



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Germinación de semillas y caracterización del crecimiento de *Cattleya iricolor*
(ORCHIDACEAE) almacenadas ex situ.

TRABAJO DE TITULACIÓN

Autor (es): Tapia Gaona, Johanna Lindaly

Director (a): Lucero Mosquera, Hernán Patricio

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 TITULACION

Ing.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación, “Germinación de semillas y caracterización del crecimiento de *Cattleya iricolor* (ORCHIDACEAE) almacenadas ex situ.” realizado por; Tapia Gaona Johanna Lindaly, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2018

f.

Lucero Mosquera, Hernán Patricio

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Johanna Lindaly Tapia Gaona declaro ser el autora del presente trabajo de fin de titulación: Germinación de semillas y caracterización del crecimiento de *Cattleya iricolor* (ORCHIDACEAE) almacenadas ex situ , de la titulación de Biología, siendo el Ing. 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.

Autor: Tapia Gaona, Johanna Lindaly

Cédula: 1900446715

DEDICATORIA

A mi querida madre María Cesilia por ser el principal y el más fuerte pilar que la vida me brindó, porque con tus sabios consejos, paciencia, bondad y amor de madre has sabido siempre esforzarte para darme lo mejor de ti, aunque tuvieras mil preocupaciones siempre fui yo tu prioridad; por supuesto a mi padre Hugo Patricio por nunca descuidar mi educación y por nunca negarte para ayudarme a llegar donde yo quería estar.

A mi hermana Nancy Magali por darme el mejor ejemplo intelectual, por compartir conmigo sus experimentados consejos y por darles a mis padres su apoyo cuando más lo han necesitado; y no podría faltar mi hermosa y querida sobrina Karen Nicole que con sus ocurrencias y las más sinceras sonrisas ha venido a llenar de alegría nuestros corazones.

Y a mi tío Manuel por ayudarme a iniciar mis estudios secundarios los cuales formaron una base importante para mi desarrollo universitario, y aunque ya no estés entre nosotros siempre estarás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

He logrado culminar esta importante etapa de mi vida gracias a la confianza que mis padres depositaron en mi para cumplir con éxito mis actividades académicas, también a mi hermana por colaborar con las necesidades que se han presentado a lo largo de mi carrera y a cada uno de mis familiares que han sabido aportar de alguna u otra forma en los momentos que más he necesitado.

A mi estimado director de tesis Ing. Hernán Lucero por tener paciencia y una excepcional calidez personal necesaria para darme la suficiente confianza para resolver mis dudas y sobre todo por compartir su experiencia para el mejor desarrollo de un proyecto que con tanto cariño lo realicé.

A cada una de las personas que colaboran dentro del laboratorio de fisiología vegetal, ya que con la mejor disposición del mundo han sabido ayudarme.

También a mis amigos y compañeros que a lo largo de mi carrera me han dado las mejores experiencias, las suficientes para hacer de esta etapa de mi vida una de la más hermosas; y el apoyo incondicional en las diversas ocasiones que lo he necesitado.

Sin duda cada uno de ustedes fue una pieza importante para que hoy que culmina la primera etapa de mi carrera me sienta más feliz que nunca.

¡Gracias y siempre gracias!, ¡Mi logro es el de ustedes también!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACION.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION	4
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	6
1.1 La familia Orchidaceae	7
1.1.1 Distribución.	7
1.1.2 Hábitat.....	7
1.1.3 Importancia.	8
1.1.4 Cattleya iricolor.	8
1.2 Germinación de semillas de orquídeas.....	9
1.3 Cultivo in vitro de orquídeas	10
1.3.1 Medios de cultivo alternativos.	11
1.4 Almacenamiento ex situ	11
1.5 Objetivos	12
CAPITULO II	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 Área de estudio	14
2.2 Material vegetal	14
2.3 Métodos	14
2.3.1 Objetivo 1.	14
2.3.2 Objetivo 2	15
CAPITULO III	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1 Resultados	18
3.2 Discusión	22
CONCLUSIONES	24
RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXOS.....	37

RESUMEN

Ecuador es uno de los países más diversos de orquídeas con aproximadamente 4200 especies distribuidas en las cuatro regiones naturales; *Cattleya iricolor* es una especie epífita endémica de Ecuador y Perú de valor ornamental, pero a causa de la constante extracción y abusiva comercialización se encuentra en peligro de extinción. A través del cultivo *in vitro* esta investigación evaluó la germinación asimbiótica y caracterización del crecimiento de semillas de *Cattleya iricolor* que han estado almacenadas durante seis años y seis meses. La germinación se evaluó utilizando cuatro tratamientos de desinfección (T1, T2, T3, T4) según la concentración de NaClO y dos medios denominados (MS + AC) y (MS); y para la caracterización del crecimiento se evaluó semana a semana el desarrollo a través de las fases de desarrollo de orquídeas adaptadas por Vasudevan & Staden (2010). Los tratamientos T1 y T2 son los más aptos para la germinación y el mejor medio de cultivo es el MS + AC con 16.6%; el medio suplementado con agua de coco demostró ser influyente para acelerar el desarrollo de la primera fase.

PALABRAS CLAVE: *Cattleya iricolor*, cultivo *in vitro*, medio de cultivo, germinación.

ABSTRACT

Ecuador is one of the most diverse orchid countries with approximately 4 200 species distributed in four natural regions; *Cattleya iricolor* is an endemic epiphytic species from Ecuador and Peru which has an ornamental value, due to constant extraction and abusive marketing it is in danger of extinction. Through *in vitro* culture, this research evaluated the asymbiotic germination and growth characterization of *Cattleya iricolor* seeds that have been stored for six years and six months. Germination was evaluated using four disinfection treatments (T1), T2, T3, T4) according to the concentration of NaClO and two culture media denominated (MS + AC) and (MS); and for the characterization of growth, the development through the stages of development of orchids adapted by Vasudevan & Staden (2010) was evaluated week by week. The T1 and T2 treatments are the most suitable for germination and the best culture medium is the MS + AC with 16.6%; the medium supplemented with coconut water proved to be influential in accelerating the development of the first phase.

KEY WORDS: *Cattleya iricolor*, *in vitro* culture, culture medium, germination.

INTRODUCCIÓN

El tema planteado consiste en hacer uso de la biotecnología para estandarizar los protocolos de desinfección idóneos para permitir la germinación *in vitro* de semillas almacenadas de *Cattleya iricolor* así también determinar los medios de cultivo más idóneos para su germinación comparando medio de cultivo estándar con y sin suplemento orgánico. A partir de la germinación caracterizar las fases de desarrollo a través del tiempo (semana a semana) con el objetivo de determinar el tiempo en el que se desarrolla cada una de las fases tomando en cuenta el medio en el que se encuentra; debido a que cada especie puede tener sus propias exigencias nutricionales y tiempos de desarrollo específicos, los resultados nos permiten tener un conocimiento preliminar para investigaciones futuras especialmente dirigidas a semillas almacenadas con las que poco o casi nada se ha trabajado a nivel local. Bajo estas premisas se pretende activar el orquideario UTPL mediante el uso del material existente en el banco de semillas y a su vez demostrar e incentivar la importancia de la conservación *ex situ* para programas de restauración, reintroducción y producción con fines comerciales.

El documento consta de tres capítulos que se distribuyen de la siguiente manera: el primer capítulo se denomina marco teórico en donde se indican las bases conceptuales del tema propuesto bajo los temas de familia orchidaceae, germinación de semillas de orquídeas, almacenamiento *ex situ* y objetivos general y específicos; el segundo capítulo materiales y métodos explica todo lo necesario para que la investigación sea reproducible entonces se da a conocer el área de estudio en este caso el lugar en donde se llevaron a cabo las manipulaciones, también la procedencia del material vegetal y las metodologías utilizadas para cada uno de los objetivos; y para el tercer capítulo denominado resultados y discusión se incluye el producto del trabajo a través de tablas y figuras para su respectivo análisis e interpretación.

La investigación dirigida al presente tema es de suma importancia para la institución educativa debido a que es la base para la reactivación del orquideario y a su vez promover futuros proyectos de investigación similares o de continuidad en donde el primer beneficio es el conocimiento para la conservación a largo plazo y mejorar el estado poblacional afectadas principalmente por la recolección excesiva; por otro lado la importancia económica producto del impacto de las orquídeas dentro del comercio ornamental puede ser un beneficio mutuo a través de convenios entre la institución y las empresas dedicadas a su comercio debido a que su desarrollo y producción bajo condiciones *in vitro* disminuye su costo y tiempo de producción convirtiendo a la actividad de recolección silvestre como segunda opción por la dificultad que esta genera, con esto se demuestra que también se puede conservar a través de la

investigación y beneficiar a la comunidad en general ubicando en el mercado ornamental plantas sanas a costos accesibles y sin causar impacto al ambiente.

Debido al peligro constante de extinción al que se enfrentan las orquídeas, preliminarmente se ha tratado de evaluar la capacidad de germinación respecto al tiempo de almacenamiento de las semillas de orquídeas mediante siembras constantes tomando en cuenta diferentes protocolos anteriormente planteados para especies similares/distintas acerca de condiciones asépticas y medios de composición química definida, pero no siendo suficiente y efectiva esta información se plantearon tratamientos de desinfección a criterio propio los que dieron resultados favorables. A partir de esto se evaluó detenidamente cada una de las fases de desarrollo y también detectar los tiempos en los que las plantas requieren un cambio de medio para evitar su muerte y promover su desarrollo posterior.

Los objetivos planteados tuvieron cumplimiento total con un alcance específico debido a que se demostró la germinación durante la semana cuatro después de la siembra y la respectiva caracterización de todas las fases de desarrollo, como se ha demostrado en la bibliografía. Si bien es cierto el cumplimiento de nuestros objetivos tienen un alcance específico, pero forma la base para el cumplimiento de objetivos más amplios por los cuales se podría avanzar a la etapa de adaptación bajo protocolos también ya sugeridos para luego en los mejores de los casos lograr la reintroducción al medio natural.

Para cumplir con los objetivos planteados se utilizó medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado y medio MS modificado más agua de coco (MS + AC) al 20%, se adicionó al medio 2g/l de carbón activado y el pH se ajustó a 5,8. La desinfección se realizó en sobres de papel filtro los mismo que usan como método para la siembra (Seaton & Ramsay, 2005), con 0.008g de semilla; los sobres se sumergieron en etanol al 70% durante 30 segundos, y luego en cuatro diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%) más la adición de 5 gotas de jabón líquido durante cinco minutos con agitación constante y finalmente 6 enjuagues con agua estéril. Se realizaron cinco siembras por cada tratamiento y por cada medio, es decir un total de 40 frascos. El desarrollo de las semillas se evaluó semana a semana a partir de la siembra durante catorce semanas.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 La familia Orchidaceae

El término “orquídea” proviene del vocablo griego *orchis* que fue encontrado y mencionado por primera vez en un manuscrito de Theophrastus (371-285 a.C.); el mismo que tiene por significado “testículo” que representa a los pseudobulbos presentes en algunas especies y al uso medicinal que la flor asignaba para potenciar la fertilidad (Segura & Ripa, 2009); posteriormente *orchis* se convirtió en *Orchidaceae* término que representa a la familia botánica de las orquídeas que actualmente forma uno de los grupos más diversos del reino Plantae con 25 000 especies a nivel mundial (Chase et al., 2003; Dressler, 2005), y aproximadamente 800 géneros reconocidos (Arditti, 1980; Fay & Chase, 2009).

En Ecuador se calcula que existen aproximadamente 4 200 especies descritas, 228 géneros catalogados y 1 300 son endémicas, se calcula que por cada cuatro especies una pertenece a la familia de las orquídeas (Dodson, 2003; Jørgensen & León-Yáñez, 1999; Jørgensen, Ulloa, & Maldonado, 2006), esta alta diversidad se debe a distintos factores: posición geográfica ecuatorial, influencia orográfica de la cordillera de los Andes, también de las corrientes oceánicas de Humbolt y la cálida del niño, consecuentemente se originan diversos microclimas ocasionando un mosaico de ecosistemas desde zonas semiáridas con poca precipitación hasta selvas tropicales en donde mejor se adaptan y con una elevada propensión natural a la formación de nuevas especies (Aguirre, Palomeque, Weber, Stimm, & Günter, 2011).

1.1.1 Distribución.

Se encuentran distribuidas alrededor de todo el mundo ya que han colonizado prácticamente todo el planeta, a excepción de los polos, desiertos extremos y sitios que superen los 4 500 m s.n.m.; son muy diversificadas y predominan en las regiones tropicales y subtropicales localizadas entre 300 y 4500 m s.n.m. estimando alrededor de 15 500 especies para el bloque neotropical de Centro y Sur América (Calderón, 2007; Dressler, 1993) también las regiones andinas de Ecuador, Colombia y Perú abarcan gran diversidad de orquídeas (Gil, 2012). En Ecuador las orquídeas se extienden en todos los pisos altitudinales; su excelente capacidad para adaptarse les ha permitido colonizar una gran variedad de ecosistemas por lo tanto están presentes en las cuatro regiones naturales: Costa, Amazonía, Andes y Galápagos, sin embargo, su distribución se concentra en micro hábitats de los sistemas montañosos desde 1 500 y 3 000 m s.n.m. (MINTUR, 2013; Sierra, 1999); y la zona Andina contiene el mayor endemismo de especies (León-Yáñez et al., 2011)

1.1.2 Hábitat.

Se consideran plantas herbáceas perennes que pueden ser: epífitas que crecen sobre árboles cumpliendo la función de sustrato brindando condiciones idóneas (cantidad de luz, lluvia,

corrientes de aire para permitir ser drenadas) para su desarrollo; terrestres que crecen en un compuesto de tierra o desechos vegetales; y litófitas sobre rocas (Paredes, 2012); siendo las epífitas de climas tropicales húmedos y las terrestres de lugares fríos. La mayoría de las plantas epífitas pertenecen a la familia de las orquídeas representando el 68% de todas las epífitas y el 59% de todos los géneros epífitos (casi 19 000 y 543, respectivamente), y su vez la mayoría de orquídeas son epífitas ya que el 69% de sus especies y 60% de sus géneros tienen este crecimiento (Zotz, 2013); en América el 90% de las especies de orquídeas también son epífitas y tan solo el 10% son terrestres (Dressler, 1993).

1.1.3 Importancia.

Sus hermosas y en algunos casos extrañas flores, su extensa gama de aromas y sobresalientes colores ha sido motivo suficiente para que el campo de la horticultura centre su atención en ellas debido a que brindan una agradable y fina decoración en lugares públicos y privados, de igual forma en el campo de la industria alimenticia dando sabor a bebidas y alimentos como es el conocido caso de *Vainilla panifolia* (Escobar, 1990; Griesbach, 2002; Tiza, 2010), además son de uso para indicar la estabilidad de ecosistemas debido a que se consideran las más evolucionadas por estar ocupando un lugar importante en la cadena evolutiva de las plantas superiores producto de su complejidad floral, interacciones con polinizadores y hongos micorrízicos (Rivera, Linares, & Piltz, 2002).

En Ecuador se ha registrado que la importancia se dirige al sector comercial especialmente por la diversidad florística existente, la comercialización de esta familia de plantas genera constantemente fuentes de trabajo a través de las pequeñas y grandes industrias dedicadas al cultivo para su venta en el mercado ornamental local e internacional (Serrano, 2011; Smith & Read, 2008). Sin embargo, nuestro país no ha proporcionado los suficientes recursos para investigación y control para regular la abusiva extracción natural con fines comerciales ilegales lo cual afecta fuertemente en la preservación de orquídeas (Rasmussen, 2002).

1.1.4 *Cattleya iricolor*.

Cattleya iricolor es una orquídea epífita poco conocida frente a las de su género sin embargo se conoce que posee sépalos y pétalos de color amarillo cremoso pálidos, y el labelo blanco con marcas lavanda y amarillas (Figura 1). Se distribuye en Perú en las regiones de Junín y San Martín, y en Ecuador en las provincias de Sucumbíos, Napo y Morona Santiago en elevaciones desde los 400 a 850 m (Álvarez et al., 2015; Govaerts, 2003)



Figura 1. *Cattleya iricolor* Rchb.f.

Fuente: Pereira (2018)

1.2 Germinación de semillas de orquídeas

Las plantas que producen grandes cantidades de semillas diminutas favorecen las tasas de dispersión y expresión de la variabilidad genética a través de límites geográficos y ecológicos (Batty, Dixon, Brundrett, & Sivasithamparam, 2002). Es el caso de las orquídeas que pueden producir 1 300 semillas y dependiendo la especie hasta entre 2 y 3 millones por cápsula sin embargo en la naturaleza no todas tienen éxito germinativo por su limitado tamaño que varía entre 0.4 y 1.25 mm de longitud (Arditti, 1992), la ausencia de reservas nutricionales debido a su carencia de endospermo (Arditti & Ghani, 2000; Batty, Dixon, & Sivasithamparam, 2000) por tal razón se hace necesaria la germinación simbiótica es decir la asociación de un hongo micorrízico (*Thulasnella*) para que las semillas puedan acceder a nutrientes del suelo como nitrógeno, fósforo, vitaminas y/o aminoácidos durante las fases tempranas de la germinación a cambio de proveer al hongo carbono derivado de plantas fotosintéticas (Leake, 1994; Paredes, 2012; Waterman & Bidartondo, 2008) y en ciertos casos algunas especies pueden cambiar o adquirir asociaciones nuevas según la madurez de la planta (Bidartondio & Read, 2008) en consecuencia a esta dependencia sólo alrededor del 5% de las semillas germinan en la naturaleza; en un estudio se determinó que una cápsula con aproximadamente 30 000 semillas de *Caladenia arenicola* germinó solamente el 1% (Batty, Dixon, Brundrett, & Sivasithamparam, 2001).

El crecimiento de sus semillas es muy lento y en su mayoría el estado de floración comienza entre los tres y cinco años, y unas pocas florecen más temprano lo que hace imposible recuperar de forma rápida la población de determinadas especies. Frente a este problema se ha determinado que se puede disminuir el tiempo para incrementar las poblaciones afectadas

mediante técnicas biotecnológicas brindando a las semillas las condiciones necesarias para su crecimiento (Arditti, 1994), es decir bajo condiciones asimbióticas.

Otro aspecto importante que puede limitar la germinación es el estado de maduración de las semillas debido a que si están inmaduras el embrión no estará completamente desarrollado y la testa tampoco lo suficientemente lignificada para permitir la permeabilidad de agua y nutrientes mientras que las capsulas que contienen semillas maduras presentan una testa bien formada y un ligero contenido de agua pueden ser capaces de alcanzar un alto potencial de propagación y almacenamiento (Jiang et al., 2016; Miyoshi & Mii, 1998; Zhang et al., 2015). Se ha documentado que semillas provenientes de capsulas colectadas antes de los 150 días después de la polinización no mostraron germinación a diferencia de capsulas colectadas después de los 150 días posteriores a la polinización mostraron inicio de la germinación (Diengdoh, Kumaria, Tandon, & Das, 2017). Sin embargo, el estado de madurez puede diferir entre especies de orquídeas (Deb & Pongener, 2013)

1.3 Cultivo in vitro de orquídeas

El cultivo in vitro comprende una diversidad de técnicas, mediante las cuales los explantes o semillas son cultivadas bajo condiciones estrictas de asepsia en un medio de composición químicamente definida e incubadas a condiciones controladas (Roca & Mroginski, 1991). Estas técnicas ideadas por Knudson (1922) han sido ampliamente utilizadas para la conservación de especies de orquídeas especialmente las que se encuentran en peligro de extinción (Arditti & Krikorian, 1996), ya que se obtienen individuos en gran cantidad; de acuerdo a esto se han probado distintos medios de cultivo con el fin de estandarizar un medio específico para cada especie. La composición de estos medios de cultivo tiene influencia directa en la germinación de orquídeas; en la mayoría de los casos es necesario solamente un medio de cultivo sencillo como por ejemplo el medio Murashige y Skoog (1962) que ha sido ampliamente utilizado principalmente para orquídeas aun así Lo et al. (2004) y Chen et al. (2015) mencionan que la germinación de una misma especie varía de acuerdo al medio y que también difiere entre especies incluso entre las del mismo género; se ha demostrado que ciertas semillas necesitan un medio con elevado contenido de sales para germinar (Dohling, Kumaria, & Tandon, 2008; Paul, Kumaria, & Tandon, 2011) mientras que *Paphiopedilum insigne* requiere un medio con bajo contenido de sales (Diengdoh et al., 2017), en otros informes se respalda que inclusive algunas especies requieren menos de la mitad de la composición de micro y macronutrientes para el inicio de la germinación (Nikabadi et al., 2014; Pierik, Sprenkels, Van Der Harst, & Van Der Meys, 1988; Zeng et al., 2015); así también otros compuestos específicos como la glucosa también tienen influencia directa ya que se ha comprobado que induce una alta germinación temprana al ser comparada con otros medios

carentes de glucosa(Long, Niemiera, Cheng, & Long, 2010; Traore & Guiltinan, 2006; Zeng et al., 2012); y para las diferentes etapas posteriores de crecimiento los requerimientos nutricionales varían (Nadarajan, Wood, Marks, Seaton, & Pritchard, 2011; Zeng et al., 2013).

1.3.1 Medios de cultivo alternativos.

Se puede definir a un medio de cultivo como la suma de componentes nutritivos en forma líquida o semisólida en donde células vegetales, tejidos y órganos se pueden desarrollar (Chávez & Rincón, 2006) . Para algunas especies de orquídeas los medios de cultivos convencionales no han sido suficientes para su germinación y crecimiento por lo tanto se han implementado medios de cultivo adicionando fitohormonas y suplementos orgánicos con el fin de favorecer la germinación; por su bajo costo y fácil obtención los nutrientes naturales como agua de coco, pulpas de piña, banano y tomate hoy en día han reemplazado a las hormonas, especialmente el agua de coco que ha sido el más utilizado porque se ha demostrado ser el más efectivo debido a que sus componentes cumplen funciones similares a las de hormonas citoquininas que promueven la división y diferenciación celular (Arditti, 2008; Asghar, Ahmad, Ahmad, & Yaseen, 2011; Pedroza, 2009; Salazar, 2012; Salazar & Cancino, 2012).

1.4 Almacenamiento *ex situ*

Debido a la alta presión que han sufrido las poblaciones de orquídeas en los últimos años su conservación se ha convertido en una prioridad para la comunidad científica; por lo tanto la ejecución de programas de conservación *in situ* ha sido fundamental pero no suficiente ya siguen disminuyendo de forma alarmante a causa de las diversas actividades antropogénicas (Tandon, Kumaria, & Nongrum, 2009), alternativamente está la conservación *ex situ* que se refiere al almacenamiento de semillas fuera de su sitio natural contenidas en bancos de semillas bajo ciertos protocolos, uno de ellos es el almacenamiento a bajas temperaturas (entre 6° C y -20°C) lo que implica no perder la viabilidad durante algunos años (Chugh, Guha, & Rao, 2009; Engelmann, 2011). El almacenamiento *ex situ* ofrece un medio para salvaguardar la conservación a largo plazo en caso de posibles extinciones en la naturaleza, también una fuente de material para proyectos de evaluación científica enfocados a la recuperación de poblaciones y a su vez la producción de plantas dirigidas al biocomercio (Stewart & Kane, 2006). Las semillas de muchas especies de orquídeas tienen comportamiento de almacenamiento ortodoxo (Seaton, Hu, Perner, & Pritchard, 2010) es decir que posterior a la desecación a niveles bajos de humedad (entre 5% y 7% de peso fresco) y bajas temperaturas de almacenamiento la germinación sigue siendo posible; lo que no puede ser posible para otros grupos de semillas denominadas recalcitrantes las cuales no son resistentes a la desecación. Por la ventaja que presentan las semillas de orquídeas es que se ha optado cada vez más las técnicas de conservación *ex situ*, un claro ejemplo es el proyecto

denominado “Orchid Seed Science And Sustainable Use” de la iniciativa Darwin que tiene por objetivo recolectar y almacenar semillas de orquídeas de más de 20 países (OSSSU, 2017).

1.5 Objetivos

1.5.1 General.

Evaluar la germinación y crecimiento en *Cattleya iricolor* en cultivo in vitro utilizando agua de coco como aditivo potenciador.

1.5.2 Específicos.

- Evaluar la germinación de semillas de *Cattleya iricolor* utilizando diferentes tratamientos de desinfección y dos medios de cultivo.
- Caracterizar el desarrollo de las semillas de *Cattleya iricolor* en dos medios de cultivo.

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

El presente trabajo se ejecutó en el laboratorio de fisiología vegetal perteneciente al Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2 Material vegetal

Las semillas de *Cattleya iricolor* se obtuvieron del banco de germoplasma de la Universidad Técnica Particular de Loja; las cuales se mantuvieron en almacenamiento durante seis años y medio, en viales herméticos compartimentalizados con silica gel con la identificación correspondiente y mantenidas a 4°C (Anexo 1)

2.3 Métodos

2.3.1 Objetivo 1.

2.3.1.1 Medios de cultivo.

Se utilizó medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado (MS) (Tabla 1) y medio MS más agua de coco como suplemento orgánico (MS + AC) el cual se preparó adicionando 200ml/l (20%) (Salazar, 2012), a cada medio se le adicionó 2g/l de carbón activado. Las condiciones de pH se ajustaron a 5,8.

Tabla 1. Medio MS modificado

Medio de cultivo modificado (MS)/1000 ml	
Fertilizante	0.20 g
Azúcar morena	20 g
Agar	6.8 g
Carbón activado	2 g

Elaboración: Tapia, L (2018)

2.3.1.2 Desinfección y siembra de semillas.

La desinfección se realizó en sobres de papel filtro los mismo que usan como método para la siembra (Seaton & Ramsay, 2005), se colocó 0.008g de semilla en el centro de un cuadro de papel filtro doblado y sellado con una grapa para evitar que las semillas se desperdicien en el proceso de la desinfección. Los sobres con semillas se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 30 segundos, y luego en cuatro diferentes tratamientos de desinfección las mismas que corresponden a las siguientes concentraciones de hipoclorito de sodio: 0.1% (T1), 0.2% (T2), 0.3% (T3) y 0.4% (T4) más la adición de 5 gotas de jabón líquido durante cinco minutos con agitación

constante para lograr una mejor concentración del tratamiento sobre las semillas, luego fueron llevadas a la cámara de flujo laminar para realizar de cinco a seis lavados con agua destilada estéril para retirar el tratamiento y el exceso de jabón.

La siembra se realizó en frascos a través del método del sobre que consiste en cortar el costado que contiene la grapa y con ayuda de pinzas estériles abrir el sobre y esparcir las semillas lo más homogéneamente posible sobre el medio de cultivo (Anexo 2). El material sembrado se trasladó a la sala de crecimiento a temperatura de 24° C y fotoperiodo de doce horas luz y doce horas oscuridad.

2.3.1.3 Diseño experimental y análisis estadísticos.

Para evaluar la germinación de semillas se tomaron porcentajes de cada siembra después de que la siembra haya cumplido la semana 15 de evaluación; se evaluó en dos medios de cultivo (MS y MS + AC) y con cuatro tratamientos de desinfección (T1, T2, T3, T4); se hicieron cinco repeticiones por cada tratamiento para cada uno de los medios contabilizando un total de 40 repeticiones (Tabla 2). Los datos obtenidos se colocaron en una matriz de Microsoft Excel en donde se ordenó cada una de las variables para realizar una prueba estadística de ANOVA mediante el programa estadístico (R versión 3.1) para saber qué tan variables son nuestros datos respecto a cada tratamiento sobre los medios de cultivo.

Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación de la germinación

Medio de cultivo	Concentración de hipoclorito de sodio			
	T ₁ 0,1%	T ₂ 0,2%	T ₃ 0,3%	T ₄ 0,4%
MS	5 siembras	5 siembras	5 siembras	5 siembras
MS + AC	5 siembras	5 siembras	5 siembras	5 siembras

Elaboración: Tapia, L (2018)

2.3.2 Objetivo 2.

El desarrollo de las semillas se evaluó semana a semana a partir de la siembra durante quince semanas a través de las fases de desarrollo de orquídeas adaptadas por Vasudevan & Staden (2010) (Tabla 3) y para mejorar la identificación se tomó como referencia fotográfica los resultados de Salazar (2012) en donde la especie estudiada fue *Cattleya mendelii*.

Tabla 3. Fases de desarrollo de semillas de orquídeas.

Fase	Descripción
0	Semillas con embrión no germinaron.
1	El embrión aumenta de tamaño.
2	Ruptura de la testa.
3	Formación de protocormos y rizoides.
4	Aparición de la primera hoja.
5	Elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior.

Fuente: Modificado de Vasudevan & Staden (2010).

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

Para dar respuesta a nuestro primer objetivo se observó que para el medio MS + AC el inicio de la germinación se dio al finalizar la semana 4 de evaluación después de la siembra mientras que para el medio MS fue al finalizar la semana 5 considerando que la fase 1 es el inicio de la germinación.

Según los resultados de germinación frente a concentración de NaClO y medio de cultivo la figura 2A muestra un $P < 0.05$ lo que puede definir una diferencia significativa entre los tratamientos (T1, T2) y (T3, T4) frente a los porcentajes de germinación para el medio MS + AC; y la figura 2B indica un $P > 0.05$ dando como resultado una no significancia es decir los tratamientos (T1,T2,T3,T4) no tuvieron influencia significativa sobre la germinación en el medio MS.

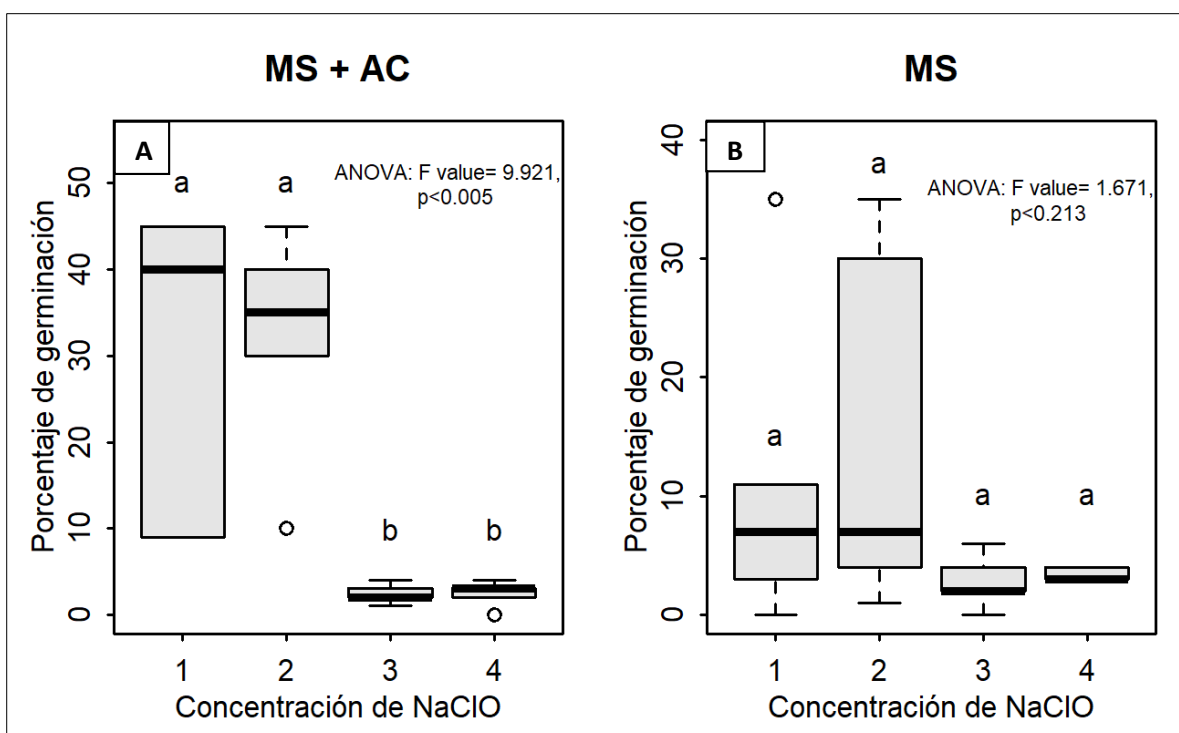


Figura 2. Porcentaje de germinación frente a la concentración de NaClO (1,2,3,4 corresponden a los tratamientos T1, T2, T3, T4 respectivamente) para los medios MS + AC y MS.

Elaboración: Tapia, L (2018)

Se observó que las siembras para el tratamiento T2 y el medio MS + AC tuvieron las cantidades más altas de germinación (23.7 y 16.6 respectivamente) siendo la variable concentración de NaClO las más influyente sobre la germinación (Tabla 4), la figura 3 contrasta la germinación por cada tratamiento en cada medio, en donde el T2 favorece la germinación para el medio MS + AC y T3 afecta negativamente para los dos medios.

Tabla 4. Porcentaje del promedio de germinación para las variables medio de cultivo y tratamiento de desinfección.

% de germinación	Medios de cultivo		Tratamientos de desinfección			
	MS + AC	MS	T1	T2	T3	T4
	16.6	8.2	20.4	23.7	2.6	2.9

Elaboración: Tapia, L (2018)

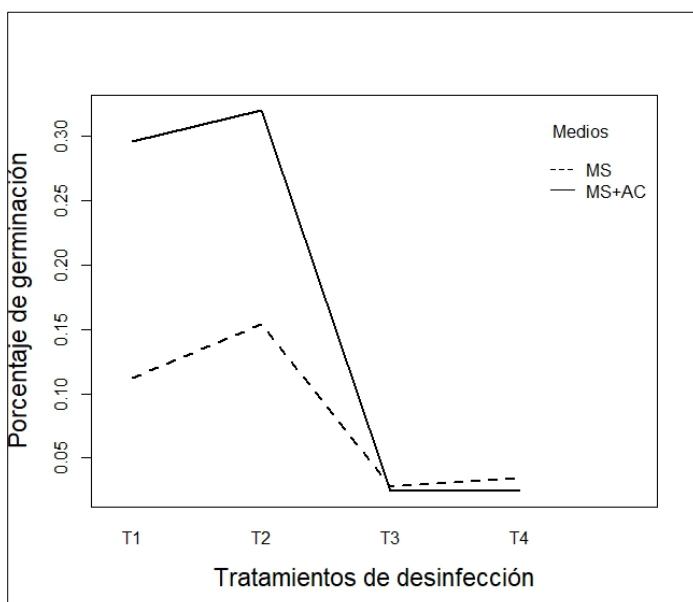


Figura 3. Porcentaje de germinación en proporción/100

Elaboración: Tapia, L (2018)

Finalmente, a través de las medias de germinación tanto para tratamientos y medios de cultivo se evidencia que los valores por encima de la media corresponden a los tratamientos T1, T2 y medio (MS + AC) es decir las concentraciones de NaClO al 0.1 % y 0.2% son aceptables para la germinación de *C.iricolor* y el medio de cultivo suplementado con agua de coco resulta ser favorable para potenciar la germinación; mientras que los tratamientos al 0.3% y 0.4% inhiben las germinación de forma drástica y el medio MS presenta valores por debajo de la media (Figura 4) .

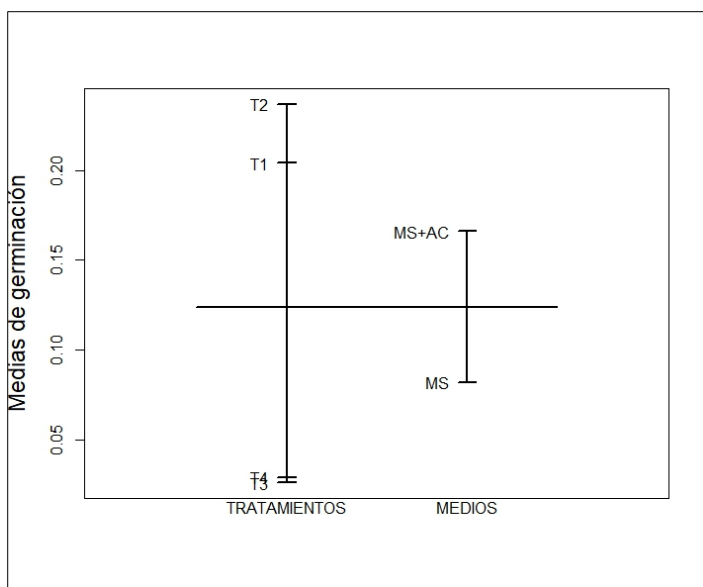


Figura 4. Media de germinación para tratamientos y medios.

Elaboración: Tapia, L (2018)

Para el segundo objetivo se tomaron datos de las fases de desarrollo semana a semana hasta culminar la semana quince (Tabla 5); la fase 0 se mantuvo durante las primeras tres semanas para el medio MS + AC y las primeras cuatro para el medio MS, las fases 1 y 2 permanecieron durante una semana (cada una) para los dos medios, la fase 3 durante seis semanas para el medio MS + AC y cinco para el medio MS, la fase 4 duró tres semanas para los dos medios y la fase 5 se mostró simultáneamente en la semana quince (Figura 5).

Tabla 5. Control semana a semana de las fases de desarrollo de semillas de *Cattleya iricolor*.

FASES DE DESARROLLO	Medios de cultivo	Observación (semanas)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	MS + AC	0	0	0	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	5
	MS	0	0	0	0	1	2	3	3	3	3	3	4	4	4	5

Elaboración: Tapia, L (2018)

Se identificó la fase 0 como “semillas con embrión no germinaron” (Figura 6A), fase 1 como “embrión aumenta de tamaño” (Figura 6B), fase 2 como “ruptura de la testa” (Figura 6C), fase 3 como “formación de protocormos y rizoides” (Figura 6D), fase 4 como “aparición de la primera hoja” (Figura 6E), y fase 5 como “elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior” (Figura 6F).

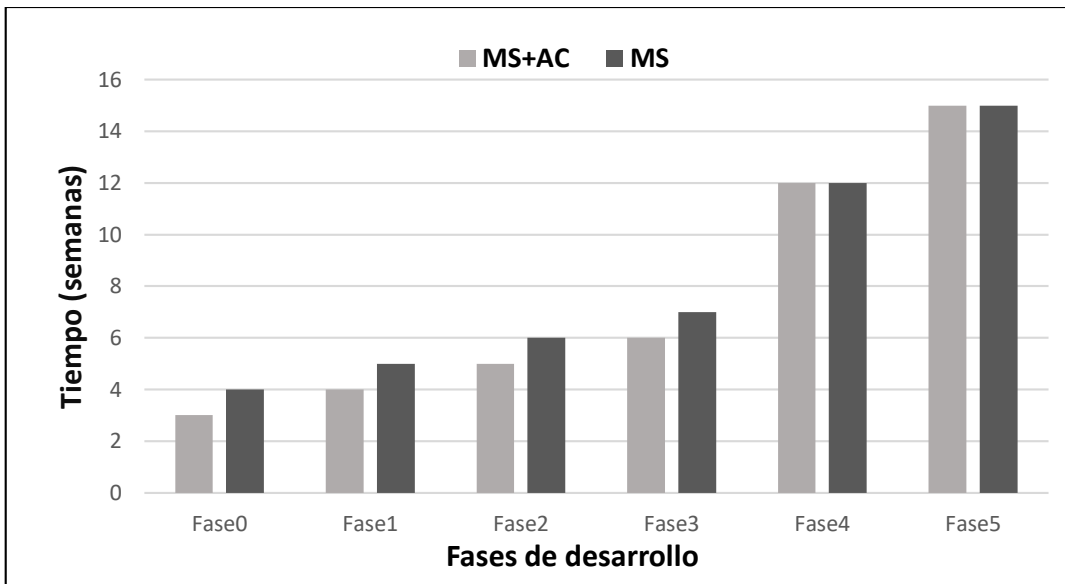


Figura 5. Desarrollo de fases semana a semana para los medios (MS + AC) y (MS).

Elaboración: Tapia, L (2018)

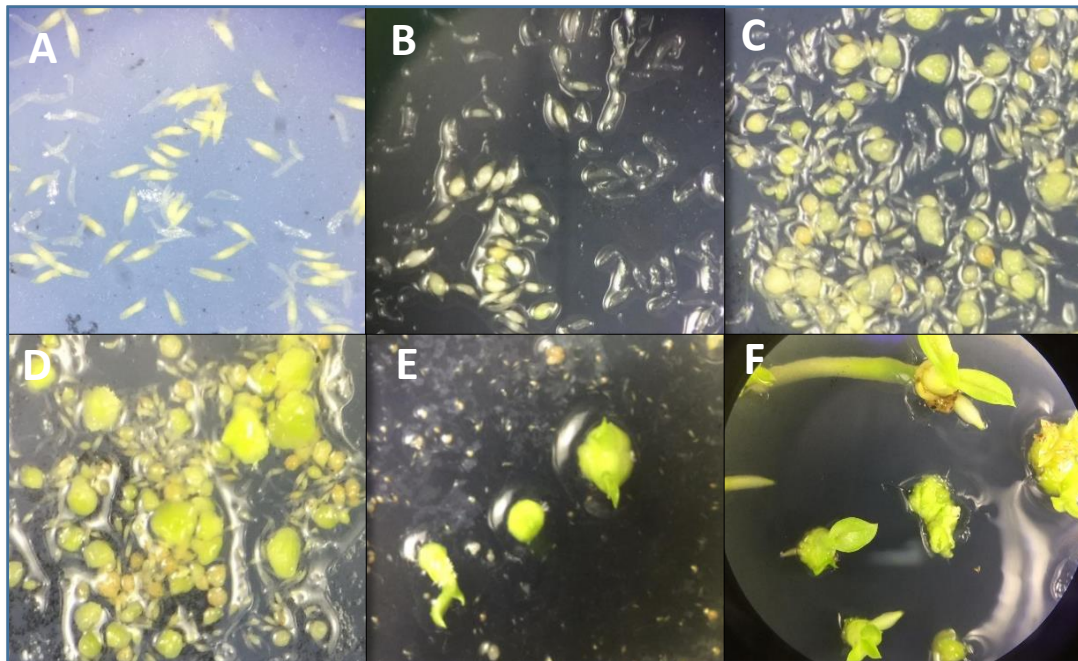


Figura 6. Desarrollo de las fases de *Cattleya iricolor*

Fuente: Tapia, L (2018)

3.2 Discusión

El porcentaje de germinación más alto de *Cattleya iricolor* se dio en semillas tratadas con NaClO al 0.2% (T2) teniendo como resultado 23.7% de germinación y la más baja en concentraciones al 0.3% (T3) con 2.6% de germinación. De acuerdo a estos resultados se puede inferir que el uso de NaClO tiene influencia directa en la viabilidad de las semillas, Salazar, (2012) observó que las semillas de *Cattleya mendelii* sometidas a concentraciones de hipoclorito de sodio al 1% tuvo mayor porcentaje de viabilidad y el menor en concentraciones al 3% al igual que Salazar et al. (2013) con híbridos de *Phalaenopsis* de forma similar Diengdoh et al. (2017) siguen el mismo patrón en concentraciones al 5% y 7% para *Paphiopedilum insigne*, Alvarez-Pardo et al. (2006) también demostraron que las concentraciones bajas de NaClO (0.4%) para semillas de 11 especies de orquídeas epífitas del sureste de Brasil mantuvieron una mayor viabilidad frente a una concentración más fuerte (0.8%) y además señala que cinco minutos es el tiempo ideal para desinfectar debido a que a mayor tiempo de exposición la viabilidad se ve afectada; en principio se creía que la viabilidad no era un buen indicador de la germinación debido a que la germinación no evaluaba el potencial para la división celular y posterior desarrollo (Vujanovic, St-Arnaud, Barabé, & Thibeault, 2000) pero posteriormente se demostró en muchas especies que la prueba de viabilidad puede ser un dato predecible para estimar la capacidad de germinación (Alvarez-Pardo & Ferreira, 2006; Salazar, 2012). El NaClO tiene como función esterilizar y escarificar la cubierta de las semillas para estimular la germinación, si embargo las altas concentraciones provocan severas lesiones como deformaciones o incluso su muerte (Diengdoh et al., 2017; Vasudevan & Staden, 2010; Zeng et al., 2013).

A pesar de que existe una diferencia en los porcentajes de germinación influenciada por los tratamientos los resultados obtenidos de germinación son bajos frente a los estudios antes mencionados ya que muestran valores del 80% en adelante; la pérdida de viabilidad de *C. iricolor* puede atribuirse a la cantidad de años que las semillas llevaban almacenadas y a la temperatura que se mantuvieron, varios estudios han demostrado que la viabilidad disminuye a medida que avanza el periodo de almacenamiento como los casos de *Maxillaria picta* y *Cattleya labiata* que perdieron casi completamente la viabilidad después de 30 meses de almacenamiento a 5°C mientras que *Cattleya intermedia* mantuvo su viabilidad durante 24 meses a una temperatura de -18°C; y en los casos de semillas mantenidas a condiciones ambientales la pérdida de viabilidad es evidente a los 6 meses de almacenamiento y su completa pérdida a los 18 meses (Alvarez-Pardo & Ferreira, 2006), de forma similar ocurrió con *Phalaenopsis amabilis* y *Dendrobium phalaenopsis* que en 20 días de almacenamiento ambiental perdió el 30% de la viabilidad (Limartha, 1975). Otro aspecto importante es el contenido de humedad de las semillas ya que se ha demostrado que la disminución del

contenido de agua aumenta su longevidad, las semillas de orquídeas son tolerantes a la desecación independientemente de las formas de vida de cada especie es así que las especies *Dactylorhiza fuchsii*, *Dendrobium anosmum*, *Eulophia gonychila* son tolerantes a la desecación al 5% de HR sin afectar la germinación (Pritchard, Poynter, & Seaton, 1999) de forma homóloga otros estudios corroboran la importancia de la reducción de la humedad para potenciar el almacenamiento a largo plazo siempre y cuando el secado no sea excesivo porque se sabe que para algunas especies el equilibrio de HR entre 11% y 15% mantiene la viabilidad mientras que al 5% disminuye (Dowling & Jusaitis, 2012; Hay, Merritt, Soanes, & Dixon, 2010).

La elección del medio de cultivo para la siembra es de suma importancia ya que cada especie puede tener sus propias exigencias nutricionales para la germinación y otras para las siguientes etapas de crecimiento (Vogel & Macedo, 2011). Al igual que nuestro estudio se ha demostrado que la función del agua de coco como aditivo potenciador de la germinación es favorable debido a que contiene compuestos con funciones similares a las de fitohormonas (citoquininas), *Cattleya iricolor*, *Ophrys* e híbridos de *Phalaenopsis* obtuvieron el mayor porcentaje de germinación en un medio suplementado con agua de coco (Kitsaki, Zygouraki, Ziobora, & Kintzios, 2004; Salazar, 2012; Salazar et al., 2013) lo que no refleja en la investigación de Salazar & Cancio (2012) al ser el jugo de piña el suplemento ideal para la germinación de *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzscheana*; por eso es indispensable estudiar las condiciones nutricionales necesarias para cada especie y poder estandarizar protocolos para la producción y conservación de orquídeas (Basker & Bai, 2010; Dutra et al., 2008; Kauth, Kane, & Vendrame, 2011). Por otro lado, el uso de AC es provechoso en las primeras etapas de desarrollo (1, 2 y 3) mientras que para las etapas 5 y 6 el mejor aditivo es el jugo de piña (Kitsaki et al., 2004). Según los resultados obtenidos es destacable decir que esta investigación es la base de futuros proyectos encaminados a hacer recomendaciones sobre la producción de plantas para el mercado.

CONCLUSIONES

La viabilidad de semillas de *C.iricolor* se mantuvo parcialmente después de seis años de almacenamiento a 4°C debido a que los protocolos para almacenar han sido los correctos de acuerdo a la bibliografía estudiada y a que las semillas han resultado ser ortodoxas, a pesar de que la germinación fue baja aún sigue siendo superior a la de vida silvestre debido a que existe una correlación directa entre tiempo de almacenamiento y los porcentajes de viabilidad; el tiempo de inicio de la germinación identificadas para otras especies es similar al que dio inicio nuestra especie siendo la semana 4 como la máxima.

Las concentraciones de hipoclorito de sodio utilizados para la desinfección si tienen influencia en la germinación ya que su exceso puede provocar la muerte de las semillas, el tiempo (5 minutos) de inmersión de las semillas en el tratamiento desinfectante es el ideal para que los porcentajes de germinación no se vean afectados. El tratamiento (T2) correspondiente a la concentración 0.2% fue el ideal para la germinación ya que fue lo suficiente para desinfectar y escarificar la cubierta de la semilla, mientras que T3 y T4 fueron bastante fuertes lo que inhibió de forma drástica la germinación.

El medio MS + AC si tuvo influencia en la germinación, lo que demuestra que si se pueden usar productos naturales en vez de fitohormonas con el fin de economizar debido al alto costo que estas demandan, así mismo durante las fases de desarrollo el medio de cultivo con suplemento acelera la germinación mientras que el medio sin suplemento tardó una semana más para resultados de germinación y al cabo de la semana siete el desarrollo de las fases se equilibró demostrando que el agua de coco es influyente solo en las primeras etapas del desarrollo; se considera necesario adicionar otro compuesto natural para estimar las etapas posteriores.

Mediante esta investigación se está dando paso a nuevos proyectos que incentiven la reactivación del orquideario UTPL a través de futuros proyectos vinculados al proceso de adaptación de orquídeas al medio ex vitro, al mismo tiempo se demuestra que se pueden realizar investigaciones innovadoras a través del material disponible en el banco de germoplasma para la conservación a largo plazo perfectamente direccionado a este grupo de plantas que se encuentran en constante peligro debido a su importancia económica ornamental.

RECOMENDACIONES

Tomar como iniciativa la presente investigación para desarrollar temas similares con semillas almacenadas y potenciar su uso para beneficio de la conservación, biocomercio creando lazos entre la comunidad científica y la comunidad en general a través de convenios, y además porque a nivel local se ha trabajado muy poco o nada en la propagación de semillas almacenadas.

Utilizar las diferentes alternativas de aditivos orgánicos (agua de coco, jugo de piña, extracto de banana, entre otros) para estimular la germinación y determinar los medios más adecuados para el desarrollo de cada especie; teniendo como ventaja el bajo costo y la fácil adquisición.

Según la bibliografía revisada se podrían hacer análisis de viabilidad para saber si existe una relación por la cual se podría predecir el porcentaje de germinación, de manera que si existe alguna urgencia por propagar una especie "X" ya se pueda saber su viabilidad en un corto periodo de tiempo.

A las autoridades institucionales, apoyar y dar a conocer los proyectos que se trabajan en el laboratorio para que más gente se interese y puedan colaborar, aprender e investigar los proyectos en marcha.

Regular la entrada al cuarto frío del banco de germoplasma ya que los cambios o alteraciones en la temperatura pueden ser perjudiciales para su viabilidad. Se sugiere una frecuencia mensual de ingreso programado.

Crear iniciativas al sur de Ecuador de micro empresas para el cultivo, propagación y comercialización de especies propias del país para posteriormente impartirlas al comercio nacional e internacional, de tal forma evitar la inadecuada extracción de especímenes silvestres.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, N., Palomeque, X., Weber, M., Stimm, B., & Günter, S. (2011). Reforestation and Natural Succession as Tools for Restoration on Abandoned Pastures in the Andes of South Ecuador. In *Silviculture in the Tropics* (pp. 513–524). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19986-8_33
- Alvarez-Pardo, V., & Ferreira, A. (2006). Armazenamento de sementes de orquídeas. *SciELO Brasil*, 28(2), 92–98. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbs/v28n1/a13v28n1.pdf>
- Alvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G., & Nunes, V. F. (2006). Seed disinfestation methods for in vitro cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira*, 24(2), 217–220. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362006000200019>
- Álvarez, A., Nuñez, F., Gutiérrez, H., Flores del Castillo, J., Carreño, F., & Angulo, E. (2015). Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial, 1–100.
- Arditti, J. (1980). Aspects of the Physiology of Orchids. *Advances in Botanical Research*, 7, 421–655.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of orchid biology*. New York, USA: John Wiley & Sons. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930321997>
- Arditti, J. (1994). Micropropagation of orchids. *Biological Conservation*, 68(1), 75–76. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(94\)90551-7](https://doi.org/10.1016/0006-3207(94)90551-7)
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of orchids. Volume 1* (2nd ed). Blackwell Pub. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/Micropropagation+of+Orchids%2C+2nd+Edition-p-9781444300406>
- Arditti, J., & Ghani, A. (2000). *Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. The New Phytologist* (Vol. 145). William Wesley and Son. Retrieved from <https://www.cambridge.org/core/journals/new-phytologist/article/tansley-review-no-110-numerical-and-physical-properties-of-orchid-seeds-and-their-biological-implications/0A4A6DE17BF9A9E485642725970ACDDC>
- 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/10.1111/j.1095-8339.1996.tb02073.x>
- Asghar, S., Ahmad, T., Ahmad, I., & Yaseen, M. (2011). In vitro propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology*, 10(16), 3097–3103. <https://doi.org/10.5897/AJB10.401>
- Basker, S., & Bai, N. (2010). In vitro propagation of an epiphytic and rare orchid *Eria bambusifolia* Lindl. *Research in Biotechnology*, 1(1), 15–20. Retrieved from <http://updatepublishing.com/journal/index.php/rib/article/view/2326>
- Batty, A., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (2000). *Soil seed-bank dynamics of terrestrial orchids. Lindleyana* (Vol. 15). The Society. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013007219>
- Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M. C., & Sivasithamparam, K. (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytologist*, 152(3), 511–520. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00277.x>
- Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M. C., & Sivasithamparam, K. (2002). Orchid Conservation and Mycorrhizal Associations. In *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity* (pp. 195–226). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9_7
- Bidartondio, M. I., & Read, D. J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17(16). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x>
- Calderón, E. (2007). *Libro rojo de plantas de Colombia. Vol. 6. Orquídeas, primera parte. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Retrieved from <http://34.199.134.87/handle/20.500.11761/31410>
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L., & Freudenstein, J. V. (2003). DNA data and

- Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. *Orchid Conservation*, (January), 69–84.
- Chávez, N. A., & Rincón, J. (2006). *Glosario de biotecnología* (1st ed.). México: Universidad Autónoma de Aguascalientes. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=iFCVkjTiRqwC&oi=fnd&pg=PA9&dq=Chávez,+N++y+J.+++Rincón.,+2006.++Glosario+de+Biotecnología+.++Universidad+Autónoma+de+Aguas+calientes.+1º+Edición.+México.&ots=eIWV35F7rA&sig=fDpZ>
- 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>
- Chugh, S., Guha, S., & Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507–520. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2009.07.016>
- Deb, C. R., & Pongener, A. (2013). A study on the use of low cost substrata against agar for non-symbiotic seed culture of “*Cymbidium iridioides*” D. Don. *Australian Journal of Crop Science*, 7, 642–649. Retrieved from <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=364724335422883;res=IELHSS>
- 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. (2003). Native Ecuadorian orchids (Vol. IV: Oncidi, pp. 665–883). Sarasota, Florida.
- Dohling, S., Kumaria, S., & Tandon, P. (2008). Optimization of Nutrient Requirements for Asymbiotic Seed Germination of *Dendrobium* sp Optimization of Nutrient Requirements for Asymbiotic Seed Germination of *Dendrobium longicornu* Lindl. and *D. formosum* Roxb | Request PDF. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 167–171.

Retrieved from
https://www.researchgate.net/publication/235998628_Optimization_of_Nutrient_Requirements_for_Asymbiotic_Seed_Germination_of_Dendrobium_sp_Optimization_of_Nutrient_Requirements_for_Asymbiotic_Seed_Germination_of_Dendrobium_longicornu_Lindl_and_D_formos

Dowling, N., & Jusaitis, M. (2012). Asymbiotic in vitro germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany*, 60(7), 592. <https://doi.org/10.1071/BT12133>

Dressler, R. L. (1993). *Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama*. Comstock Pub. Associates. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LiMbwG0pALkC&oi=fnd&pg=PP7&dq=Dressler,+R.L.+1993.+Field+guide+to+the+orchids+of+Costa+Rica+and+Panama.++New+York,+Estados++Unidos+de+América.+Cornell+University+Press.+&ots=INWzjUHk6Y&sig=Acy5cfSOMfeMN95Pei>

Dressler, R. L. (2005). How Many Orchid Species ? *Selbyana*, 26(1), 155–158.

Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9382-0>

Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>

Escobar, R. (1990). *Native Colombian orchids Volume 1: Acacallis - Dryadella* (Colombian). Medellin, Colombia: Editorial Colina.

Fay, M. F., & Chase, M. W. (2009). Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany*, 104(3), 359–364. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp190>

Gil, K. (2012). *EVALUACION DEL ESTADO DE CONOCIMIENTO Y CONSERVACION DE*

LA FAMILIA ORCHIDACEAE, A TRAVES DE COLECCIONES EX SITU EN EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA, COLOMBIA. Pontificia Universidad Javeriana.

Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8984/GilAmayaKarenSofia2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Govaerts, R. (2003). World Checklist of Selected Plant Families. Retrieved August 1, 2018, from https://wcsp.science.kew.org/namedetail.do?name_id=35967

Griesbach, R. J. (2002). Development of Phalaenopsis orchids for the mass-market. *Trends in New Crops and New Uses*. Retrieved from <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/griesbach.pdf>

Hay, F. R., Merritt, D. J., Soanes, J. A., & Dixon, K. W. (2010). Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164(1), 26–41. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01070.x>

Jiang, N., Zhang, J. X., Da Silva, J. A. T., Duan, J., Liu, H. T., & Zeng, S. J. (2016). Stimulatory effects of sodium hypochlorite and ultrasonic treatments on tetrazolium staining and seed germination in vitro of Paphiopedilum SCBG Red Jewel. *Seed Science and Technology*, 44(1), 77–90. <https://doi.org/10.15258/sst.2016.44.1.13>

Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden*, 75(i–viii), 1182.

Jørgensen, P. M., Ulloa, C., & Maldonado, C. (2006). *Riqueza de plantas vasculares*. La Paz. Retrieved from <http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/staff/PDFs/ulloa/RiquezaPV.pdf>

Kauth, P. J., Kane, M. E., & Vendrame, W. A. (2011). Comparative in vitro germination ecology of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae) across its geographic range. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1), 148–156. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9316-5>

- Kitsaki, C. K., Zygouraki, S., Ziobora, M., & Kintzios, S. (2004). In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*, 23(5), 284–290. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0841-8>
- Knudson, L. (1922). *Nonsymbiotic germination of orchid seeds*. *Botanical Gazette* (Vol. 73). The University of Chicago Press. <https://doi.org/10.1086/521238>
- Leake, J. R. (1994). The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, 127(2), 171–216. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Herbario QCA (Segunda ed, Vol. 2). Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Limartha, I. (1975). Influence of media and seed storage time on orchid germination. *Na Okika O Hawaii Hawaii Orchid J.* Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302760651>
- Lo, S.-F., Nalawade, S. M., Kuo, C.-L., Chen, C.-L., & Tsay, H.-S. (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino—A medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(5), 528–535. <https://doi.org/10.1079/IVP2004571>
- Long, B., Niemiera, A. X., Cheng, Z., & Long, C. (2010). In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9672-1>
- MINTUR. (2013). Ecuador, el primer “País de las Orquídeas” del mundo – Ministerio de Turismo. Retrieved July 31, 2018, from <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-el-primer-pais-de-las-orquideas-del-mundo/>
- Miyoshi, K., & Mii, M. (1998). Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro. *Physiologia Plantarum*, 102(4), 481–486. <https://doi.org/10.1034/j.1399->

3054.1998.1020401.x

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T., Seaton, P., & Pritchard, H. (2011). NUTRITIONAL REQUIREMENTS FOR IN VITRO SEED GERMINATION OF 12 TERRESTRIAL, LITHOPHYTIC AND EPIPHYTIC ORCHIDS. *Journal of Tropical Forest Science*. Forest Research Institute Malaysia. <https://doi.org/10.2307/23616921>
- Nikabadi, S., Bunn, E., Stevens, J., Newman, B., Turner, S. R., & Dixon, K. W. (2014). Germination responses of four native terrestrial orchids from south-west Western Australia to temperature and light treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(3), 559–569. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0507-3>
- OSSSU. (2017). Orchid Seed Science And Sustainable Use. Retrieved August 2, 2018, from <http://osssu.org/HTML/index.html>
- Paredes, E. F. (2012). *Determinación de los protocolos para cultivo in-vitro de las especies Epidendrum schistochilum y Oncidium cultratum*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4072>
- Paul, S., Kumaria, S., & Tandon, P. (2011). An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale in vitro regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. *AoB PLANTS*, 2012. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr032>
- Pedroza, J. A. (2009). Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 17–32. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752009000100003&script=sci_arttext&tlng=pt
- Pereira, A. (2018). *Cattleya iricolor* Rch.f. OrchidRoots. Retrieved from http://orchidroots.com/orchid/35967/species_detail/?tab=gal

- Pierik, R. L. M., Sprengels, P. A., Van Der Harst, B., & Van Der Meys, Q. G. (1988). Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. in vitro. *Scientia Horticulturae*, 34(1–2), 139–153. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(88\)90084-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90084-2)
- Pritchard, H., Poynter, A., & Seaton, P. T. (1999). Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*, 14, 92–101. Retrieved from <http://kdb.kew.org/kdb/detailedresult.do?id=96970>
- Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244(1/2), 149–163. <https://doi.org/10.1023/A:1020246715436>
- Rivera, R. A., Linares, J., & Pilz, G. (2002). *Guía ilustrada de 55 especies de Orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras*. Escuela Agrícola Panamericana. Retrieved from <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/2282>
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=EXijYNw55DUC&oi=fnd&pg=PA893&dq=Roca,+W.,+%26+Mroginski,+L.+\(1991\).+Cultivo+de+tejidos+en+la+Agricultura.+Fundamentos+y+Aplicaciones.+Cali,+Colombia:+CIAT.&ots=0-wmbdTCyv&sig=YgQ0wPF8d1y1XXP6d69pNMUKbU4#v=onepage](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=EXijYNw55DUC&oi=fnd&pg=PA893&dq=Roca,+W.,+%26+Mroginski,+L.+(1991).+Cultivo+de+tejidos+en+la+Agricultura.+Fundamentos+y+Aplicaciones.+Cali,+Colombia:+CIAT.&ots=0-wmbdTCyv&sig=YgQ0wPF8d1y1XXP6d69pNMUKbU4#v=onepage)
- Salazar, S. (2012). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, pp. 69–78. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28122012000100009&script=sci_arttext&tlng=en
- Salazar, S., Amaya, A., & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97–105. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=94332687&lang=es&site=ehost-live>

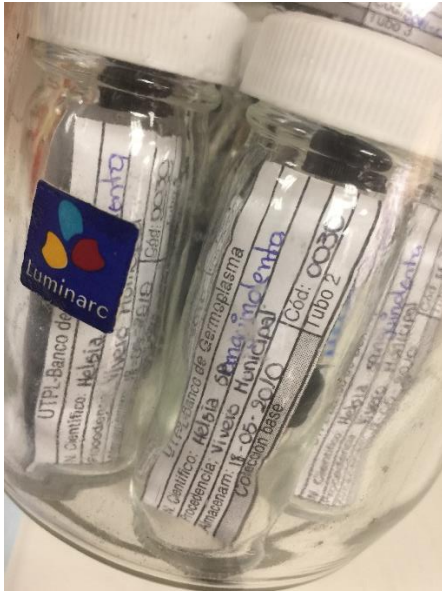
- Salazar, S., & Cancino, A. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(1). Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/776/77624081006/>
- Seaton, P., Hu, H., Perner, H., & Pritchard, H. W. (2010). Ex Situ Conservation of Orchids in a Warming World. *The Botanical Review*, 76(2), 193–203. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9048-6>
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2005). *Growing orchids from seed*. Royal Botanic Gardens, Kew. Retrieved from <https://www.press.uchicago.edu/ucp/books/book/distributed/G/bo9856165.html>
- Segura, S., & Ripa, J. (2009). *Historia de las plantas en el mundo antiguo*. Madrid: Universidad de Deusto. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=rNFspzc-ps0C&oi=fnd&pg=PA14&dq=Munguía,+S.+y+J.+Ripa.,+2009.++Historia+de+las+Plantas+en+el+Mundo+Antiguo+.+Universidad+de+Deusto.+Madrid&ots=FksN3QcJPZ&sig=p c3IEoOs3XlsDS-etEWLnfixq3k#v=onepage&q=Mungu%25C3%25A>
- Serrano, P. Y. (2011). *Germinación de semillas de orquídea cattleya maxima mediante técnicas de laboratorio*. Machala: Universidad Técnica de Machala. Retrieved from <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/475>
- Sierra, R. (1999). *Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental*. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300041635>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (David J. . (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (Third). Academic Press. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=qLciOJaG0C4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Mycorrhizal+symbiosis.&ots=zquSn_QEnM&sig=Z_ vesduklsUENZbOilTcoulrJ2U#v=onepage&q=Mycorrhizal+symbiosis.&f=false
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis*

- (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 159–167. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9104-4>
- Tandon, P., Kumaria, S., & Nongrum, L. (2009). *Conservation and management of plant genetic resources of Northeast India*. Niscair. CSIR. Retrieved from <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/2970>
- Tiza, G. (2010). *Propagación in vitro de las orquídeas Dendrobium, Laelia anceps, Phalaenopsis y Sobralia xantholeuca*. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Retrieved from <https://docplayer.es/6018462-Universidad-veracruzana.html>
- Traore, A., & Guiltinan, M. J. (2006). Effects of Carbon Source and Explant Type on Somatic Embryogenesis of Four Cacao Genotypes. *HortScience*, 41(3), 753–758. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/41/3/753.short>
- Vasudevan, R., & Staden, J. (2010). In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 496–504.
- Vogel, I. N., & Macedo, A. F. (2011). Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(2), 147–155. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9810-9>
- 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>
- Waterman, R. J., & Bidartondo, M. I. (2008). Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1085–1096. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm366>
- Zeng, S., Huang, W., Wu, K., Zhang, J., Teixeira da Silva, J. A., & Duan, J. (2015). In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–14. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.993585>
- Zeng, S., Wang, J., Wu, K., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, J., & Duan, J. (2013). In vitro

- propagation of *Paphiopedilum hangianum* Perner & Gruss. *Scientia Horticulturae*, 151, 147–156. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2012.10.032>
- Zeng, S., Wu, K., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., & Duan, J. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138, 198–209. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2012.02.026>
- Zhang, Y.-Y., Wu, K.-L., Zhang, J.-X., Deng, R.-F., Duan, J., Teixeira da Silva, J. A., ... Zeng, S.-J. (2015). Embryo development in association with asymbiotic seed germination in vitro of *Paphiopedilum armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu. *Scientific Reports*, 5(1), 16356. <https://doi.org/10.1038/srep16356>
- Zotz, G. (2013). The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(3), 453–481. <https://doi.org/10.1111/boj.12010>

ANEXOS

Anexo 1. Semillas de *C. iricolor* almacenadas a 4°C



Anexo 2. Siembra de semillas

