

**Polibotánica**

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

COMPUESTOS ORGÁNICOS EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Epidendrum falcatum* Lindl. ORQUÍDEA ENDÉMICA DE MÉXICO

ORGANICS COMPOUNDS IN THE *in vitro* PROPAGATION OF THE MEXICAN ENDEMIC ORCHID *Epidendrum falcatum* Lindl.

Santiago-Jerónimo, T.; V.M. Chávez-Ávila; S. Carballar-Hernández y R. González-Cubas

COMPUESTOS ORGÁNICOS EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Epidendrum falcatum* Lindl. ORQUÍDEA ENDÉMICA DE MÉXICO

ORGANICS COMPOUNDS IN THE *in vitro* PROPAGATION OF THE MEXICAN ENDEMIC ORCHID *Epidendrum falcatum* Lindl.



Instituto Politécnico Nacional

Núm. 57: 157-170 México. Enero 2024

DOI: 10.18387/polibotanica.57.9



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0

Atribución-No Comercial ([CC BY-NC 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).

Compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Epidendrum falcatum* Lindl. orquídea endémica de México

Organics compounds in the *in vitro* propagation of the Mexican endemic orchid *Epidendrum falcatum* Lindl.

Santiago-Jerónimo, T.;
V.M. Chávez-Ávila;
S. Carballar-Hernández
y R. González-Cubas

COMPUESTOS ORGÁNICOS
EN LA PROPAGACIÓN *in vitro*
DE *Epidendrum falcatum*
Lindl. ORQUÍDEA ENDÉMICA
DE MÉXICO

ORGANICS COMPOUNDS
IN THE *in vitro*
PROPAGATION OF THE
MEXICAN ENDEMIC
ORCHID *Epidendrum falcatum*
Lindl.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 57: 157-170. Enero 2024

DOI:
10.18387/polibotanica.57.9

Tomasita Santiago-Jerónimo

<https://orcid.org/0000-0001-7955-2569>

Tecnológico Nacional de México, Campus San Miguel el Grande,
Carretera a la comunidad de Morelos s/n, San Miguel el Grande,
Tlaxiaco, C. P. 71140, Oaxaca, México

Víctor Manuel Chávez-Ávila

<https://orcid.org/0000-0002-3529-6679>

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, s/n,
Ciudad Universitaria, C. P. 04510 Ciudad de México, México

Santos Carballar-Hernández

<https://orcid.org/0000-0001-8343-2797>

Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCEMICH),
Sahuayo 59103, México

Rigoberto González-Cubas / rigocubas_11@hotmail.com

<http://orcid.org/0000-0001-9035-9874>

Tecnológico Nacional de México, Campus San Miguel el Grande, Carretera a la
comunidad de Morelos s/n, San Miguel el Grande, Tlaxiaco, C. P. 71140,
Oaxaca, México

RESUMEN: *Epidendrum falcatum* Lindl. es una orquídea endémica de México, con una distribución discontinua en poblaciones silvestres que crecen sobre rocas calizas. Las actividades antropogénicas y la demanda de coleccionistas han provocado una disminución en las poblaciones silvestres de esta especie. El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto de dos compuestos orgánicos sobre la propagación *in vitro* de *E. falcatum*. Semillas provenientes de una cápsula indehisciente se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) modificado a 50% de los macronutrientes y adicionado con 100, 200 y 300 mL L⁻¹ y g L⁻¹ de agua de coco o pulpa de plátano. Los compuestos orgánicos promovieron la germinación de *E. falcatum*; el mayor porcentaje de germinación se obtuvo con agua de coco a 100%. El control presentó mayor número de hojas. Sin embargo, los tratamientos que contenían plátano estimularon significativamente ($p \leq 0.05$) la diferenciación del sistema radicular y de estructuras aéreas. Este estudio representa un método biotecnológico exitoso de propagación *in vitro* para la obtención de ejemplares de *E. falcatum* y así contrarrestar la explotación de las poblaciones silvestres.

Palabras clave: Micropropagación, crecimiento, conservación, orquídeas

ABSTRACT: *Epidendrum falcatum* Lindl. is an endemic orchid of Mexico, with a discontinuous distribution in wild populations growing on limestone rocks. Anthropogenic activities and the demand of collectors have caused a decrease in the wild populations of this species. The objective of this work was to know the effect of two organic compounds on the *in vitro* propagation of *E. falcatum*. Seeds from an indehiscent capsule were grown on Murashige and Skoog (MS) medium modified to 50% of macronutrients and added with 100, 200 and 300 mL L⁻¹ and g L⁻¹ of coconut

water or banana pulp. The organic compounds promoted germination of *E. falcatum*; the highest germination percentage was obtained with 100% coconut water. The control presented a greater number of leaves. However, treatments containing plantain significantly ($p \leq 0.01$) stimulated the differentiation of the root system and aerial structures. This study represents a successful biotechnological method of *in vitro* propagation to obtain specimens of *E. falcatum* and thus counteract the exploitation of wild populations.

Key words: orchid, growth, conservation, micropropagation

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25 000 especies descritas a nivel mundial. En México, se han registrado 1300 especies (6% del total mundial), de las cuales, el 40% son endémicas, la distribución de las orquídeas es amplia, pero son más abundantes y diversas en los bosques húmedos del sur del país (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2022; Solano-Gómez *et al.* 2007). Las orquídeas tienen importancia económica y cultural, debido a que son usadas como alimento, medicamento, aromatizante y usos artesanales y ornamentales (Cox-Tamay *et al.*, 2006; Fillat-Ordóñez & Flores, 2022; Solano-Gómez *et al.* 2007). A pesar de su amplio uso, las orquídeas presentan diversos problemas de conservación a consecuencia de la destrucción y transformación de sus hábitats, el tráfico ilegal de las especies, la depredación de ejemplares y el crecimiento urbano (Ávila-Díaz & Salgado-Garciglia, 2006; Espejo-Cruz *et al.*, 2023). Las orquídeas pueden propagarse de manera sexual y vegetativa. Estas producen gran cantidad de semillas, pero solo entre el 0.2 y 0.3% germina en la naturaleza, debido principalmente a la ausencia de endospermo (Arditti, 2010; Islam *et al.*, 2011). Además, la propagación vegetativa suele ser difícil, lenta e ineficiente (Islam *et al.*, 2011; Wida-Utami *et al.*, 2017). Debido a la alta demanda de estas especies, es de vital importancia implementar estrategias para la conservación *in situ* y *ex situ* de las orquídeas, a través de una propagación rápida y eficiente de las especies.

Las técnicas de cultivo *in vitro* son una herramienta de gran utilidad para el estudio, conservación, y propagación rápida y masiva de especies vegetales (Yam & Arditti, 2009) permite producir de manera continua gran cantidad de ejemplares de calidad, con lo que se contribuye a reducir el daño ocasionado por el saqueo de las especies de sus hábitats naturales (Ávila-Díaz & Salgado-Garciglia, 2006; Flores-Hernández *et al.*, 2007; Yam & Arditti, 2009). Diferentes estudios se han enfocado en definir los medios de cultivo más adecuados para la propagación de orquídeas (Damon *et al.*, 2004; Aktar *et al.*, 2008; Ruíz, *et al.*, 2008). Asimismo, se han utilizado varios compuestos orgánicos para suplementar estos medios, tales como, extracto de papa, agua de coco, peptona, homogenizado y pulpa de plátano, arroz integral, jugo de naranja, jugo de tomate, entre otros (Kaewkhiew & Kaewduangta, 2010; Sandoval *et al.*, 2014; David *et al.*, 2015; Teixeira da Silva *et al.*, 2015; Wida-Utami *et al.*, 2017) los cuales han demostrado, en muchos casos, promover el desarrollo y crecimiento de hojas y raíces, estimular la germinación de semillas y formación de brotes, gracias a su composición química (Kaur & Bhutani, 2012; Sandoval *et al.*, 2014; Wida-Utami *et al.*, 2017). Según Yong *et al.*, (2009) el agua de coco contiene reguladores de crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas, ácido salicílico, ácido abscísico, ácido ascórbico, ácido glutámico, ácido aspártico, azúcares, lípidos, sodio, potasio, magnesio, calcio, fósforo, cloruro, hierro, riboflavina, niacina, alanina, treonina, serina, sirosina, isoleucina, leucina, glicina, fenilalanina, histidina (Ovalles *et al.*, 2002; Costa, *et al.*, 2015; Robles-Ozuna *et al.*, 2021). Por su parte la pulpa de plátano es una excelente fuente de potasio, vitaminas; A, B6, C y D. En estado inmaduro, el plátano posee una alta concentración de almidón (70%) en comparación de la fruta en estado maduro. También contiene carbohidratos, proteínas, fósforo, calcio, manganeso, magnesio y cobre (Rinjha, *et al.*, 2022). Dichos compuestos presentes en el agua de coco y plátano regulan y promueven diferentes procesos dentro de la planta.

Aunque se ha generado mucha información sobre la propagación de orquídeas terrestres raras y en peligro de extinción, se sabe poco sobre la propagación de la gran mayoría de las orquídeas epífitas y litófitas, como *E. falcatum* (Damon, *et al.*, 2004). *E. falcatum*, es una orquídea endémica de México, distribuida en diferentes estados del país; sin embargo, a nivel local, se encuentra en poblaciones pequeñas; es una planta litófito que crece en rocas y acantilados de piedra caliza, en bosques de pino y bosques húmedos de pino-encino, en el matorral xerófilo y en bosques espinosos, en altitudes de 1000 a 2100 m snm (Hágsater, 1990). *E. falcatum*, al igual que otras orquídeas es de lento crecimiento, largo ciclo de vida y vulnerable a la destrucción de su hábitat, y poco se conoce sobre su desarrollo y crecimiento en cultivo de tejidos, que permitan la producción en masa de plantas. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue conocer el efecto del agua de coco y pulpa de plátano sobre la germinación y propagación *in vitro* de *E. falcatum*, conocimiento que permitirá definir el compuesto más apto para la propagación *in vitro* de la orquídea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio se estableció en el laboratorio del Instituto de Ciencias Ambientales de la Universidad de la Sierra Juárez, UNSIJ, SUNEI, Oaxaca, ubicada en el municipio de Ixtlán de Juárez, entre las coordenadas 17° 18' 59.37" de latitud norte y 96° 28' 58.44" de longitud oeste. Su clima es templado húmedo con abundantes lluvias en verano y estación seca en invierno; presenta un rango de temperatura anual de 10-26 °C y un rango de precipitación anual de 700 – 4 000 mm. La vegetación está constituida por bosque de pino-encino y vegetación secundaria derivada del bosque de pino-encino (Clark *et al.*, 2018).

Material biológico

Se utilizó una capsula de semillas de *E. falcatum* para la germinación, éstas provenían de una capsula indehisciente que se obtuvo de la Unidad de Manejo Ambiental “Campamento de las Flores”, ubicada en la comunidad de Santa María Jaltianguis, Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Después de cortar la capsula de la planta madre, se colocó en una bolsa de papel estraza y se conservó por 17 días en refrigeración a 5°C hasta su utilización.

El agua de coco utilizado fue extraída directamente de la fruta fresca, de aproximadamente 10 y 11 meses después de la formación del fruto, de la variedad de palma cocotera, el cual fue adquirido en el supermercado. Así mismo la pulpa de plátano se obtuvo directamente de la fruta de la variedad tabasco (*Musa cavendishii*), que fue adquirida en el supermercado, dicha fruta presentaba una madurez de 5 de acuerdo a la Escala de Von Loesecke modificado por Soto (2008) escala usada para medir maduración en frutas de plátano.

Desinfección del material biológico

La capsula se sumergió en una solución jabonosa por un minuto bajo agitación constante, se enjuagó con agua destilada y, posteriormente, en condiciones de asepsia, bajo cámara de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues con alcohol al 70% y se flameó, este proceso se repitió tres veces (Ruiz *et al.*, 2008).

Medio de cultivo

Se utilizaron las sales básicas MS (Murashige & Skoog, 1962), reduciendo al 50% de los macronutrientes y con el 100% de los micronutrientes, suplementados con agua de coco y pulpa de plátano. Este medio basal MS fue suplementado con dos compuestos orgánicos, agua de coco (100, 200 y 300 mL L⁻¹) y pulpa de plátano (100, 200 y 300 g L⁻¹). A todos los medios de cultivo se le adicionaron 30 g L⁻¹ de sacarosa y el pH fue ajustado a 5.7 con el hidróxido de sodio y ácido clorhídrico a una concentración de 1N, antes de la esterilización. Además, se les agregó 4 g L⁻¹ de Gelrite Gellan Gum (Sigma) como agente solidificante y se esterilizaron en

autoclave a 120°C y 15 libras de presión por pulgada cuadrada durante 17 minutos (Moreno & Menchaca, 2007).

Diseño experimental

Se estableció un diseño experimental completamente al azar para la germinación y desarrollo de plántulas, en dos compuestos orgánicos a diferentes concentraciones y el control con el medio basal MS modificado (Murashige & Skoog, 1962), para un total de siete tratamientos (Tabla 1). Para la fase de germinación los tratamientos tuvieron cinco repeticiones, para un total de 35 unidades experimentales. Mientras que, durante la evaluación del crecimiento de plántulas, se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

Tabla 1. Tratamientos ensayados para la propagación *in vitro* de *E. falcatum*.

Table 1. Assayed Treatments for the *in vitro* Propagation of *E. falcatum*.

Tratamiento	Descripción
1	Control MS medio basal
2	MS+ 100 mL L ⁻¹ de agua de coco
3	MS+ 200 mL L ⁻¹ de agua de coco
4	MS+ 300 mL L ⁻¹ de agua de coco
5	MS+ 100 g L ⁻¹ de pulpa de plátano
6	MS+ 200 g L ⁻¹ de pulpa de plátano
7	MS+ 300 g L ⁻¹ de pulpa de plátano

Efecto de los compuestos orgánicos sobre la germinación de *E. falcatum*

Una vez desinfectada la cápsula, se le realizó un corte longitudinal, para liberar las semillas de su interior; posteriormente, con la ayuda de una espátula esteril, se pasaron las semillas a una caja de Petri y con la misma espátula se tomó una cantidad de éstas y se dispersaron uniformemente en frascos que contenían los medios de cultivo, de los tratamientos establecidos, los cuales se mantuvieron en un fotoperiodo de 16 h luz (15 watts) y ocho h oscuridad, y se incubaron a 26 ± 2 °C (Mckendrick, 2000).

Después de 45 días de iniciado el cultivo de las semillas de *E. falcatum*, se describió el proceso morfológico de la germinación, de manera cualitativa, considerando los cambios visibles y al microscopio estereoscópico, en escalas de tiempo indefinidas, tomando como semillas germinadas aquellas cuyo embrión emergió de la cubierta seminal. El porcentaje de germinación se determinó de acuerdo con el área ocupada por las semillas germinadas en cada unidad experimental y promediada por el total de las repeticiones de cada tratamiento (Mckendrick, 2000; Ruiz *et al.*, 2008).

Efecto de los compuestos orgánicos en el crecimiento de plántulas de *E. falcatum*

En cámara de flujo laminar, bajo condiciones de asepsia, se tomaron los protocormos con unas pinzas de disección y se colocaron en una caja de Petri estéril. Solo se utilizaron como explante aquellos protocormos que presentaban un diámetro aproximado de 2 mm, primordios foliares y rizoides, los cuales fueron medidos con un vernier digital de la marca Dasqua Premium Tools. Se colocaron cinco protocormos por frasco en cada uno de los tratamientos establecidos (Tabla 1). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de un fotoperiodo de 16 h luz y ocho h oscuridad a 26 ± 2 °C.

Después de 83 días de iniciado el cultivo *in vitro*, se realizó la medición de variables. Para determinar el número de hojas y raíces, se extrajo la planta del medio de cultivo y se contabilizaron todas las hojas y raíces presentes. La longitud de la parte aérea y de la raíz, fue tomada desde la base de la planta hasta la punta de la hoja o la raíz más larga, con un vernier

digital de la marca Dasqua Premium Tools. La longitud total se obtuvo sumando la longitud de la parte aérea y la raíz.

Análisis estadístico

Previo al análisis estadístico, se evaluaron las pruebas la normalidad de la distribución de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk (1965) y gráficos por los cuantiles de una distribución normal. Resultó que las variables de germinación y desarrollo de las plántulas no presentaron una distribución normal, por lo que se optó por utilizar una comparación de medianas con la estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) con el paquete estadístico R versión 4.3.2 (R Core Team, 2023)

RESULTADOS

Efecto de los compuestos orgánicos en la germinación de *E. falcatum*

Después de realizada la siembra se documentó el proceso morfológico desde la semilla hasta la formación de protocormos, durante este proceso se observaron cambios en la coloración, pasando por diferentes tonalidades, en orden cronológico se pasó por blanco-amarillento, amarillo, verde-amarillento y verde. También se apreció una hidratación y aumento de tamaño de las semillas, así como la ruptura de la testa seminal, que dio lugar a la formación de protocormos, evidenciándose la germinación (Figura 1).

La germinación de *E. falcatum* se logró después de 35 días de iniciados los cultivos. El porcentaje de germinación en los tratamientos con compuestos orgánicos fue en promedio del 95%; el tratamiento con MS más 100 ml L⁻¹ de agua de coco presentó el mayor porcentaje. Esto demuestra que el uso de compuestos orgánicos tiene un efecto positivo y significativo ($p \leq 0.05$) sobre la germinación de las semillas de *E. falcatum*, con respecto al control (medio basal MS modificado) que solo presentó un 80% de germinación (Figura 2a).

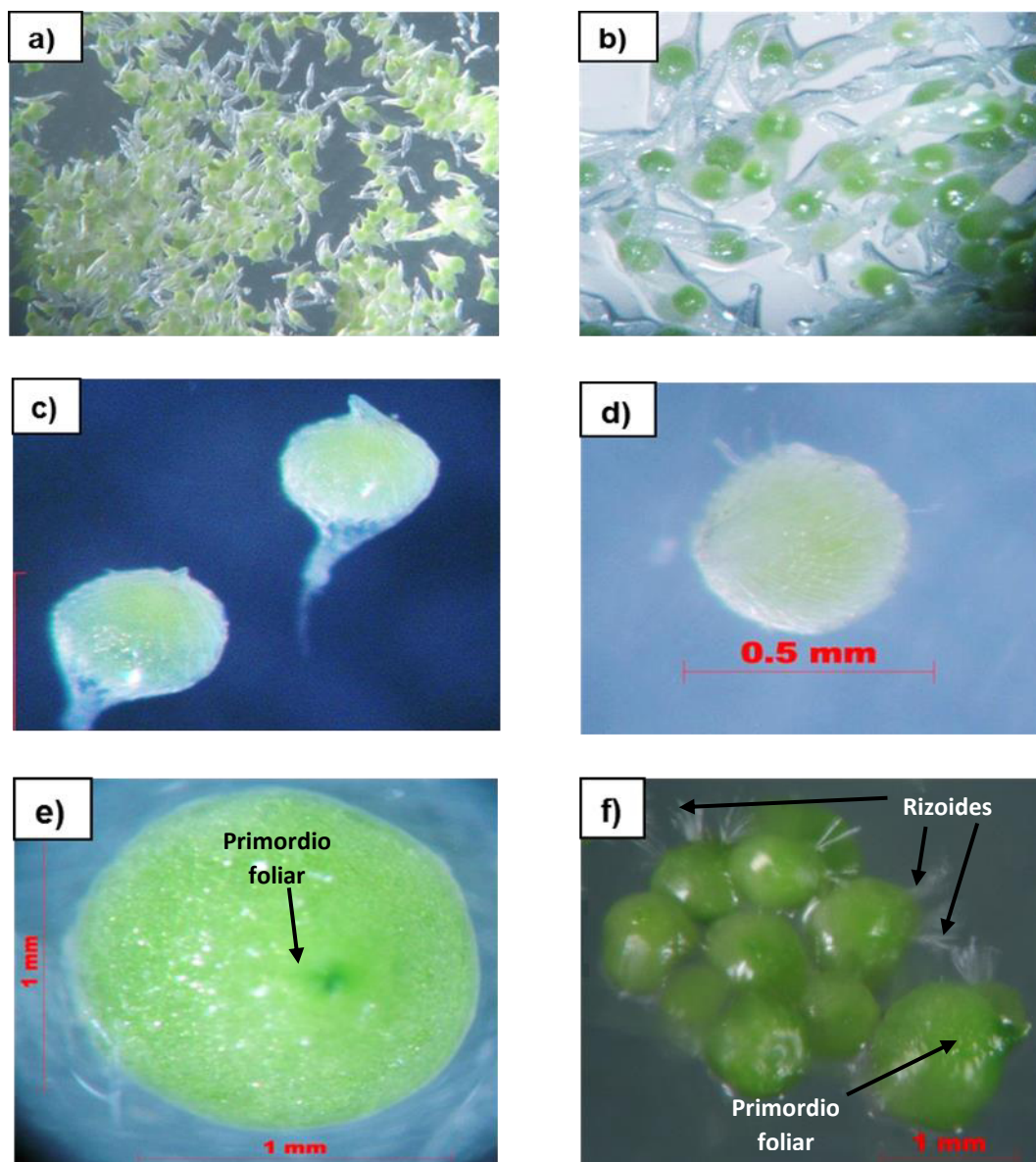


Figura 1. Proceso morfológico de la germinación de *E. falcatum*. a) Semillas hidratadas después de 20 días de iniciado el cultivo, b) Semillas a los 24 días, c) Embrión a los 30 días, d) Ruptura de la cubierta seminal a los 35 días, e) Primordio foliar a los 42 días y f) Aparición de los primeros rizoides, a 45 días de iniciado el cultivo.

Figure 1. Morphological process of the germination of *E. falcatum*. a) Hydrated seeds after 20 days of cultivation initiation, b) Seeds at 24 days, c) Embryo at 30 days, d) Rupture of the seed coat at 35 days, e) Leaf primordium at 42 days, and f) Appearance of the first rhizoids at 45 days of cultivation initiation.

Efecto de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento de *E. falcatum*

El número de hojas promedio varió de 2.2 a 4.2 y se observó que la adición de compuestos orgánicos tuvo un efecto negativo sobre esta variable. El tratamiento control presentó el mayor número de hojas, seguido por los tratamientos suplementados con pulpa de plátano, sin presentar diferencias significativas entre ellos. El tratamiento con MS más 300 ml L⁻¹ de agua de coco mostró el menor número de hojas del experimento (Figura 2b).

Todos los tratamientos que contenían MS más pulpa de plátano estimularon la formación de raíces, aunque sin diferencias significativas en relación al control ($p \leq 0.05$). En el tratamiento con MS más 200 g L⁻¹ de pulpa de plátano, se evidenció el mayor número de raíces con un promedio de 3.4; en contraste, el tratamiento con MS más 300 mL L⁻¹ de agua de coco desarrolló en promedio solo 1.6 raíces. Los tratamientos con MS más agua de coco no mostraron una respuesta favorable en el desarrollo de raíces de *E. falcatum* (Figura 2c).

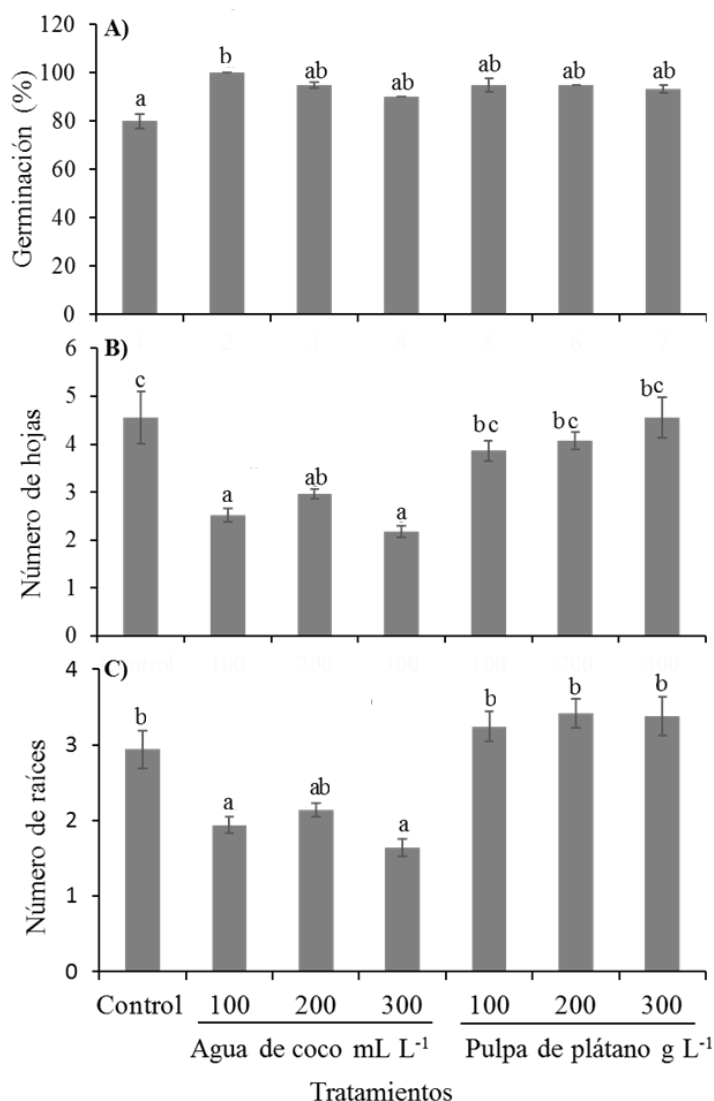


Figura 2. Efecto de compuestos orgánicos sobre; a) germinación, b) número de hojas y c) número de raíces de *E. falcatum*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $p=0.05$). Media \pm el error estándar ($n= 5, 10$).

Figure 2. Effect of organic compounds on; a) germination, b) number of leaves, and c) number of roots of *E. falcatum*. Means with the same letter are not significantly different (Duncan's test, $p=0.05$). Mean \pm standard error ($n= 5, 10$).

La longitud de las raíces varió de 1.5 a 3.2 cm y con diferencias significativas entre los tratamientos; los protocormos en los tratamientos con MS más la adición de pulpa de plátano mostraron un mayor crecimiento que los establecidos en MS suplementado con agua de coco.

Sin embargo, el tratamiento control presentó la mayor longitud de raíz con respecto a todos los tratamientos. Por lo tanto, los compuestos orgánicos no mostraron un efecto positivo sobre esta variable (Figura 3a).

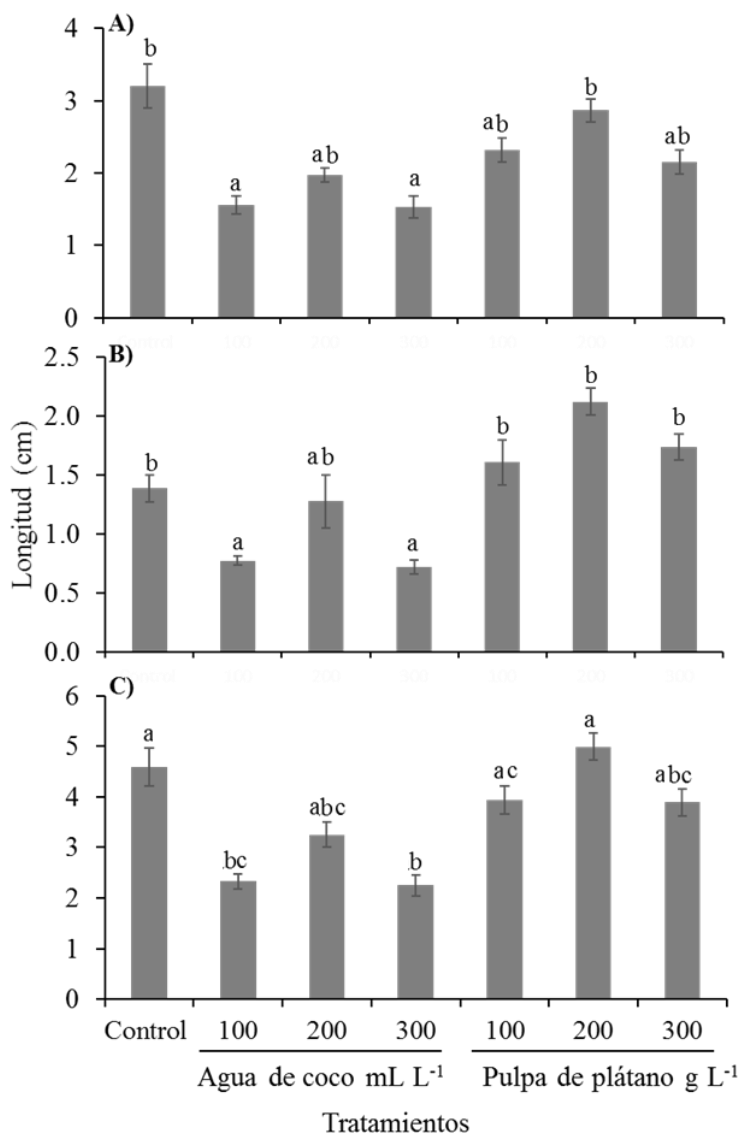


Figura 3. Efecto de compuestos orgánicos sobre la longitud de; a) raíces, b) hojas y c) total de *E. falcatum* propagada *in vitro*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $p=0.05$). Media \pm el error estándar ($n=10$).

Figure 3. Effect of organic compounds on the length of; a) roots, b) leaves, and c) total of *in vitro* propagated *E. falcatum*. Means with the same letter are not significantly different (Duncan's test, $p=0.05$). Mean \pm standard error ($n=10$).

La longitud promedio de la parte aérea varió de 0.72 a 2.1 cm, con diferencias significativas entre el compuesto orgánico y las concentraciones ($p \leq 0.05$). Los protocormos cultivados en los tratamientos con MS más la adición de pulpa de plátano presentaron, en general, un crecimiento mayor en la parte aérea, pero no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al control (Figura 3b). Por otro lado, los tratamientos con la adición de agua de coco presentaron los valores más bajos en la longitud de la parte aérea.

La longitud total de las plantas varió de 2.2 a 5.0 cm. El análisis de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre compuestos orgánicos y entre concentraciones. Las concentraciones al 10 y 30% de los dos compuestos orgánicos siempre presentaron valores más bajos con respecto a la concentración del 20%. Las plantas de los tratamientos con agua de coco fueron más pequeñas que las del control y que las establecidas en medio de cultivo con adición de pulpa de plátano. El tratamiento con MS más 200 g L⁻¹ de pulpa de plátano presentó el mayor tamaño de plantas, 4.9 cm en promedio, mientras que, las plantas en el tratamiento con MS más 300 mL L⁻¹ agua de coco tuvieron un tamaño de 2.3 cm, siendo las más pequeñas del experimento (Figura 3c).

DISCUSIÓN

El almacenamiento del fruto indehisciente de *E. falcatum* por 17 días no afectó la viabilidad de las semillas, por lo que con esta investigación se hace un aporte aproximado sobre el tiempo adecuado de almacenamiento de las semillas de esta especie, el cual aún no ha sido reportado en la literatura. Sin embargo, Ossenbach *et al.* (2007) recomiendan sembrar las semillas en el menor tiempo posible después de su colecta, principalmente cuando se desconoce el tiempo de madurez del fruto, el estado de desarrollo de las semillas (maduración) y los factores adecuados para mantenerlas por tiempo prolongado.

Efecto de los compuestos orgánicos en la germinación de *E. falcatum*

Las semillas son un explante conveniente a emplear para iniciar el cultivo *in vitro*, ya que a partir de su germinación se logra la obtención de plántulas libres de agentes patógenos y se conserva e incrementa de forma natural la variabilidad genética de las plantas.

En este estudio, se encontró un alto porcentaje de germinación en todos los tratamientos, incluyendo el control, el cual no contenía compuestos orgánicos. Esto podría deberse a que las semillas contienen la cantidad adecuada de reguladores de crecimiento endógenos para la germinación, por lo que pueden germinar en medios basales sin adición de reguladores de crecimiento (Shu-Fung *et al.*, 2004). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la germinación también está influenciada por el grado de madurez de la semilla, por lo que los resultados aquí mostrados no se pueden atribuir en su totalidad al medio de cultivo (Shu-Fung *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el porcentaje de germinación son similares a los reportados por Moreno y Menchaca (2007), quienes encontraron un 90% para *Sthanopea tigrina*. De la misma manera Mamani-Sánchez *et al.*, (2022), reportaron 98% de germinación en semillas de *Zigopetalum maculatum* al utilizar 10% de agua de coco. Y también son más altos que los encontrados por Flores-Escobar *et al.*, (2011), quienes reportan porcentajes de germinación de 48, 57 y 50% para las especies *Oncidium stramineum*, *Brassia verrucosa* y *Encyclia adenocaula*, respectivamente. Las bajas germinaciones en el cultivo *in vitro* de orquídeas de *Oncidium stramineum*, *Brassia verrucosa* y *Encyclia adenocaula* se pueden deber a factores propios de las semillas, como la baja viabilidad, embriones pequeños en relación a la testa, por lo que el volumen de la semilla puede estar ocupado por un 96% de aire y la humedad no llega al embrión (Koene *et al.*, 2020), comparado con las semillas de *E. falcatum*, que presentaron mayor viabilidad y un estado de madurez óptimo de la capsula.

Al suplementar el medio de cultivo con agua de coco y pulpa de plátano, se logró un mayor porcentaje de germinación, lo que demuestra que el uso de compuestos orgánicos en el medio de cultivo tiene un efecto positivo sobre la germinación de semillas de *E. falcatum*, siendo el tratamiento que contenía MS más 100 mL L⁻¹ de agua de coco el que presentó el mayor porcentaje de germinación (Santiago-Jerónimo *et al.*, 2015). Resultados similares fueron hallados por Salazar-Mercado (2012), quien obtuvo un porcentaje de germinación de 95.7% en *Cattleya mendelii* en el medio de cultivo MS con 200 mL L⁻¹ de agua de coco. El agua de coco ha sido utilizada en diferentes estudios, donde se ha comprobado su efecto benéfico sobre la germinación de semillas de orquídeas (Minea *et al.*, 2004; Flores-Escobar *et al.*, 2011; Kaur &

Bhutani, 2012; Chen *et al.*, 2015), debido a que contiene reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y giberelinas, involucrados en la división, diferenciación y elongación celular indispensables en este proceso (Yong *et al.*, 2009). Asimismo, está compuesto por azúcares, aminoácidos, minerales, ácidos orgánicos y vitaminas, que al estar en las concentraciones adecuadas pueden contribuir a la germinación (Yong *et al.*, 2009). Aunado a esto, se ha observado que, en algunas orquídeas, particularmente las epífitas y litófitas, el proceso de germinación puede ser afectado de manera negativa a altas concentraciones de compuestos orgánicos, ya que generalmente viven en hábitats con deficiencias de nutrientes (Damon *et al.*, 2004; Flores-Escobar *et al.*, 2008). Una de las ventajas de agregar compuestos orgánicos al medio de cultivo es su bajo costo, comparado con el de los reguladores de crecimiento vegetal de tipo comercial, como las auxinas y las citocininas, que se utilizan de manera frecuente en la germinación de orquídeas (Islam *et al.*, 2011; Kaur & Bhutani, 2012; Moreno & Menchaca, 2007). No obstante, debido a que se desconoce la composición química exacta del agua de coco, y a que la concentración de los compuestos varía de una fuente a otra por diferentes factores, el uso de estos puede generar variabilidad de los resultados en los estudios (Flores-Escobar *et al.*, 2008, 2011).

Efecto de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento de *E. falcatum*

En este estudio, los dos compuestos orgánicos usados tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.01$) sobre todas las variables de crecimiento. Flores-Escobar *et al.*, (2008) reportan que la adición de extractos orgánicos de plátano, manzana, tomate y agua de coco al medio de cultivo promovió una mayor cantidad de raíces en *Oncidium stramineum*. Sin embargo, para esta investigación los tratamientos con agua de coco mostraron un efecto negativo sobre todas las variables, observándose siempre valores más bajos que el control. Esto difiere de los resultados obtenidos por Shu-Fung *et al.*, (2004) quienes encontraron que el número de hojas y raíces fue mayor en los medio de cultivo MS 50% con agua de coco a una concentración del 8%. Sin embargo, Arias-Hernández, *et al.*, (2006) reportaron que el crecimiento de *Guarianthe skinneri* no mejoró significativamente con la adición de agua de coco y que concentraciones superiores de 300 mL L⁻¹ influían negativamente sobre la altura de las plántulas, lo cual concuerda con lo reportado en este trabajo. El efecto negativo de la adición del agua de coco sobre el crecimiento de las plántulas puede deberse a la presencia del ácido abscísico, el cual a altas concentraciones tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las plantas (Arias-Navarro *et al.*, 2023). Por lo que, esta investigación aporta un resultado importante para posteriores experimentos, en los cuales se utilicen concentraciones inferiores al 100% que puedan mejorar el crecimiento de las plántulas de *E. falcatum*.

En contraste, los tratamientos con pulpa de plátano presentaron un mayor número de raíces, longitud total y longitud aérea, con respecto al control, presentando diferencias significativas sólo en la última variable. Lo cual concuerda con lo obtenido por Minea *et al.*, (2004) quienes observaron que la adición de pulpa de plátano a 100 g L⁻¹ al medio de cultivo aumentaba el crecimiento, el número de brotes y raíces en tres especies de orquídeas del género *Spathoglottis*. Además, se ha encontrado que la pulpa de plátano incrementa casi al doble la formación de raíces y aumenta la longitud de las plántulas de *Stanhopea tigrina* (Moreno & Menchaca, 2007), así mismo, Arzate-Fernández *et al.*, (2023) reportaron resultados favorables con la utilización de compuestos orgánicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio para el cultivo *in vitro* de *E. falcatum*, es conveniente utilizar concentraciones inferiores a 300 g L⁻¹ de pulpa de plátano, para obtener plántulas con mayor número de hojas, raíces y longitud de la parte aérea, debido a que a bajas concentraciones la planta asimila mejor los compuestos presentes en la pulpa (Arias-Hernández *et al.*, 2006). Por otro lado, aunque la adición de plátano puede mejorar el crecimiento de las plántulas, la cantidad de plátano utilizado para obtener una tasa de crecimiento satisfactoria dependerá de la especie de orquídea estudiada (Minea *et al.*, 2004; Moreno & Menchaca, 2007; Flores-Escobar *et al.*, 2011; Wida-Utami & Hariyanto, 2020). En general en este estudio, ninguno de los tratamientos aplicados influyó significativamente en todas las variables en

conjunto. Por lo anterior, se debe encontrar la concentración adecuada de los compuestos orgánicos para cada especie, y la combinación correcta con los medios basales, de tal forma que no se presente un efecto negativo por la adición de compuestos orgánicos y se logre mejorar todas las variables con respecto al control.

CONCLUSIONES

El empleo de técnicas de cultivo *in vitro* resultó eficiente para promover la germinación y crecimiento de las plantas de *E. falcatum*, especialmente al utilizar bajas concentraciones de agua de coco y pulpa de plátano. Con la utilización de los compuestos orgánicos y de acuerdo con los resultados obtenidos puede deducirse que disminuye los costos de propagación de *E. falcatum*. Así mismo el establecimiento de un protocolo para el cultivo *in vitro* de *E. falcatum* contribuyó a la disminución del tiempo requerido en la reproducción *in vivo*, por lo tanto, constituye una alternativa viable para la propagación eficiente de la especie, de tal forma que se puede contribuir en la reducción de la presión que se ejerce sobre las poblaciones silvestres, contribuyendo de esta manera a su conservación y aprovechamiento sustentable.

LITERATURA CITADA

- Aktar, S., Nasiruddin, K., & Hossain, K. (2008). Effects of Different Media and Organic Additives Interaction on *In Vitro* Regeneration of *Dendrobium* Orchid. *J Agric Rural Dev*, 69-74.
- Arditti. (2010). History of orchid propagation. *AssPac J. Mol. Biol.* 171-174.
- Arias-Hernández, M., Santibáñez, S., Rincón, R., Ayora T., R., & Gutiérrez M., F. (2006). Efecto de agua de coco y homogeneizados de jitomate y plátano sobre el crecimiento de la orquídea *Guarianthe skinnerii*, cultivada *in vitro*. *Ciencia y Tecnología de la Frontera*, 23-28.
- Arias-Navarro, C., Balois-Morales, R., Jiménez-Zurita, J., Ochoa-Jiménez, V., Pérez-Ramírez, I., Berumen-Varela, G., & Bautista-Rosales, P. (2023). Frutos de Mango Partenocárpico y Estenospermocárpico: Una Revisión de Posibles Factores Causantes. *Revista Bio Ciencias*, 1-26.
- Arzate-Fernández, A., Rosas-Chávez, R., Norman-Mondragón, T., Corona-Rodríguez, M., & Piña-Escutia, J. (2023). Multiplicación *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. usando reguladores de crecimiento vegetal, aguamiel y pulque (complejos orgánicos). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 1-10.
- Ávila-Díaz, I., & Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*, 138-149.
- Chen, Y., Manage, G., Xu-Li, F., & Jiang-Yun, G. (2015). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*, 367-378.
- Clark T., R., Fuente C., M., Alonso C., C., Ramos M., M., & Aguirre H., V. (2018). *Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en la Sierra Juárez, Oaxaca*. CDMX: Fontamara S.A. de C.V.
- Costa, B., Souza, M., Soprani, C., Oliveira, G., Ogawa, M., Korres, M., . . . Romão, W. (2015). Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food Chemistry*, 139-146.
- Cox-Tamay, L., Ruiz-Cruz, Y., & Pérez-García, E. (2006). Diversidad y uso de las orquídeas. *Bioagrociencias*, 1-6.
- Damon, A., Aguilar-Guerrero, E., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 195-203.

- David, D., Jawan, R., Marbawi, H., & Gansau, J. (2015). Organic Additives Improves the *in Vitro* Growth of Native Orchid *Vanda helvola* Blume. *Not Sci Biol*, 192-197.
- Espejo-Cruz, A., Espejo-Martínez, A., Chávez-Ángeles, M., Lagunez-Rivera, L., & Solano, R. (2023). Deficiencias in compliance with environmental regulation for orchid trade via social networks in Mexico. *Botanical Sciences*, 400-416.
- Fillat-Ordóñez, N., & Flores, I. (2022). *Orquídeas de la región sur del Estado de México*. Estado de México: 1ra Ed.
- Flores-Escobar, G., Gil-Vásquez, I., Colinas-León, M., & Mata-Rosas, M. (2011). Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5-8.
- Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 347-353.
- Flores-Hernández, L., Robledo-Paz, A., & Jimarez-Montiel, M. (2007). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1315-1328.
- Gutiérrez-Rodríguez, B., Vásquez-Cruz, M., & Sosa, V. (2022). Phylogenetic endemism of the orchids of Megamexico reveals complementary areas for conservation. *Plant Diversity*, 351-359.
- Hágsater, E. (1990). Icones Orchidacearum. *Asociacion Mexicana de Orquideologia A.C.*, 30-31.
- Islam, M., Akter, M., & Prodhan, A. (2011). Effect of potato extract on *in vitro* seed germination and seedling growth of local *Vanda roxburgii* orchid. *J. Bangladesh Agril. Univ*, 211-215.
- Kaewkhiew, P., & Kaewduangta, W. (2010). Natural Additives Modification Medium: Growth of *Rhynchostylis gigantea* by Tissue Culture Technique. *Asian Journal of Plant Scientific Information*, 498-501.
- Kaur, S., & Bhutani, K. (2012). Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Hort. Sci. (Prague)*, 47-52.
- Koene, M., Amano, É., Smidt, E., & Fortes-Ribas, L. (2020). Asymbiotic germination and morphological studies of seeds of Atlantic Rainforest micro-orchids (Pleurothallidinae). *PLoS ONE*, 1-17.
- Mamani-Sánchez, B., Nova-Pinedo, M., & Espinal-Coaquira, J. (2022). 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*, 26-36.
- Mckendrich, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Quito, Ecuador.: Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Minea, M., Piluek, C., Menakanit, A., & Tantiwiwat, S. (2004). A Study on Seed Germination and Seedling Development of *Spathoglottis* Bl. Orchids. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 141-156.
- Moreno, M., & Menchaca, G. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 27-32.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised Medium for Rapid Grow and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*, 473-497.
- Ossenbach, C., Arce, J., & Warner, J. (2007). Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: II. Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. *Tierra Tropical*, 47-59.
- Ovalles, D., León, L., Vielma, R., & Medina, A. (2002). Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y Revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 50-59.
- R Core Team. (10 de Noviembre de 2023). *The R Project for Statistical Computing*. Obtenido de The R Project for Statistical Computing: <https://www.r-project.org/>

Recibido:
7/agosto/2023

Aceptado:
12/enero/2024

- Rinjha, N., Irfan, S., Nadeem, M., & Mahmood, S. (2022). A Comprehensive Review on Nutritional Value, Medicinal Uses, and Processing of Banana. *Food Reviews International*, 199-225.
- Robles-Ozuna, L., Martínez-Núñez, Y., Robles-Burgeño, M., Valenzuela-Meléndrez, M., Tortoledo-Ortiz, O., Madera-Santana, T., & Montoya-Ballesteros, L. (2021). Caracterización fisicoquímica y compuestos bioactivos en el coco (*Cocos nucifera* L.) y su aceite: Efecto del cultivar y región de cultivo. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 22-29.
- Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H., Azpíroz, R., & Moreno, M. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Revista Internacional de Botanica Experimental*, 203-215.
- Salazar-Mercado. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta botánica*, 69-78.
- Sánchez M., B., Pinedo N., M., & Espinal C., J. (2022). 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*, 26-36.
- Sandoval, P., Chiavazza, P., Faggio, A., & Contessa, C. (2014). Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*, 91-94.
- Santiago-Jerónimo, T., Carballar-Hernández, S., & Chávez-Ávila, V. (2015). Germinación y regeneración *In Vitro* de *Epidendrum falcatum* Lindl. En E. Figueroa, F. Pérez, & E. Godínez, *Ciencias de la Biología y Agronomía Hanbook T-1* (págs. 151-160). Texcoco de Mora-México: ECORFAN.
- Shu-Fung, L., Nalawade, S., Chao-Lin, K., Chung-Li, C., & Hsin-Sheng, T. (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 528-535.
- Solano-Gómez, R., Bello-López, R., & Vásquez-Martínez, A. (2007). Listado de las orquídeas de la región de Juquila, Oaxaca, México. *Naturaleza y Desarrollo*, 5-14.
- Soto, M. (2008). *Técnicas de Producción, Manejo Poscosecha y comercialización*. San José Costa Rica: Litografía e imprenta LIL.
- Teixeira da Silva, J., Tsavkelova, E., Bun, N., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J., & Rao, M. (2015). Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. *Plant Cell Rep*, 1-22.
- Wida-Utami, E., & Hariyanto, S. (2020). Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. *International Journal of Agronomy*, 1-12.
- Wida-Utami, E., Hariyanto, S., & Wulan, M. (2017). *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 406-406.
- Yam, W., & Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnol Rep*, 1-56.
- Yong, J., Liya, G., Fei, N., & Ngin, T. (2009). The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules*, 5144-5164.