



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Germinación in vitro de semillas de *Encyclia aspera* (Orchidaceae) una especie amenazada en Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Espinoza Eras, Lizbeth Alejandra

DIRECTOR: Lucero Mosquera, Hernán Patricio, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgr.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "Germinación in vitro de semillas de *Encyclia aspera* (Orchidaceae) una especie amenazada en Ecuador" realizado por Espinoza Eras Lizbeth Alejandra; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2018

f.....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Lizbeth Alejandra Espinoza Eras declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Germinación in vitro de semillas de *Encyclia aspera* (Orchidaceae) una especie amenazada en Ecuador, de la titulación Biología, siendo el Mgtr. Hernán Patricio Lucero Mosquera director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autora: Espinoza Eras Lizbeth Alejandra

Cédula: 1105612822

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo, amor incondicional y sobre todo por su esfuerzo durante estos años de estudio. Para Uds. Dedico este trabajo con todo mi cariño.

A mis hermanos a quienes amo, por su ejemplo de superación y lucha constante.

Lizbeth Alejandra Espinoza Eras

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres por nunca dejarme sola y por darme siempre fortaleza para seguir adelante a pesar de las adversidades.

A mi tutor Ing. Hernán Lucero que siempre estuvo presto a ayudarme, con esa actitud positiva que lo caracteriza. Gracias por inculcarme ese sentido de preocupación por la naturaleza y sobre todo por enseñarme con su ejemplo el valor de la ética profesional.

A mi amiga Jessica a quien aprecio y quiero mucho, por compartir sus conocimientos conmigo y por todos los momentos compartidos.

A las buenas personas que conocí en la universidad (Alli, Ricardo, Jesi) por todas las sonrisas y anécdotas que jamás olvidaré.

Lizbeth Alejandra Espinoza Eras

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	VIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Diversidad en Ecuador	6
1.2 Orquídeas en Ecuador	6
1.3 Familia Orchidaceae	7
1.4 Clasificación Taxonómica.....	7
.....	8
1.5 Generalidades de <i>Encyclia aspera</i>	8
1.6 Morfología de las orquídeas	9
1.6.1. Hojas.....	9
.....	9
1.6.2. Raíces.....	9
1.6.3. Pseudobulbos.....	10
1.6.4. Flores.....	10
1.6.5. Frutos.....	11
1.6.6. Semillas.....	11
1.7 Germinación	12
1.8 Tipos de crecimiento	13
.....	13
1.9 Ecología	13
1.10 Importancia de las orquídeas.....	14
1.11 Conservación <i>ex situ</i> de semillas	14
1.11.1. Banco de germoplasma.....	15
1.12 Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas.....	16
1.12.1. Medios de cultivo.....	16
1.12.2. Fitohormonas.....	17
1.12.2.1. Auxinas.....	17
1.12.2.2. Citoquininas.....	17
1.12.2.3. Relación auxina-citoquinina.....	17
1.13 Objetivos	18
CAPÍTULO II	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19

2.1 Área de estudio.....	20
2.2 Material vegetal.....	20
2.3 Material físico	20
2.4 Materiales químicos.....	21
2.5 Equipos.....	21
2.6 Preparación del medio de cultivo.....	22
.....	22
2.7 Desinfección de semillas.....	22
2.8 Siembra de semillas	23
2.9 Evaluación de la germinación	23
2.10 Diseño experimental	24
.....	24
2.11 Análisis estadístico	24
CAPITULO III	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1 Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en el porcentaje de germinación	26
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXOS.....	40

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

Figura 1. Tipos de hojas de orquídeas.....	9
Figura 2. Flor de orquídea: a. Partes de la flor b. Columna.....	11
Figura 3. Frutos de orquídeas.	11
Figura 4. Tipos de crecimiento de orquídeas: a. monopodial, b. simpodial.	13

TABLAS:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de orquídeas.	8
Tabla 2. Medios de cultivo utilizados	22
Tabla 3. Diseño de bloques aleatorios	24
Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA	28

RESUMEN

Encyclia aspera es una orquídea epífita que se encuentra en Colombia, Perú y Ecuador; se conoce muy poco de esta especie, la cual es sinónima de *Epidendrum asperum*. Sin embargo, al igual que la mayoría de orquídeas del país esta se encuentra amenazada por la extracción masiva de especímenes silvestres, así como por la destrucción de su hábitat. El cultivo in vitro constituye una técnica eficiente para la conservación efectiva de esta especie. En este trabajo se evaluó la germinación asimbiótica de semillas de *Encyclia aspera*, en tres medios de cultivo adicionados con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6-benciladenina (BA) (2-0.5, 1-0.5 y 0.5-0.5 mg/ L). Las semillas se obtuvieron del banco de germoplasma de la UTPL (almacenadas durante seis años), las mismas fueron desinfectadas y sembradas usando el método del sobre para después de cuatro semanas de cultivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la germinación de *Encyclia aspera*. Los resultados muestran que el tratamiento 2 (1-0.5) fue el más efectivo con un porcentaje de germinación de 52%.

PALABRAS CLAVES: ácido naftalenacético (ANA); banco de semillas; cultivo in vitro; *Encyclia aspera*; fitohormonas; germinación asimbiótica; 6-benciladenina (BA)

ABSTRACT

Encyclia aspera is an epifita orchid found in Colombia, Peru and Ecuador; Very little is known about this species, which is synonymous with *Epidendrum asperum*. However, like the majority of orchids in the country, it is threatened by the massive extraction of wild specimens, as well as the destruction of their habitat. In vitro germination is an efficient method for the effective conservation of this species. In this work it was evaluated the asymbiotic germination of *Encyclia aspera* seeds using three cultivation means with different concentrations of naftalenacetico acid (ANA) and 6-benciladenina (BA) (2-0.5, 1-0.5 and 0.5-0.5 mg / L). The seeds were obtained from the UTPL`s germplasm bank (stored for six years), they were disinfected and seeded using the packed method in order to, after four weeks, evaluate the effect of different concentrations of phytohormones on the germination of *Encyclia aspera*. The results show that treatment 2 (1-0.5) was the most effective with a germination percentage of 52%.

Key words: asymbiotic germination; *Encyclia aspera*; in vitro culture; naphthaleneacetic acid (ANA); phytohormones; seed bank; 6-benzyladenine (BA).

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae cuenta con alrededor de 35 000 especies a nivel mundial (Condemarin, Chico, & Vargas, 2007), siendo los trópicos su punto de explosión (Menchaca, 2011). Los Andes de Colombia y Ecuador son considerados los sitios más ricos en cuanto a diversidad de orquídeas se refiere ya que por lo menos un cuarto de las especies conocidas se encuentran aquí (Cribb, Kell, Dixon, & Barrett, 2003). Esta familia es considerada una de las más especializadas entre las plantas herbáceas perennes debido a su gran capacidad adaptativa y reproducción (Barnuevo, 2011). Sin embargo, también se caracteriza por presentar un alto porcentaje de especies en peligro de extinción, esto como resultado de la destrucción de su hábitat, así como a la indiscriminada extracción de ejemplares silvestres (Cueva, 2014). A esto se suma el diminuto tamaño de sus semillas y las pocas reservas que contienen estas, por lo que es esencial la asociación con algún tipo de hongo compatible para que se establezca la germinación (Jaramillo, 2018).

Por lo descrito es necesario tomar medidas para la preservación de la valiosa diversidad de la familia Orchidaceae, los bancos de semillas constituyen una buena alternativa para esta problemática ya que permiten conservar el germoplasma de especies ortodoxas. La conservación *ex situ* de semillas de orquídeas que han sido almacenadas por largos periodos de tiempo requiere de un monitoreo constante para verificar su calidad y viabilidad. Determinar la viabilidad de semillas es un punto importante para conocer si una determinada semilla está viva y tiene la capacidad de germinar. Las técnicas comúnmente utilizadas para determinar el porcentaje de viabilidad son: prueba rápida de tetrazolio y la prueba de germinación (Aguirrebolaños, Benítez-flores, González-valle, Hernández-portilla, & Flores-ortiz, 2017; Lee-espinoza, Trompillo, Llave, Trompillo, & Llave, 2016).

Entre las pruebas de germinación está la asimbiótica bajo condiciones *in vitro* que aparece como una valiosa herramienta contra la posible extinción de las especies de orquídeas (Arditti, 2008; Arditti & Krikorian, 1996), además de que permite el análisis del estado de viabilidad de las semillas que por efecto de las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad) pudo haberse perdido. (Gonçalves, Prizão, Auxiliadora, & Gutierre, 2015; Gutiérrez, Navarrete, & Espín, 2014; Jara, 2009).

Encyclia aspera es una orquídea epífita que se encuentra en los bosques tropicales húmedos y secos de Ecuador, Colombia y Perú (Dodson & Dodson, 1980). Esta sinónima de *Epidendrum asperum* se caracteriza por su inflorescencia rojiza, aspera (Pupulin & Bogarín, 2011). No existen estudios en cuanto al crecimiento y desarrollo de esta especie en fuentes

especializadas, tampoco se han reportado estudios de germinación asimbiótica de esta especie en la literatura.

El presente trabajo tuvo como objetivo la germinación asimbiótica in vitro de semillas de *Encyclia aspera* almacenadas en el banco de germoplasma de UTPL, para que en un futuro esta especie pueda ser introducida en el orquideario de la institución, así como en su hábitat natural. La información generada es un aporte más al conocimiento de la familia Orchidaceae en nuestro país, especialmente para la conservación y manejo sostenible de *Encyclia aspera*.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Diversidad en Ecuador

Ecuador está incluido dentro de los 17 países más diversos del mundo. El Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador registra que existen 16087 especies de plantas en el país de las cuales 15 306 son nativas y 41736 de estas son endémicas. Al ser comparada esta diversidad con la de los países vecinos se puede concluir que el Ecuador es un país sumamente rico a pesar de su pequeño tamaño (Jørgensen & León-Yáñez, 1995).

Esta explosión de diversidad se debe principalmente a la existencia de diversos sistemas ecológicos que permiten el establecimiento de diferentes especies vegetales. La presencia de la Cordillera de los Andes ha dado al Ecuador una fisonomía diversa propiciando la existencia de diferentes pisos altitudinales con microclimas, una exquisita diversidad de ecosistemas y formas de vida propias de cada área (León Chuñir & Romero Jiménez, 2016; Patzelt, 1996).

1.2 Orquídeas en Ecuador

A pesar de ser un país pequeño, Ecuador alberga una gran variedad de orquídeas documentadas y muchas que aún no han sido descritas por la ciencia. Ecuador es el país con mayor registro de orquídeas a nivel mundial (Gutiérrez et al., 2014). Cuenta con cuatro de las cinco subfamilias documentadas a nivel mundial, existen 4032 especies de las cuales 1714 son endémicas (40%), constituyendo la familia más grande ya que representa el 12 % de la flora del país (Aguilar Palma, 2003; Iza, 2018), debido a la diversidad que ostenta esta familia mediante Decreto Ejecutivo No. 172 en Diciembre del 2013 el Ecuador fue declarado oficialmente como “El país de las orquídeas” (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2014).

Sin embargo, más de 80% de las orquídeas del Ecuador se encuentran amenazadas, 35 están en peligro crítico, 132 en peligro, 920 como vulnerables, 123 casi amenazadas, 13 están en preocupación menor y de al menos 62 aún no se cuenta con datos. Este escenario se magnifica ya que la mayoría de especies están fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) (León-Yáñez et al., 2012). Las amenazas principales que enfrenta esta familia son: destrucción de su hábitat y extracción indiscriminada de especies silvestres

debido a su alto valor comercial (Ávila & Salgado-Garciglia, 2006; Diengdoh, Kumaria, Tandon, & Das, 2017; Loreto, 2016; Salazar-Mercado, 2012).

1.3 Familia Orchidaceae

El nombre de esta familia hace referencia a la palabra griega “orkhis” cuyo significado es “testículos” esto por la apariencia de los tubérculos subterráneos de algunas especies terrestres, estas monocotiledóneas se distinguen por la complejidad de sus floras además de las interacciones ecológicas que realizan con agentes polinizadores y algunos hongos (micorrizas) (Celi, 2011; Ordóñez Blanco, 2016). Son consideradas omnipresentes ya que se encuentran en todos los continentes llegando a habitar inclusive algunas islas antárticas (Swarts & Dixon, 2009).

Como ya se mencionó, Orchidaceae constituye una de las familias de angiospermas más diversas a nivel mundial, se estima que cuenta con alrededor de 35000 especies con 880 géneros distribuidos en todo el mundo, siendo los trópicos su mayor punto de diversidad (Aguilar Palma, 2003). Las áreas con mayor riqueza de orquídeas son: Sudamérica, Madagascar, Sumatra y Borneo (Cribb et al., 2003). El 73% de las orquídeas del mundo tiene hábito epifito y pueden vivir desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm; en América este porcentaje se incrementa (90 %), estas habitan en ramas de árboles y obtienen recursos del aire, lluvia y desechos orgánicos y las especies terrestres constituyen el 10% restante las cuales obtienen recursos del suelo y agua (León Chuñir & Romero Jiménez, 2016; Loreto, 2016).

1.4 Clasificación Taxonómica

La familia Orchidaceae es investigada constantemente por lo que a través de los años se han presentado nuevos estudios que han permitido identificar elementos más clasificatorios. Actualmente esta familia pertenece al orden Asparagales según el sistema APG III de 2009

ver Tabla 1 (Byng & Soltis, 2009) y consta de cinco subfamilias: Epidendroideae, Orchidoideae, Vanilloideae, Cypridioideae y Apostasioideae (Palacios, 2014).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de orquídeas.

Reino	Plantae
Phyllum	Angiospermas
Clase	Liliopsida
Subclase	Lilidae
Orden:	Asparagales u Orchidales

Fuente: (Iza, 2018).

Elaboración: (Iza, 2018).

1.5 Generalidades de *Encyclia aspera*

Sinónimo de *Epidendrum asperum*, es una orquídea epífita que se encuentra en los bosques tropicales húmedos y secos de Colombia, Perú y Ecuador a elevaciones entre los 20 y 600 metros (Dodson & Dodson, 1980). Su inflorescencia aparece al finalizar el invierno y se caracteriza por ser rojiza y aspera, pudiendo ser racemosa o paniculada, presenta pseudobulbos con forma de cebolla (Pupulin, 2012; Pupulin & Bogarín, 2011).

1.6 Morfología de las orquídeas

1.6.1. Hojas.

Son simples, con márgenes enteros y no presentan espinas, generalmente son angostas y alargadas. Las epífitas se caracterizan por presentar hojas gruesas con cutícula encerrada lo que les confiere protección contra depredadores además de protegerlas de los fuertes vientos secos especialmente en los trópicos. Las especies que habitan lugares con temperaturas altas presentan hojas cilíndricas como estrategia para evitar la deshidratación (Menchaca, 2011). Ver Figura 1.

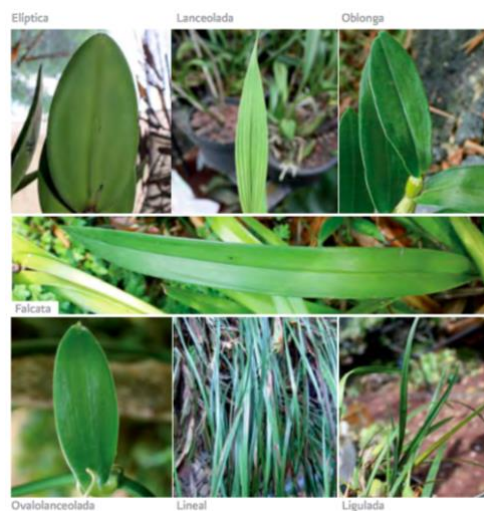


Figura 1. Tipos de hojas de orquídeas.

Fuente: (Menchaca, 2011).

Elaboración: (Menchaca, 2011).

1.6.2. Raíces.

En orquídeas terrestres, las raíces forman estructuras alargadas y muy ramificadas las cuales se encuentran recubiertas por pelillos absorbentes. Las epífitas presentan raíces envueltas por fundas de células muertas con apariencia esponjosa (velamen) lo que facilita la absorción de minerales del aire, agua de lluvia o de las ramas en donde se desarrollan. En epífitas las raíces nacen casi en cualquier parte del tallo, ramificándose en todas las direcciones, además estas poseen clorofila por lo cual son capaces de realizar fotosíntesis (Jara, 2009; Murruguía González, 2007).

1.6.3. Pseudobulbos.

Son tallos aéreos con forma de papa, presentan formas muy diversas. Las hojas pueden salir tanto de la parte alta como media de estos y la inflorescencia aparece en la base, parte media o alta del pseudobulbo (Cerna, Cárdenas, Cruz, & Jácome, 2012; Menchaca, 2011).

1.6.4. Flores.

Las flores constituyen la parte más llamativa de las orquídeas debido a su forma, aroma y gran diversidad de colores; por lo que son admiradas en todas partes del mundo (Menchaca, 2011). Además de que las flores se encuentran boca abajo (resupinación) debido a que en el desarrollo los pedicelos (donde se abren las flores) giran 180° , siendo una característica única (Ordóñez Blanco, 2016).

Generalmente son hermafroditas y constan de seis partes: tres sépalos colocados detrás e idénticos entre sí y tres pétalos en frente, dos de ellos iguales y un tercero insertado en el centro también llamado labelo y que es en donde se encuentran los órganos reproductivos (masculinos y femeninos) envueltos en una pieza central llamada columna (Figura 2). El labelo presenta diversas características para atraer a polinizadores, entre estas están: presencia de callos, aceites aromáticos, presencia de néctar (Menchaca, 2011; Sedano, Manzo, Roldán, & Castellanos, 2015).

La antera se localiza en la punta de la columna y se caracteriza por presentar una forma de casco por lo que también se denomina casquete que le sirve para proteger al polen, por debajo del casquete se localiza el estigma, parte donde se localiza el polen y se produce la formación de frutos. El polen de las orquídeas se encuentra formando polínios (paquetes) que pueden ser: polínios con cadículas o polínios con estípe y que solo algunos polinizadores son capaces de transportar el polen hacia otra flor, por lo que existen un vínculo muy importante entre estos insectos y la sobrevivencia de estas especies (Menchaca, 2011; Paredes Sandoval, 2012).



Figura 2. Flor de orquídea: a. Partes de la flor b. Columna.

Fuente: (Menchaca, 2011).

Elaboración: (Menchaca, 2011).

1.6.5. Frutos.

Son cápsulas dehiscentes y pueden ser largos, ovalados e incluso casi redondeados. Pueden presentar verrugas o ser angulosos, se componen de al menos dos carpelos; estas cápsulas pueden contener miles de semillas (Mayo, Cázares, de la Cruz, & Flores, 2010). Ver Figura 3.



Figura 3. Frutos de orquídeas.

Fuente: (Menchaca, 2011).

Elaboración: (Menchaca, 2011).

1.6.6. Semillas.

Conocidas como “semillas polvo” debido a que son diminutas (0.11 a 1.97 mm de largo y 0.07 a 0.4 mm de ancho). Las cápsulas albergan alrededor de cuatro millones de semillas y cada semilla consta de un embrión suspendido de la testa y rodeado de aire por lo que son capaces de flotar por periodos largos (Sedano et al., 2015).

El embrión no se encuentra diferenciado, presenta una forma elipsoidal y contiene reservas de proteínas y lípidos en la epidermis y parénquima, aunque no cuenta con almidón más que algunas trazas ya que las semillas están desprovistas de endospermo (fuente de nutrientes durante la germinación) además de que requieren de polinizadores específicos (Billard, Alberto, & Hugo, 2013).

En condiciones naturales la germinación se ve favorecida solamente cuando las pequeñas semillas encuentran un ambiente favorable mediante asociaciones simbióticas con micorrizas las cuales suplen de azúcares y nutrientes a las plántulas jóvenes; el pequeño tamaño de las semillas es una característica que favorece a las tasas de dispersión, sin embargo, tienen pocas posibilidades de sobrevivencia. Estos factores hacen que el número efectivo de semillas que pueden germinar se vea muy por debajo con respecto al número de semillas producido (Rodríguez et al., 2001). (Rodríguez, 2013) señala que los porcentajes de germinación en estado silvestre de las orquídeas no sobrepasa el 10 % y que de este porcentaje tan solo el 4% alcanza un estado adulto.

1.7 Germinación

La germinación de orquídeas sucede en 5 estadios secuencias; la primera etapa, comienzan con la imbibición de las semillas a través de la testa lo cual produce un aumento en el volumen del embrión; en la segunda etapa, existe división celular que ocurre en la región anterior y la cual propicia la ruptura de la testa y se produce el embrión (protocormo); en la tercera etapa, el protocormo empieza a desarrollarse y aparece rizoides en la parte inferior del protocormo; en la cuarta etapa, el protocormo sigue creciendo y se desarrolla una yema apical; finalmente, en la quinta etapa, aparecen las primeras hojas fotosintéticas y raíces (Barbery Knaudt & Morales Benavent, 2011). Según la especie llevará semanas, meses o años para que se forme una planta completa; en las especies terrestres durante estas primeras etapas es imprescindible la presencia de un hongo que le provea de alimento al protocormo enterrado (McKendrick, 2000).

1.8 Tipos de crecimiento

El crecimiento de las orquídeas puede ser monopodial o simpodial (Figura 4), el primero se refiere a aquellas orquídeas que crecen desde un determinado punto y cuyo desarrollo es anual, no presentan pseudobulbos y sus raíces suelen ser aéreas; la forma de crecimiento simpodial se caracteriza por que a partir de un brote terminal muerto aparecen nuevos brotes hacia los lados de este y siempre hay presencia de pseudobulbos (Vasquez, 2000).



Figura 4. Tipos de crecimiento de orquídeas:
a. monopodial, b. simpodial.

Fuente: (Menchaca, 2011).

Elaboración: (Menchaca, 2011).

1.9 Ecología

Las orquídeas son consideradas entre las plantas más desarrolladas y especializadas ya que son capaces de adaptarse a diversos hábitats, pudiendo vivir en suelos (terrestres), lagunas y pantanos (acuáticas), sobre troncos y ramas (epifitas), sobre piedras (litófitas), sobre materia orgánica en descomposición (saprófitas) y hasta subterráneas (Mosquera & Bayman, 2010; Smith & Read, 1997).

Algunas orquídeas ofrecen refugio a algunos animales como ranas, hormigas y pequeñas serpientes que habitan a los alrededores de sus raíces, además de que brindan alimento (néctar) a los agentes polinizadores como insectos y aves. Finalmente, algunas especies de orquídeas tienen la capacidad de fijar carbono en bajos niveles de luz y temperatura, características que otros grupos vegetales no poseen (Mendoza Abarca, 2016).

1.10 Importancia de las orquídeas

Las orquídeas son apetecidas en todo el mundo debido a su gran valor ornamental ya que no existe otra familia de plantas que presente esta variación impresionante de flores. La belleza de sus flores así como su interacción ecológica con micorrizas ha llamado la atención en el mundo turístico, científico y comercial (Klaus, 2015; Mayo et al., 2010; Salazar-Mercado, 2012).

Una de las especies más representativas de esta familia, la famosa vainilla (*Vanilla planifolia*) fue utilizada por los Aztecas para darle aroma al chocolate náhuatl (chocolate), también era utilizada en esta cultura como un poderoso afrodisíaco. En el siglo XVI los conquistadores españoles transportaron esta especie a Europa; luego fue llevada a varias regiones tropicales entre ellas Madagascar, el cual hoy en día es el primer productor de vainilla del mundo la misma que es comercializada como saborizante y aromatizante (Ossenbach, 2007).

Países como Estados Unidos, Inglaterra, Francia, Japón, China, Tailandia, Australia, Hawaii y Singapur cultivan orquídeas para ser exportadas y de esta manera abastecer el mercado de floricultura; siendo *Cattleya*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Brassia*, *Cymbidium*, *Laelia*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Encyclia*, y *Coelogyne* los géneros más utilizados para cultivos (Téllez-Velasco, 2011).

Por otro lado, las orquídeas son utilizadas en muchas comunidades por sus propiedades medicinales, tal es el caso de *Arpophyllum spicatum* utilizada para curar la disentería y *Encyclia citrina* que cura heridas infectadas. También han sido utilizadas en actos religiosos para adornar altares (Téllez-Velasco, 2011).

1.11 Conservación *ex situ* de semillas

La creciente presencia de disturbios, principalmente ocasionadas por la pérdida de hábitat y la extracción indiscriminada de especies silvestres con alto valor comercial han dado como resultado que varias orquídeas se encuentren amenazadas o en peligro de extinción (Zettler & Hofer, 1998). Frente a esto se ha propiciado el establecimiento de varias técnicas de conservación; debido a que muchos ecosistemas naturales han sido deteriorados

irreversiblemente, la conservación *in situ* resulta ser una tarea titánica e inclusive poco viable. Actualmente se han implementado diversos mecanismos para impulsar la conservación *ex situ* de este grupo amenazado entre ellas está la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* (Izquierdo Fernandez, Diamante, & McCarthy, 2013).

Las técnicas de micropropagación *in vitro* son un recurso extremadamente valioso frente a la posible extinción de algunos ejemplares silvestres ya que permiten la generación masiva de individuos en periodos relativamente cortos, además de que supone una reducción de costos debido al pequeño tamaño de las plántulas (Dalzotto & Lallana, 2013; Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

1.11.1. Banco de germoplasma.

La conservación de la biodiversidad fuera de su ambiente natural es el principal objetivo por el cual fueron creados los bancos de germoplasma, estos lugares enfocan esfuerzos especialmente a especies amenazadas o aquellas que son útiles. Debido a que la familia Orchidaceae presenta serios problemas al tener una gran proporción de especies en peligro de extinción, el almacenamiento de semillas constituye un aporte importante para su conservación (Cerna et al., 2012).

El uso de esta técnica significa una solución viable para la conservación a largo plazo de los recursos filogenéticos. En Ecuador el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuaria (INIAP) y la Universidad Nacional de Loja (UNL) cuentan con los bancos de germoplasma donde se conserva el mayor número de especies del país. El INIAP guarda 17920 muestras de semillas de las cuales 13 711 corresponden a géneros de cultivos y 4209 de muestras de especies forestales (Tapia, Zambrano, & Monteros, 2008).

Así también el banco de germoplasma de la Universidad Técnica Particular de Loja UTPL conserva semillas de más de 500 especies representativas del Sur del Ecuador dentro de las cuales se encuentra la familia Orchidaceae (López, 2015). Finalmente, el Jardín Botánico de Quito mantiene desde el 2008 el banco de germoplasma de orquídeas, cuenta con una colección *ex situ* de orquídeas nativas del Ecuador, así como la conservación *in vitro* de *Cyrtorchilum loxense*, *Masdevallia cucullata*, *Caucaea olivaceum*, *Cattleya máxima*, entre otras (Jardín Botánico de Quito, 2018).

1.12 Cultivo in vitro de orquídeas

La propagación de orquídeas en estado natural presenta grandes dificultades, por lo que la germinación in vitro resulta ser una solución a corto plazo, ya que en estado silvestre la propagación resulta después de al menos 10 años. En contraste con esto, las técnicas in vitro generan individuos propagados en meses o pocos años (Salgado Moncada, 2002).

La germinación in vitro consiste en llevar las semillas a frascos de vidrio sobre un medio de cultivo rico en vitaminas, sales minerales, sacarosa y reguladores de crecimiento propiciando un ambiente idóneo para que las semillas germinen y se desarrollen hasta formar plantas (Barbery Knaudt & Morales Benavent, 2011; Lallana et al., 2016).

Existen dos tipos de germinación in vitro: germinación simbiótica (adición de una pequeña porción de micorriza), esta técnica utiliza un medio generalmente simple que consiste básicamente en avena en polvo y extracto de levadura, sin embargo, es necesario incluir un tipo de micorriza adecuado según la especie para que no exista parasitismo; y la germinación asimbiótica (uso de un medio estándar con nutrientes) este medio suple las veces del hongo y en condiciones controladas suministra los nutrientes necesarios para que las semillas germinen fácilmente, este medio se puede modificar de acuerdo a las necesidades de cada especie (Buendía, 2017; Téllez-Velasco, 2011).

1.12.1. Medios de cultivo.

Es muy difícil conocer los requerimientos específicos de cada especie con respecto a minerales y nutriente, sin embargo, en la actualidad el medio de cultivo más utilizado para germinación asimbiótica de orquídeas es Murashige Skoog MS (Jara, 2009).

Este medio de cultivo se caracteriza por contener compuestos químicos como: Fuentes de carbono (sacarosa), macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S), micronutrientes (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co y Mo), vitaminas (tiamina, niacina, pridoxina, vitamina E, vitamina K, vitamina B12,), agente gelificante (agar) y también ha sido suplementado con carbón activado (0.1 a 5%), extracto de frutas (manzana y banana), agua de coco y jugo de piña. Adicionalmente se ha probado la efectividad de reguladores de crecimiento como ácido naftalenacético, ANA (auxina); benciladenina, BA (citoquinina) y ácido giberélico, GA3 (giberelina) que optimizan la germinación y el desarrollo de las especies vegetales (Chen, Goodale, Fan, & Gao, 2015; Jara, 2009; Paredes Sandoval, 2012; Sedano et al., 2015; Vasquez, 2000).

1.12.2. Fitohormonas.

También llamadas hormonas vegetales, intervienen en la regulación celular de los procesos de crecimiento y desarrollo de plantas; así una misma hormona es capaz de intervenir en varios procesos y esto depende de la concentración de la misma y su respuesta ocurre en un tiempo determinado. De acuerdo a la especie que se utilice como objetivo de estudio se aplicará un tipo y concentración determinada de estos reguladores de crecimiento (Aucapiña & López, 2016).

Existen cinco grupos de fitohormonas: promotores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), inhibidor de crecimiento (ácido abscísico) y etileno; cada una de ellas es específica en cuanto a su acción, pueden intervenir regulando el crecimiento, diferenciación y división celular; organogénesis, senescencia y latencia (George, Hall, & Klerk, 2008).

1.12.2.1. Auxinas.

Fue la primera hormona vegetal en ser descubierta, en 1926 a esta hormona se le atribuyó la causa por la que los coleóptilos en la avena se curvaran siguiendo la luz. Son compuestos capaces de inducir la elongación celular, tropismos, dominancia apical y el enraizamiento. Existen auxinas sintéticas como el ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (IAA) y el ácido indolbutírico (IBA); que han sido creadas para promover el enraizamiento, favorecer la floración y como herbicidas (Aucapiña & López, 2016; Gil, Contreras, & Gutierrez, 2016).

El ácido naftalenacético se utiliza en concentraciones que van desde 0.1 a 10.0 mg/L, el punto óptimo está cerca de 0.2 mg/L (Guizado, 2014).

1.12.2.2. Citoquininas.

Este grupo de hormonas tienen la característica de promover la división de células vegetales (citocinesis) (Leal, 2003). En combinación con otras hormonas, las citoquininas son capaces de favorecer las respuestas de germinación, formación de yemas y el desarrollo reproductivo, desarrollo de cloroplastos y retardan la senescencia de las hojas (Werner, Motyka, Strnad, & Schmölling, 2001).

1.12.2.3. Relación auxina-citoquinina.

Combinar niveles bajos de auxinas y altos de citoquininas induce la formación de brotes a partir de callos, la combinación de niveles altos de auxinas y citoquininas estimula la formación

de raíces, la combinación de niveles bajos de ambas hormonas produce la formación de tallos y en niveles intermedios se produce un callo indiferenciado. Sin embargo, estas combinaciones varían mucho de acuerdo al tipo de planta (Aucapiña & López, 2016). En la fase G1, la combinación de citoquininas y auxinas induce la acumulación de ciclinas, promoviendo un nuevo ciclo celular (Guizado, 2014).

1.13 Objetivos

General:

Evaluar el potencial germinativo de semillas de *Encyclia aspera* conservadas *ex situ* utilizando tres tratamientos de germinación.

Específicos:

- Analizar la influencia de reguladores de crecimiento vegetal en la germinación de semillas de *Encyclia aspera*.
- Obtener individuos sanos a partir de la germinación in vitro.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2 Material vegetal

EL material biológico (semillas) se obtuvo del banco de germoplasma de la Universidad Técnica Particular de Loja, provenientes del Vivero Municipal de la ciudad de Loja (10/01/12) y conservadas a 4 °C en envases herméticos hasta la fecha de siembra (04/07/18 y 17/07/18) (Anexo 1).

2.3 Material físico

Frascos de vidrio

Cajas Petri

Erlenmeyers

Pipetas

Pinzas

2.4 Materiales químicos

Alcohol (70%)

Hipoclorito de sodio comercial (5%)

Agua destilada

Agar

Nitrato de amonio (NH_4NO_3)

Carbón activado

Azúcar

Hidróxido de potasio (KOH) y ácido clorhídrico (HCL)

Reguladores de crecimiento ANA, AB

Hidróxido de sodio (NaOH)

2.5 Equipos

Balanza analítica

Autoclave

Cámara de flujo laminar

Potenciómetro

Plato agitador-calentador

2.6 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo fue el MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado (20g de azúcar, 6.8g de agar, 0.165g de nitrato de amonio, 2g de carbón activado, 0,20g de fertilizante). Se utilizó cuatro medios de cultivo: medio MS como control, MS suplementado con 2 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg/l de 6-benciladenina (BA), MS con 1 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BA y MS con 0.5 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BA (Tabla 2). El pH de todos los medios fue ajustado a 5.8 usando HCl o KOH antes de ser colocados en frascos de vidrio y cerrados con tapas plásticas para ser sometidos a un proceso de esterilización a 121 °C por un lapso de treinta minutos, para luego ser almacenados en un cuarto estéril (Anexo 2).

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados

Tratamiento	Combinación de reguladores de crecimiento
T0 (Control)	MS
T1	MS+ 2 ANA + 0.5 BA
T2	MS+ 1 ANA + 0.5 BA
T3	MS+ 0.5 ANA + 0.5 BA

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

2.7 Desinfección de semillas

Utilizando en método del sobre (McKendrick, 2000): se pesó 0.006 g de semillas, las cuales fueron colocadas en un sobre de papel filtro y selladas con una grapa, con la ayuda de pinzas estériles el sobre con semillas fue sumergido durante 30 segundos en alcohol al 70 % y luego en la solución esterilizante (20 ml): hipoclorito de sodio comercial al 0.5% (v/v), más una gota

de Tween 20 durante 5 minutos agitando suavemente el frasco para su esterilización (Khamchatra, Dixon, Tantiwivat, & Piapukiew, 2016) (Anexo 3).

2.8 Siembra de semillas

En la cámara de flujo laminar los sobres fueron retirados de la solución esterilizante y enjuagados haciendo por lo menos seis lavados consecutivos con agua destilada estéril, finalmente los sobres fueron abiertos cuidadosamente con el uso de tijeras y pinzas estériles y se colocó su contenido (semillas) sobre el medio de cultivo. Al finalizar la siembra, los frascos con semillas fueron sellados con parafilm, etiquetados y posteriormente trasladados al cuarto de incubación a una temperatura de 23 °C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (Anexo 4).

2.9 Evaluación de la germinación

La evaluación de germinación asimbiótica se la realizó tomando en cuenta la fecha en que fueron sembradas (día 1) y a partir de este se evaluó semanalmente, considerándose como presencia de germinación cuando el embrión presentó engrosamiento y se observó coloración verde en el tejido, el registro se llevó a cabo por observación directa mediante la determinación del área (dentro del frasco) ocupada por las semillas que iniciaron el proceso germinativo para luego determinar si existió un efecto positivo con los reguladores de crecimiento. El seguimiento del porcentaje de germinación se efectuó durante un mes.

2.10 Diseño experimental

Para el ensayo se utilizó un diseño de bloques al azar con cuatro tratamientos (medios de cultivo), 2 bloques (número de siembras por tratamiento) y 6 repeticiones (frascos) por cada bloque, dando un total de 48 frascos o unidades experimentales (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño de bloques aleatorios

Tratamiento	Siembra 1	Siembra 2
T0 (Control)	6 frascos	6 frascos
T1	6 frascos	6 frascos
T2	6 frascos	6 frascos
T3	6 frascos	6 frascos

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

2.11 Análisis estadístico

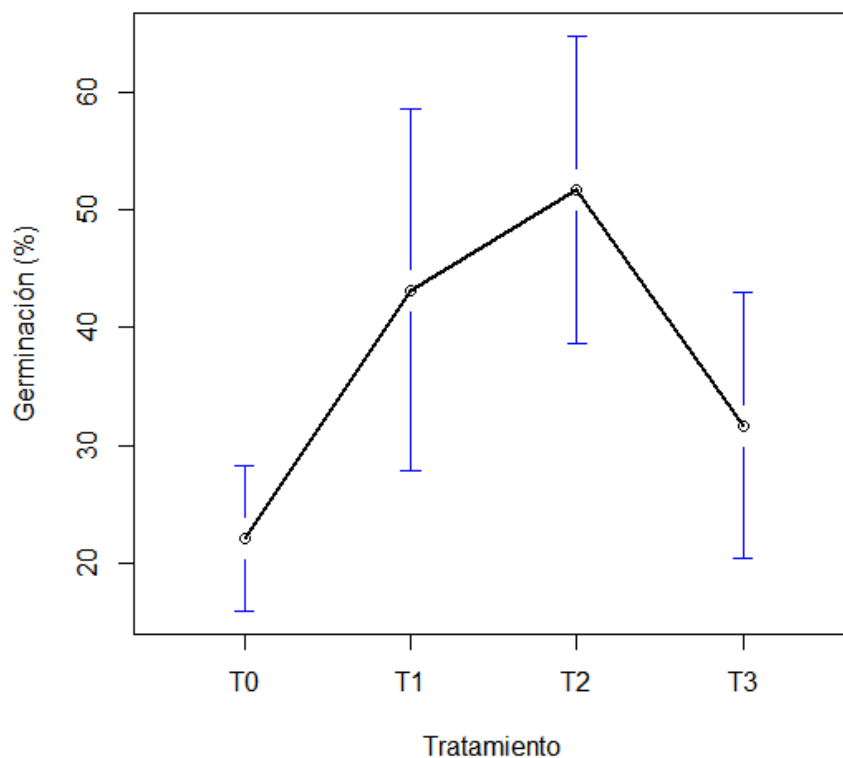
En una matriz se organizó los datos obtenidos en cada ensayo (días de inicio de la germinación, porcentaje de germinación) (Anexo 5). Para el análisis de datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente las diferencias entre las medias fueron establecidas mediante la prueba de rangos múltiples de HSD (honesto diferencia significativa) de Tukey para determinar las diferencias significativas a un nivel de $\alpha=0.05$ usando el programa estadístico RStudio Versión 1.1.419 (R Core Team, 2017).

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas viables de *Encyclia aspera* comenzaron la etapa de germinación a las dos primeras semanas de cultivo (10 días), en la siguiente semana la tasa de germinación disminuyó y finalmente en la última semana de seguimiento no se observó nuevas semillas en estado germinativo; esto se dio en todos los tratamientos, incluido el control.

3.1 Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en el porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación fue mayor en T2 (52%) que en T1 (41%) y T3 (32%), sin haber diferencias significativas entre T1 y T2. Sin embargo, existió una considerable variación entre T2 y T0 (Graficas 1).

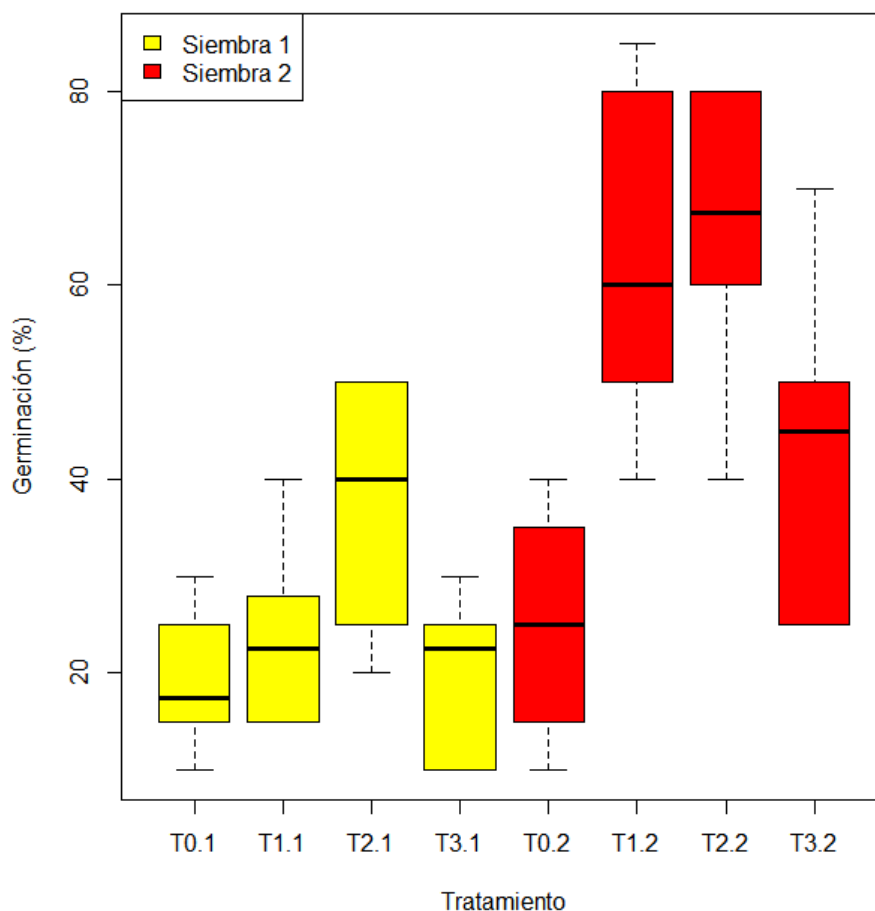


Grafica1. Media de cada uno de los tratamientos. T0= control;
T1=2-0.5; T2=1-0.5; T3=0.5-0.5

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

En las dos siembras realizadas el porcentaje más alto de germinación se obtuvo aplicando el tratamiento 2, pero se puede observar que hay una diferencia significativa en los porcentajes de germinación de la siembra 2 en comparación con la siembra 1 que muestra porcentajes menores (Gráfica 2).



Gráfica 2. Comparación de las medianas de las dos siembras realizadas

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

De acuerdo con el análisis de varianza realizado el efecto de las fitohormonas en el porcentaje de germinación mostro diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y siembras evaluadas (Tabla 4).

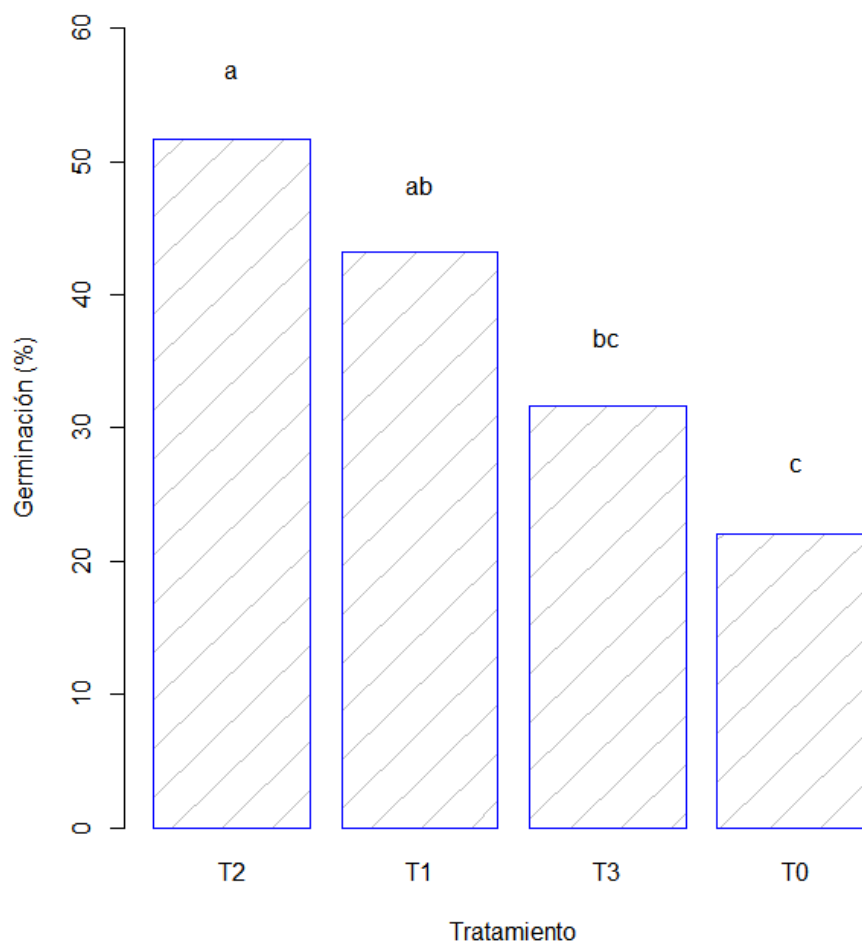
Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA

Fuente de variación	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	P value
Tratamiento	3	6048	2016	10.09	< 0.001***
Siembra	1	6936	6936	34.7	< 0.001***
Residual	43	8594	200		

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

Para encontrar las diferencias existentes entre los tratamientos se utilizó la prueba Tukey, así se encontró que el tratamiento 2 (1 ANA - 0.5 BA) es el mejor para aumentar el porcentaje de germinación de *Encyclia aspera*, seguido del tratamiento 1 (2 ANA - 0.5 BA), siendo el tratamiento 3 (0.5 ANA - 0.5 BA) el menos adecuado en ambas siembras. Sin embargo, es importante recalcar que se observó que los tratamientos T3-T0, T2-T1 y T3-T1 fueron parecidos ($p > 0.05$) y los que muestran diferencias ($p < 0.05$) son T2-T0, T1-T0 y T2-T3 (Grafica 3).



Grafica 3. Diferencias y similitudes entre los tratamientos aplicados.

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

El tiempo que tarda en germinar in vitro una orquídea varía de acuerdo a la especie, pero en general se ha reportado que inicia a los 30 y 45 días después de la siembra (Ávila & Salgado-Garciglia, 2006). En contraste con esto, en este trabajo la etapa de germinación resultó ser rápida, reportándose antes de cumplirse las primeras dos semanas de cultivo (10 días). En general el promedio de germinación en los cuatro medios de cultivo (T0, T1, T2 y T3) fue alto (37%) si se toma en cuenta el tiempo en que estuvieron almacenadas, ya que la viabilidad en muchas especies de orquídeas disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento (Vendrame, Carvalho, & Dias, 2007). No se efectuó la prueba de viabilidad rápida de tetrazolio ya que esta evalúa solamente las condiciones internas de la semilla y no toma en cuenta la calidad de estas frente a ciertas condiciones de crecimiento, capacidad de división celular ni el desarrollo por lo que no es considerada como un buen indicador de germinación. No se debe confundir viabilidad con capacidad germinativa, que las semillas resulten viables tras la prueba de tetrazolio no quiere decir que vayan a germinar, debido a esto es recomendable

validar o sustentar esta prueba mediante pruebas de germinación (Izquierdo Fernandez et al., 2013; Lauzer, Renaut, St-Arnaud, & Barabé, 2007; Muñoz & Jiménez, 2008; Vujanovic, St-Arnaud, Barabé, & Thibeault, 2000).

En un estudio realizado para *Epidendrum radicans* evaluaron cuatro concentraciones de ANA (0.0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L), en las tres primeras concentraciones hubo germinación, pero la concentración 3.0 mg/L tuvo ausencia de germinación además de que en esta última los embriones se tornaron blanquecinos (Buendía, 2017). Esto es apoyado por (Jara, 2009) que señala que el punto óptimo de ANA es de 2mg/L. Por otra parte, para esta especie la concentración 0.1 mg/L de ANA mostró en promedio el mayor porcentaje de germinación (44%) en el día 31 después de la siembra, a diferencia de esto, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la concentración más eficiente fue 1mg/L ANA con un 52% de germinación en el día 10. Esto puede deberse a que el efecto de las concentraciones de hormonas es independiente en cada cultivo y especie, y ya que para este estudio se combinó dos hormonas vegetales (auxina-citoquinina) se esperaría que la eficiencia en el porcentaje de germinación sea mayor ya que esta combinación aumenta la eficiencia de germinación y el desarrollo de la planta en condiciones in vitro (Garriga Caraballo et al., 2010).

En otro estudio realizado por (Aucapiña & López, 2016) al comparar la eficiencia de tres fitohormonas (IBA, KIM y GA3) en la germinación de *Epidendrum jamiensonis* y *Epidendrum Schistochilum* concluyeron que la adición 0.1 mg/L de AG3 eleva la tasa de germinación. También (Coello, Miceli, Orantes, Dendooven, & Gutiérrez, 2010) recomiendan el uso de GA3 como un factor importante para inducir la germinación, formación de raíces y brotes de *Guarlanthe skinneri*, pero enfatizan su uso en mínimas concentraciones ya que la adición de cantidades grandes causa un efecto contrario, evitando el desarrollo de la planta. Sin embargo, debe señalarse que el tipo de fitohormonas y las concentraciones ideales de las mismas debe ajustarse a la especie de estudio ya que estas no son estándar y por ende no producen los mismos resultados en otras especies (Aucapiña & López, 2016).

Por otra parte, también existen alternativas naturales y de bajo costo que pueden suplir las veces de fitohormonas comerciales, tal es el caso de la pulpa de banana la cual produce efectos parecidos a los producidos por auxinas (IBA o ANA) e incluso en algunos casos al compararlos, la pulpa de banana ha superado a las hormonas en el desarrollo radicular; mientras que el agua de coco muestra similitudes con las propiedades estimulantes del desarrollo de hojas y brotes de las citoquininas (BA y KIN). Esto se presenta como una alternativa conveniente frente al elevado costo de las auxinas y citoquininas (de Menezes et al., 2016).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- ✓ La germinación in vitro de semillas de *Encyclia aspera* evidentemente es una alternativa adecuada para la conservación de esta especie.
- ✓ Se demostró la viabilidad de *E. aspera*, especie que a pesar de haber sido almacenada durante un largo periodo (6 años) mostró su capacidad de germinación, la cual se obtuvo en el transcurso de pocos días (10) en todos los tratamientos.
- ✓ El medio que mostró mejores resultados en cuanto a la germinación de *E. aspera* durante el periodo de experimentación fue T2 (1-0.5 mg/L) con un porcentaje de germinación promedio de 52%, seguido del T1 (2-0.5) con 41% y finalmente el T3 (0.5-0.5) con 32 %.
- ✓ El uso de técnicas asépticas adecuadas antes, durante y después del cultivo en condiciones in vitro garantiza la ausencia de contaminación y permiten la obtención de individuos sanos.

RECOMENDACIONES

- ✓ Durante la siembra (usando el método del sobre) se dificulta la distribución homogénea de semillas dentro del frasco por lo que es idónea la utilización de pipetas con agua estéril que faciliten este proceso.
- ✓ El medio de cultivo MS más fitohormonas (ANA y BA) debe ser esterilizado por periodos no superiores a 30 min ya que estas presentan sustancias termolábiles que pueden perder sus propiedades con el aumento de temperatura.
- ✓ Usando el método del sobre es importante pesar cantidades entre 0.004 y 0.006 g de semillas ya que a pesos mayores el proceso de esterilización no es del todo efectivo ya que se forman grumos que no permiten la penetración de las sustancias esterilizantes y por otra parte evita el correcto enjuague, pesos menores no son suficientes para cubrir el área total del frasco.
- ✓ En posteriores experimentaciones con *Encyclia aspera* es importante probar con otras concentraciones e inclusive con otras hormonas de crecimiento vegetal con el fin de encontrar un protocolo óptimo para esta especie ya que no existen estudios de este tipo para *E. aspera*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Palma, S. E. (2003). Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas, 35. Retrieved from <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1960/1/IAD-2003-T001.pdf>
- Aguirre-bolaños, M., Benítez-flores, J. C., González-valle, M. R., Hernández-portilla, L. B., & Flores-ortiz, R. E. Q. C. M. (2017). Efecto del almacenamiento prolongado sobre la viabilidad y perfil de ácidos grasos en semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex .) Schltr . *Rev. Fitotec. Mex.*, 40(2), 151–160.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of Orchids* (Second Edi). Carlton, Australia: Blackwell Publishing Ltd. Retrieved from www.blackwellpublishing.com
- Arditti, J., & Krikorian, A. D. (1996). Orchid micropropagation: The path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122(3), 183–241. <https://doi.org/10.1006/bojl.1996.0059>
- Aucapiña, C., & López, P. (2016). *Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel in vitro*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12147/1/UPS-QT09895.pdf>
- Ávila, I., & Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biologicas*, 8(8), 138–149. Retrieved from <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/view/9/9>
- Barbery Knautdt, R., & Morales Benavent, I. (2011). Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquídea *Cattleya nobile* “ Flor símbolo de Concepción .” *Centro Para La Participación y El Desarrollo Humano Sostenible CEPAD – Bolivia*, 1–45.
- Barnuevo, X. A. (2011). *Estudio de Orquídeas endémicas en Loja y Zamora Chinchipe como objeto de representación artística ”*. Universidad Técnica Particular.
- Billard, C. E., Alberto, C., & Hugo, V. (2013). Germinación de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido Germination. *Investig. Agrar*, 15(1), 7–14.
- Buendía, Y. O. (2017). *Germinación in vitro de tres especies de orquídeas mexicanas para su conservación ex situ*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Byng, J. W., & Soltis, P. s. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
- Celi, R. E. P. (2011). Caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de

- seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la UTPL., 216.
- Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. (2012). Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago, Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 16(2), 5–13. <https://doi.org/10.17163.igr.n20.2014.01>
- Chen, Y., Goodale, U. M., Fan, X. L., & Gao, J. Y. (2015). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*, 3, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002>
- Coello, C. Y., Miceli, C. L., Orantes, C., Dendooven, L., & Gutiérrez, F. A. (2010). Plant growth regulators optimization for in vitro cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E.Higgins. *Gayana Bot.*, 67(1), 19–26. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432010000100003>
- Condemarín, C. E., Chico, J., & Vargas, C. (2007). Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo in vitro de yemas axilares de *Encyclia microtos* (Rchb.f.) Hoehne (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1–2), 247–254. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19513>
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., & Barrett, R. L. (2003). Orchid conservation: A global perspective. In K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett, & P. J. Cribb (Eds.), *Orchid Conservation* (pp. 1–24). Natural History Publications.
- Cueva, A. de los Á. (2014). *Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Dalzotto, C. A., & Lallana, V. H. (2013). Viabilidad, Germinación asimbiótica y vigor de tres especies de Orquídeas nativas. *Revista Científica Agropecuaria*, 17((1-2)), 39–47.
- de Menezes, L., P. S. Machado, M. de F., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M. A., & Mangolin, C. A. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo in vitro del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia (Arica)*, 34(1), 47–54. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>
- Diengdoh, R. V., Kumaria, S., Tandon, P., & Das, M. C. (2017). Asymbiotic germination and seed storage of *Paphiopedilum insigne*, an endangered lady's slipper orchid. *South African Journal of Botany*, 112, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.028>
- Dodson, C. H., & Dodson, P. M. (1980). *Encyclia aspera* (Lindl.) Schltr. Retrieved June 26, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/23509030?projectid=2>
- Garriga Caraballo, M., Gonzalez Oramas, G., Aleman Garcia, S., Abreu Cruz, E., Quiroz Bravo, K., Caligari, P. D. S., & Garcia-Gonzalez, R. (2010). Management of auxin-

- cytokinin interaction to improve micropropagation protocol of Henequen (Agave fourcroydes Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4), 545–551. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000400003>
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. De. (2008). *Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Gil, A., Contreras, D., & Gutierrez, L. (2016). Establecimiento in vitro de protocormos de Prosthechea sp . bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. *Mutis*, 6(1), 6–15.
- Gonçalves, L. D. M., Prizão, E. C., Auxiliadora, M., & Gutierre, M. (2015). Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of Hadrolaelia purpurata (= Laelia purpurata) and Acta Scientiarum Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of Hadrolaelia purpurata (=. *Acta Scientiarum*, (September 2012). <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v34i4.12333>
- Guizado, C. R. (2014). *Comparativo de tres fitohormonas en concentraciones de 25, 50 y 75 ppm en el crecimiento poblacional de Scenedesmus acutus, par uso como biodiésel*. Universidad Nacional de Ucayali.
- Gutiérrez, D., Navarrete, G., & Espín, C. G. (2014). Orquídeas de la Amazonía Ecuatoriana: maravillas escondidas en las montañas Andino - Amazónicas. *Huella Se Sumaco Revista Socio Ambiental de La Amazonía Ecuatorina*, 11, 27–30.
- Iza, M. L. (2018). *Identificación molecular de especies de orquídeas del género Dracula, mediante el sistema BARCODE*. Retrieved from <https://www.dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15043>
- Izquierdo Fernandez, J., Diamante, A., & McCarthy, M. S. (2013). Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. In F. Engelmann & M. T. González-Arno (Eds.), *Criocconservación de plantas en América Latina y el Caribe* (p. 204). Retrieved from <http://repiica.iica.int/docs/B3099E/B3099E.PDF#page=14>
- Jara, J. P. (2009). *Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de Auxinas, Citoquininas y Giberelinas en la multiplicación in vitro de Epidendrum secundum, como pauta para su conservación in vitro*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Jaramillo, J. C. (2018). *Diversidad y composición de la comunidad de hongos micorrízicos en tres poblaciones de Stelis superbiens, la especie de orquídea epífita más común en un bosque tropical del Sur de Ecuador*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Jardín Botánico de Quito. (2018). Banco Germoplasma. Retrieved April 25, 2018, from <http://jardinbotanicoquito.com/es/programas/banco-germoplasma-de-orquideas/>
- Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1995). MBG: Research: Ecuador: Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Retrieved April 21, 2018, from

- <http://www.mobot.org/mobot/research/ecuador/resultssp.shtml>
- Khamchatra, N., Dixon, K. W., Tantiwivat, S., & Piapukiew, J. (2016). Symbiotic seed germination of an endangered epiphytic slipper orchid, *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein. from Thailand. *South African Journal of Botany*, 104, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.11.012>
- Klaus, W. W. (2015). Riqueza de la familia Orchidaceae en la zona de visitantes del Parque Nacional Cerro Azul Meámbar De Honduras. *LANKESTERIANA*, 15(October), 203–210.
- Lallana, V. H., Billard, C. E., Martínez, V. A., García, L. F., Barsanti, M. V., Di Persia, J. F., ... De La Cruz, V. (2016). Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos “in vitro,” 6, 94–121.
- Lauzer, D., Renaut, S., St-Arnaud, M., & Barabé, D. (2007). In Vitro Asymbiotic Germination, Protocorm Development, and Plantlet Acclimatization of *Aplectrum Hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 134(3), 344–348. [https://doi.org/10.3159/1095-5674\(2007\)134\[344:IVAGPD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3159/1095-5674(2007)134[344:IVAGPD]2.0.CO;2)
- Leal, C. (2003). *Organogénesis in vitro a partir de discos de hoja Passiflora mollissima HBK Bailey (curuba) infectados con Agrobacterium tumefaciens*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Lee-espinoza, C., Trompillo, S. De, Llave, L., Trompillo, S., & Llave, L. (2016). Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación ex situ * Analysis seeds *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) for ex situ conservation Resumen, 7, 1741–1747.
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (Eds.). (2012). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2ª edición*. Publicaciones del herbario QCA, Pontificia Universidad Católica de Ecuador, Quito.
- León Chuñir, B. C., & Romero Jiménez, S. A. (2016). *Aislamiento De Hongos Potencialmente Micorrízicos Presentes En Seis Especies De Orquídeas Nativas Del Sector San Pedro De Yumate, Molleturo, Azuay, Ecuador. Tesis*.
- López, J. T. (2015). “Conservar semillas es una garantía para la biodiversidad.” *Perspectivas de Investigación*, 12, 6–7.
- Loreto, M. E. (2016). *Optimización de medio de cultivo para crecimiento de Orquídeas a partir de semillas*. Instituto Politécnico Nacional.
- 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. *Revista de Ciencias de La Vida*, 20(2), 32.
- McKendrick, S. (2000). Manual Para La Germinacion in Vitro De Orquideas. *Ceiba Foundation for Tropical Conservation*, 17.
- Menchaca, R. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. *Comision Nacional Forestal*,

- 1(Micropropagación de orquídeas), 30–38. Retrieved from http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF
- Mendoza Abarca, 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.
- Ministerio de Turismo del Ecuador. (2014). Drácula Gigas es la orquídea emblemática de Carchi. Retrieved April 21, 2018, from <https://www.turismo.gob.ec/dracula-gigas-es-la-orquidea-emblematica-de-carchi/>
- Mosquera, A. T., & Bayman, P. (2010). Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronomica*, 59(3), 316–326.
- Muñoz, M., & Jiménez, V. M. (2008). Capsule development , in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii* , *P . longifolium* and *P . pearcei*. *Lankesteriana*, 8(2), 23–31.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murruguía Gonzáles, J. (2007). Manual de Produccion de Orquideas-Anturio-Gardenia-Ave Del Paraíso. Retrieved April 25, 2018, from <https://es.scribd.com/doc/154386663/Manual-de-Produccion-de-Orquideas-Anturio-Gardenia-Ave-Del-P>
- Ordóñez Blanco, J. C. (2016). *Investigación e innovación tecnología y aprobación social del conocimiento científico de orquídeas nativas de Cundinamarca*. Bogotá D.C., Colombia.
- Ossenbach, C. (2007). History of orchids in Central America part I: from prehispanic times to the independence of the new republics. *Harvard Papers in Botany*, 10(2), 183–226. <https://doi.org/10.2307/41761814>
- Palacios, H. (2014). *Inventario taxonomic de especies de la familia Orchidaceae en un área de Bosque andino del predio la Sierra Santuario de Fauna y Flora Guanenta, Alto rio Fonce*.
- Paredes Sandoval, E. F. (2012). *Determinación de los protocolos para cultivo in-vitro de las especies Epidendrum schistochilum y Oncidium cultratum*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.
- Patzelt, E. (1996). Flora del Ecuador (p. 334). Retrieved from http://patzelt-ecuador.de/Patzelt_Flora_del_Ecuador-1-Introduccion.pdf
- Pupulin, F. (2012). The Orchidaceae of Ruiz & Pavón’s “Flora Peruviana et Chilensis”. A taxonomic study. II. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 69(2), 143–186. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2336>
- Pupulin, F., & Bogarín, D. (2011). Of greenish Encyclia: natural variation, taxonomy,

- cleistogamy, and a comment on DNA barcoding. *Lankesteriana*, 11(3), 325–336.
- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Retrieved from <https://www.r-project.org/>.
- Rodríguez, L., Valles, J. R., Gonzáles, R., Alvarado, K., Telle, E., Díaz, A., & Sánchez, E. (2001). Germinación asimbiótica in vitro de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. *Bioteconología Vegetal*, 1 No. 2: 1, 2.
- Rodríguez, A. B. (2013). *Inducción de la germinación in vitro de Epidendrum radicans Pav. ex Lindl.* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plantulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronomica*, 61(1), 69–78.
- Salgado Moncada, J. D. (2002). *Análisis del costo de producción y evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de Rhynchoaelia digbyana en Zamorano*. Zamorano. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria.
- Sedano, C. G., Manzo, G. A., Roldán, H. R., & Castellanos, S. J. A. (2015). Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 451–456.
- Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta, 240. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Smith, S. E., & Read, D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Swartz, N. D., & Dixon, K. W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3), 543–556. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp025>
- Tapia, C., Zambrano, E., & Monteros, Á. (2008). Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación en Ecuador. *INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP)*, 1–72.
- Téllez-Velasco, M. de los Á. A. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México*. Mexico-Textcoco.
- Vasquez, S. J. (2000). *Establecimiento de una metodología para la micropropagación in vitro de la orquídea Laelia anceps Lindl.* Universidad Veracruzana.
- Vendrame, W. A., Carvalho, V. S., & Dias, J. M. M. (2007). In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*, 114(3), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.006>
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D., & Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, 86(1), 79–86. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1162>
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmölling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10487–10492. <https://doi.org/10.1073/pnas.171304098>

Zettler, L. W., & Hofer, C. J. (1998). Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*, 39(3), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(97\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(97)00019-1).

ANEXOS

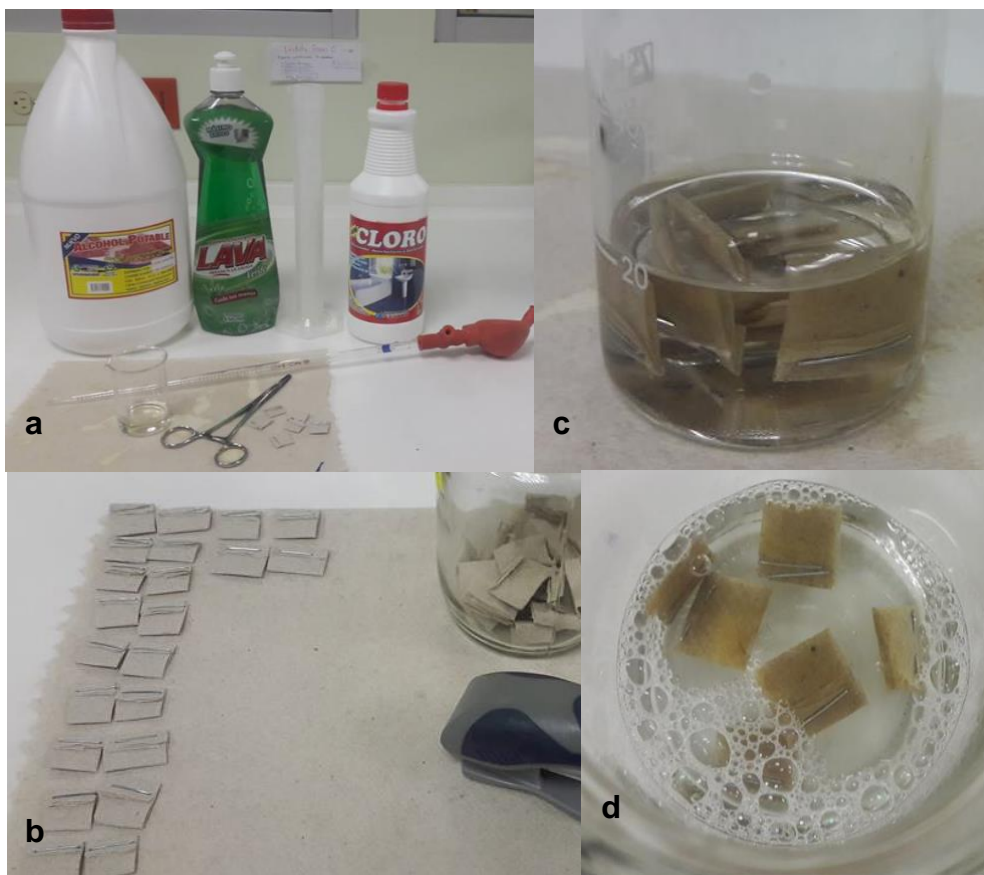
Anexo 1. Semillas de orquídeas almacenadas en frascos herméticos en el banco de germoplasma UTPL.



Anexo 2. Medio de cultivo. a. Preparación; b. Fitohormonas utilizadas; c. Medio dispensado; d. Almacenamiento de frascos con medio.



Anexo 3. Desinfección de semillas. a. Material; b. Sobres con semillas; c. Sobres en alcohol; d. Sobres en solución esterilizante.



Anexo 4. Siembra y almacenamiento de frascos con semillas.



Anexo 5. Tabla de datos.

ID	% Germinación	Siembra	Tratamiento	Días
1	20	1	T0	10
2	15	1	T0	10
3	25	1	T0	10
4	10	1	T0	10
5	15	1	T0	10
6	30	1	T0	10
7	28	1	T1	10
8	15	1	T1	10
9	20	1	T1	10
10	40	1	T1	10
11	15	1	T1	10
12	25	1	T1	10
13	20	1	T2	10
14	50	1	T2	10
15	25	1	T2	10
16	30	1	T2	10
17	50	1	T2	10
18	50	1	T2	10
19	25	1	T3	10
20	30	1	T3	10
21	10	1	T3	10
22	20	1	T3	10
23	25	1	T3	10
24	10	1	T3	10
25	25	2	T0	10
26	35	2	T0	10
27	25	2	T0	10
28	15	2	T0	10
29	40	2	T0	10
30	10	2	T0	10
31	60	2	T1	10
32	40	2	T1	10
33	80	2	T1	10
34	60	2	T1	10
35	85	2	T1	10
36	50	2	T1	10
37	60	2	T2	10
38	60	2	T2	10
39	80	2	T2	10
40	75	2	T2	10

41	40	2	T2	10
42	80	2	T2	10
43	50	2	T3	10
44	25	2	T3	10
45	25	2	T3	10
46	70	2	T3	10
47	40	2	T3	10
48	50	2	T3	10