia.
- [3] Alvarado, C. (2000). Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices. Universidad de Costa Rica, Cartago.

- [4] Babbar, S., & Jain, N. (1998). Isubgol as an alternative gelling agent in plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*, 318-322. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/621/62146619008/html/>
- [5] Bertolini, V., Damon, A., & Rojas, A.R. (2015). Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). DOI: 10.15446/acag.v63n3.42735
- [6] Bertolini, V., Damon, A., & Valle, J. (2013). Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rhyncho스테le biconiense* (Bateman) Soto Arenas & Salazar, en medio de cultivo Knudson C. Lankesteriana.
- [7] Calzada-Benza. (1970). *Métodos estadísticos para la investigación*. Lima, Perú: Jurídica.
- [8] Carrasco, G.; Izquierdo, J.; (1996) FAO, Santiago (Chile). Oficina Regional para America Latina y el Caribe Universidad de Talca. Obtenido de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2009438019>
- [9] Gilsanz, J. (2007). *Hidroponía*. Montevideo: Unidad de comunicación y transferencia de tecnología. Obtenido de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/520/1/11788121007155745.pdf>
- [10] Lopez, A., & Lopez, M. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plantulas de *Echinocactus platyacanthus* link et otto (cactacea). *POLIBOTANICA*, 153-166, . doi:10.18387/polibotanica.42.8
- [11] Mamani, M. (2009). *Evaluación de la carragenina, en la propagación in vitro de tres especies vegetales de importancia comercial papa, crisnatemo y piña*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.
- [12] Mejia, Y., & Vitorelli, C. (1988). *Cultivo in vitro de plantas de papa*. Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agraria.
- [13] Quishpe, C. (2018). *Evaluación del efecto de cinco hongos aislados endófitos de raíces de Pleurothallis coriacardia en la germinación de Epidendrum dalstromii*. UNIVERSIDAD DE CUENCA, Cuenca. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/288580227.pdf>
- [14] Rasmussen, H. (1995). *Terrestrial orchids: From seeds to mycotrophic plants*. University Press, 444.

- [15] Rodríguez, A. (2013). Inducción de la germinación in vitro de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- [16] Salazar, S.; & Gélvez, JD. (2015). Determining the Viability of Orchid seeds using the Tetrazolio. *Revista de Ciencias*, Volumen 19(No. 2). Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcien/v19n2/v19n2a04.pdf>
- [17] Salazar, S., Botello, E., & Quintero, J. (2019). Pre-treatments effect on the tetrazolium test on *Epidendrum barbaricum* Hágsater & Dodson seeds. *Acta Agronómica*. doi:doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v68n4.79619>
- [18] Salazar-Mercado, S. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *ACTA AGRONÓMICA*, 69-78. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v61n1/v61n1a09.pdf>
- [19] Santa Cruz, L., Choce, P., Vega, N., Rodriguez, E., & Cruz, C. (2020). Flora orquideológica del distrito Pulán. *Arnaldoa*, 1-56. doi:10.22497/arnaldoa.271.27102
- [20] Sarbi, L., & Guzman, S. (2007). Analisis de la variacion de la tasa de germinación y crecimiento de las orquideas *Epidendrum secundum* y *Oncidium excavatum* a traves de medios de cultivo convencionales combinados con naturales. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador.
- [21] Seaton, P. & Ramsay, M. (2005). Growing orchids from seeds. Royal Botanical Garden, Kew. London, England.
- [22] Vásquez, R., Ibisch, P. L., & Gerkmann, B. (2003). Diversity of Bolivian Orchidacea. *Diversity of Bolivian Orchidacea*.