



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TÍTULO DE BIÓLOGO

**Evaluar un proceso de adaptación alternativo en dos especies de orquídeas *Cattleya iricolor* y *Gongora* sp. germinadas *in vitro***

TRABAJO DE TITULACIÓN

**Autor:** Pardo Jaramillo, Sebastián Paúl

**Director:** Lucero Mosquera, Hernán Patricio, Ing.

LOJA – ECUADOR

2020



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-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>*

2020

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniero,  
Hernán Patricio Lucero Mosquera  
**Docente de la Titulación**

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación, ***“Evaluar un proceso de adaptación alternativo en dos especies de orquídeas Cattleya iricolor y Gongora sp. germinadas in vitro.”*** realizado por Sebastián Paúl Pardo Jaramillo; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, enero del 2020

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Sebastián Paúl Pardo Jaramillo declaro ser el autor del presente trabajo de fin de titulación: Evaluar un proceso de adaptación alternativo en dos especies de orquídeas *Cattleya iricolor* y *Gongora* sp. germinadas *in vitro*, de la Titulación Biología, siendo el Ing. Hernán Patricio Lucero Mosquera director del presente trabajo; 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”

Expreso tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las IES, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor. Así mismo autorizo a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

f. ....

Autor: Sebastián Paúl Pardo Jaramillo.  
Cédula: 1104749690

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres: Ramiro Pardo y Rosalba Jaramillo, quienes durante toda mi vida han sido mi más grande apoyo, ustedes son quienes merecen toda mi admiración por sacar adelante nuestro hogar y por inculcarme valores como el respeto, el trabajo duro y el amor a las ciencias biológica. ¡Todo se lo debo a ustedes!

A mi querida hermana María José Pardo, quien siempre ha sido como una segunda madre para mí, a quien admiro por su forma de trabajar tan silenciosa, por dedicarme su tiempo, por ser mi apoyo y mi primera y eterna amiga... ¡Nunca me faltes!

A la memoria de Cristopher A. Loaiza, a pesar de que ha transcurrido tiempo desde tu pronta partida, querido hermanito, no te he olvidado. Siempre llevo conmigo la promesa que te hice, de que cada logro que consiga es tanto tuyo como mío. De modo que este trabajo es un logro para ti también... ¡Cuanto te extraño!

A la memoria de mi abuelito Manuel A. Jaramillo, a pesar de que la vida no nos dejó compartir un poco más, donde quiera que estés espero te encuentres orgulloso de mí... ¡Gracias por cuidar de nuestra familia!

A Antonio C. Maldonado, tu constante apoyo y sugerencias permitieron que no me diera por vencido en el desarrollo de este trabajo, tú formaste parte de él con cada uno de tus consejos y observaciones... ¡Sé que podré contar contigo siempre!

A mi mejor amigo Juan F. Rojas, quién siempre ha sabido darme todo su apoyo, me ha ayudado a levantarme de las peores situaciones. Quiero que este trabajo te inspire a buscar conseguir todas las metas que te propongas por más imposibles que parezcan... ¡Jamás te des por vencido!

Sebastián Pardo.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Dios por haberme acompañado y estar conmigo en todo momento, gracias porque a pesar de las dificultades que se me han presentado en la vida, jamás me ha abandonado.

A mi padre Ramiro Pardo, quién siempre ha querido lo mejor para mí, me ha apoyado en cualquier circunstancia o situación que me presente, gracias por enseñarme tantas cosas a diario, en especial te agradezco por ser mi amigo y por inculcarme el amor al trabajo, al hogar y por enseñarme que el dinero no es importante sino el encontrar alguien que nos ame y se quede con nosotros siempre. Gracias por haberme dado a mi madre.

A mi madre Rosalba Jaramillo, quién siempre ha estado conmigo, quien me ha cuidado toda la vida, gracias por inculcarme el amor a la biología, a ti te debo el amor por mi carrera y por el trabajo. Te agradezco por enseñarme el amor hacia mi hogar, el respeto hacia mi padre y por supuesto, por todas y cada una de las formas que tienes para enseñarme tu amor. Siempre llevo conmigo todos tus consejos, cuánta razón tienes siempre.

A mi querida hermana María José Pardo, por apoyarme en todas las cosas que he hecho a lo largo de mi vida, por cuidarme desde niño y ser mi más grande amiga. Gracias por apoyarme a lo largo de mi carrera y hacer que no pierda la fe en mí y mis conocimientos.

Al Dr. Darío J. Cruz por haberme ayudado y apoyado en todo lo que significó conseguir este trabajo, gracias por haber sido, además de mi profesor, un amigo. Al Ing. Hernán Lucero, por haber auspiciado esta investigación y haber sido un gran mentor, gracias por la confianza impuesta en mí. Ustedes son sin duda una muestra clara de que la docencia implica más que conocimientos, implica amor y entrega. Les estaré eternamente agradecido por todo.

A mis amigas Jessica M. Luna y a Gabriela V. Mora, porque dentro de estos cinco años de estudio me han dado su amistad, su apoyo y confianza. Gracias por enseñarme lo que es el apoyo y amor incondicional. Les debo tanto, espero seguir contando con todo su amor durante toda mi vida.

A mis amigos Antonio C. Maldonado y a Juan F. Rojas, por darme todo su apoyo y cariño, se han convertido en una parte vital de mi vida. Gracias por estar conmigo en cualquier circunstancia, por jamás permitir que perdiera la fe en mí. Y por sobre todo por amarme incondicionalmente.

Sebastián Pardo

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |     |
|---|-----|
| CARÁTULA.....   | Err |
| or! Bookmark not defined.   |     |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....               | ii  |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....                      | iii |
| DEDICATORIA.....  | iv  |
| AGRADECIMIENTO.....   | v   |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS .....  | 1   |
| ÍNDICE DE FIGURAS. ....   | 4   |
| ÍNDICE DE TABLAS .....  | 5   |
| RESUMEN.....  | 6   |
| ABSTRACT .....  | 7   |
| CAPITULO I MARCO TEÓRICO .....  | 10  |
| 1.1. Familia Orchidaceae.....   | 11  |
| 1.1.1. Taxonomía.....   | 11  |
| 1.1.2. Distribución en Ecuador.....                                   | 11  |
| 1.1.3. Endemismo.....   | 12  |
| 1.1.4. Género <i>Cattleya</i> .....                                   | 13  |
| 1.1.4.1 Generalidades.....  | 13  |
| 1.1.4.1.1 <i>Condiciones ambientales del género Cattleya</i> .....    | 13  |
| 1.1.4.2. Distribución .....   | 14  |
| 1.1.4.3. Taxonomía.....   | 14  |
| 1.1.4.4. <i>Cattleya iricolor</i> .....                               | 14  |
| 1.1.5. Género <i>Gongora</i> .....                                    | 14  |
| 1.1.5.1. Generalidades.....   | 14  |
| 1.1.5.1.1 <i>Condiciones ambientales para el género Gongora</i> ..... | 15  |
| 1.1.5.2. Distribución .....   | 15  |
| 1.1.5.3. Taxonomía.....   | 16  |
| 1.2. Cultivo in vitro.....  | 16  |
| 1.2.1. Germinación de semillas mediante cultivo in vitro.....         | 16  |
| 1.2.2. Medios de cultivo.....   | 17  |
| 1.2.2.1. Medios Simbióticos.....                                      | 17  |
| 1.2.2.2. Medios Asimbióticos.....                                     | 17  |
| 1.2.3. Condiciones ambientales <i>In vitro</i> .....                  | 18  |
| 1.2.3.1. Humedad.....   | 18  |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 1.2.3.2.  | Luz.....  | 18        |
| 1.2.3.3.  | Temperatura.....  | 19        |
| 1.2.3.4.  | Fase gaseosa .....  | 19        |
| 1.2.3.5.  | Asepsia.....  | 20        |
| 1.2.4.  | Fisiología de las especies vegetales In vitro.....                      | 20        |
| 1.3.  | Climatización.....  | 22        |
| 1.3.1.  | Invernadero.....  | 23        |
| 1.3.2.  | Condiciones Ambientales Ex vitro .....                                  | 23        |
| 1.3.2.1.  | Humedad.....  | 23        |
| 1.3.2.2.  | Luz.....  | 24        |
| 1.3.2.3.  | Temperatura .....   | 24        |
| 1.3.2.4.  | Sustrato.....   | 25        |
| 1.4.  | Cuidados.....   | 25        |
| 1.4.1.  | Fertilización y riego.....  | 25        |
| 1.4.2.  | Fumigación.....   | 25        |
| <b>CAPÍTULO II .....</b>  |   | <b>26</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   |   | <b>26</b> |
| 2.1.  | Selección de individuos vegetales.....                                  | 27        |
| 2.2.  | Sitio de estudio.....   | 27        |
| 2.3.  | Proceso de climatización .....  | 27        |
| 2.4.  | Análisis de datos:.....   | 30        |
| <b>CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  |   | <b>31</b> |
| 3.1.  | Comportamiento de las especies durante el proceso de climatización..... | 32        |
| 3.1.1.  | Climatización de <i>Cattleya iricolor</i> .....                         | 32        |
| 3.1.2.  | Climatización de <i>Gongora</i> sp.....                                 | 32        |
| 3.2.  | Supervivencia de individuos.....  | 33        |
| 3.3.  | Presencia de estrés en las especies climatizadas .....                  | 34        |
| 3.4.  | Discusión .....   | 36        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   |   | <b>39</b> |
| <b>RECOMENDACIONES .....</b>  |   | <b>40</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  |   | <b>41</b> |
| <b>Anexo 1. Descripción detallada de las actividades desarrolladas durante las 11 semanas de estudio.....</b> |   | <b>42</b> |
| <b>Anexo 2. Bitácora para la toma de datos .....</b>  |   | <b>45</b> |
| <b>Anexo 3. Tabla de temperaturas y humedad en el invernadero y en los puntos de climatización.....</b>       |   | <b>46</b> |

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>Anexo 4.</b> | <b>Resumen fotográfico del proceso de climatización llevado a cabo.....</b> | <b>47</b> |
| <b>Anexo 5.</b> | <b>Resumen fotográfico acerca de señales de estrés en individuos.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>Anexo 6.</b> | <b>Composición del fertilizante usado.....</b>                              | <b>49</b> |
|                 | <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                      | <b>50</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS.

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Representación anatómica de <i>Cattleya labiata</i> .....  | 13 |
| <b>Figura 2.</b> Representación anatómica de <i>Gongora</i> sp. ....  | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Imagen tomada con microscopio electrónico del envés de la hoja de <i>Chrysanthemum morifolium</i> . (1) Individuo crecido en invernadero (2) Individuo germinado in vitro..... | 21 |
| <b>Figura 4.</b> Ubicación del sitio de estudio dentro del Campus UTPL .....  | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema del proceso de aclimatización de <i>C. iricolor</i> y <i>Gongora</i> sp.....   | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Colocación de microinvernadero, con los individuos a aclimatar, en el invernadero (Semana1).....   | 28 |
| <b>Figura 7.</b> Individuos trasplantados de frascos de cultivo a macetas. ....   | 29 |
| <b>Figura 8.</b> Número de individuos, de <i>C. iricolor</i> y <i>Gongora</i> sp., que sobrevivieron y perecieron en el proceso de climatización. ....  | 33 |
| <b>Figura 9.</b> Incidencia de clorosis, marchitamiento y necrosis en individuos de <i>Gongora</i> sp, durante las 11 semanas de estudio. ....  | 34 |
| <b>Figura 10.</b> Individuo de <i>Gongora</i> sp., con presencia de clorosis durante la primera semana de estudio .....   | 35 |
| <b>Figura 11.</b> Incidencia de clorosis, marchitamiento y necrosis en individuos de <i>Cattleya iricolor</i> , durante las 11 semanas de estudio. ....   | 35 |
| <b>Figura 12.</b> Individuo de <i>C. iricolor</i> con presencia de clorosis en una de sus hojas durante las semanas finales del estudio.....  | 36 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Cuadro indicativo para expresar el % de individuos saludables, con estrés y muertos en las 11 semanas de estudio.....                                     | 30 |
| <b>Tabla 2.</b> Porcentaje de individuos sanos, con estrés y muertos de la especie <i>Cattleya iricolor</i> .....   | 32 |
| <b>Tabla 3.</b> Porcentaje de individuos sanos, con estrés y muertos de <i>Gongora</i> sp. ....   | 33 |
| <b>Tabla 4.</b> Descripción de las actividades realizadas durante el proceso de climatización en el lapso de 11 semanas.....  | 42 |
| <b>Tabla 5.</b> Esquema de la bitácora para la toma de datos en la mañana y tarde.....  | 45 |
| <b>Tabla 6.</b> Promedio de temperatura y humedad relativa tomadas tanto en invernadero como en puntos del invernadero donde se realizó el proceso de climatización. .... | 46 |

## RESUMEN

Las orquídeas, debido a su singularidad en flores, colores y texturas han despertado un creciente interés en ámbitos económicos siendo extraídas y sus hábitats destruidos generando una reducción de sus poblaciones naturales. Por lo que se ha postulado a los cultivos *in vitro* para la generación de orquídeas de manera masiva. Sin embargo, existe la fase de climatización, donde produce un mayor número de muertes de individuos dado que no logran adaptarse a las nuevas condiciones. Por lo que el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar un método alternativo para la adaptación a condiciones *ex vitro* de *Cattleya iricolor* y *Gongora* sp. producidas *in vitro*. Se evaluó el comportamiento de 9 individuos de cada especie a condiciones *ex vitro* de un invernadero aplicando un proceso de climatización paulatino generando una adaptación no tan agresiva a los individuos. Los resultados obtenidos, mostraron un porcentaje de 66.66% de supervivencia para *C. iricolor* y 88.88% para *Gongora* sp. indicando que el proceso paulatino de climatización otorga resultados satisfactorios obedeciendo la premisa de lograr la supervivencia del mayor número de individuos.

**Palabras clave:** climatización, orquídeas, *Gongora* sp., *Cattleya iricolor*, invernadero

## ABSTRACT

Orchids, due to its peculiar flowers, colors and textures, have provoked an increasing interest on economic fields. This has caused them to be extracted and their habitats to be destroyed, causing a decrease on their natural population. Therefore, the idea of *in vitro* crops has risen in order to generate orchids in massive numbers. However, these is the phase of air conditioning. In this process generate a higher number of subject decease since they do not achieve to adapt to new air conditions. For this reason, the present study has the objective of analyzing an alternative adaptation method to *ex vitro* conditions of *Cattleya iricolor* y *Gongora* sp., the behavior of 9 individuals of each species was evaluated under *ex vitro* conditions. The method applied was a process of gradual air conditioning offering a non-aggressive adaptation to the entities. The results gathered showed a percentage of 66.66% of survival for *C. iricolor* and 88.88% for *Gongora* sp. This demonstrated that the gradual air conditioning process provides favorable results following the premise of achieving the survival of a great number of individuals.

**Key words:** air conditioning, orchids, *Gongora* sp., *Cattleya iricolor*, greenhouse.

## INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae está catalogada como una de las familias botánicas más grandes en todo el mundo, albergando un total de 750 géneros y alrededor de 25.000 y 30.000 especies (Thorpe & Yeung, 2011). Dado su alto rango de distribución pueden ser encontradas en diferentes tipos de hábitats, los cuales abarcan bosques tropicales incluso pastizales (Cribb & Whistler, 1996). Ecuador es el país que registra una mayor diversidad de estas especies ya que representan un 14% del total de especies vasculares que se conocen dentro del territorio. En la actualidad, aún se siguen incorporando nuevas especies de la mano de botánicos como Lou Jost el cual ha registrado, en áreas cercanas al río Pastaza, un total de 90 nuevas especies de orquídeas (Pearce, 2002).

Su amplia diversidad está conferida a la capacidad evolutiva que poseen, generando así variaciones en el tamaño, forma, textura y el color de las flores (Nagaraju & Mani, 2005), lo que las convierte en especímenes muy apreciados en aspectos tanto ornamentales como económicos (Calderón, 2007), esto se traduce en un alto riesgo de extinción o reducción en su población en estado silvestre, debido a su extracción, excesiva e ilegal, de ambientes naturales con fines mercantiles y por la destrucción de bosques naturales (Salazar, Benavides, Trespalacios, & Pinzón, 2010). Las especies *Cattleya iricolor* y *Gongora* sp., que fueron seleccionadas para este ensayo, están catalogadas dentro de los géneros sometidos a las presiones antrópicas previamente descritas, dado su demanda comercial y extracción con fines ornamentales dentro del país (Ministerio del Ambiente, 2015; Sánchez & Rodríguez, 2018).

Ante esta creciente problemática, es crucial llevar a cabo acciones que generen un manejo sustentable de las orquídeas en el Ecuador, por lo que se postula a la micropropagación, por medio de los cultivos *in vitro*, especialmente asimbióticos, para lograr una reproducción de orquídeas de manera masiva, en condiciones controladas, a partir de semillas o tejidos vegetales lo que asegura su conservación (Díaz & Salgado-Garciglia, 2006; Kunakhonnuruk, Inthima, & Kongbangkerd, 2018; Pospisilovva, Ticha, Kadlecek, Haisel, & Plzákova, 1999), proporcionando además, un apoyo a la escasa germinación que existe en el medio natural, pues a pesar de que las cápsulas de las orquídeas contienen alrededor de dos a tres millones de semillas, solo llegan a germinar de 2 a 3% del total existente (Luan, Thien, Khiem, & Nhut, 2006)

La técnica anteriormente indicada, se ve perjudicada con la pérdida o daño de las especies vegetales cuando son expuestas a condiciones *ex vitro* con el propósito de reintroducirlas a su ambiente natural (Pospisilovva et al., 1999). Considerada como la fase crítica, el proceso de climatización de especies vegetales, obtenidos mediante germinación *In vitro* o cultivo de

tejidos, es un proceso trascendental en micropropagación dado que las especies vegetales no pueden tolerar el cambio de condiciones ambientales existentes en los frascos de cultivo a las que posee un invernadero, las cuales son: una alta radiación y baja humedad en el aire lo que genera anomalías en el crecimiento y desarrollo (Sandoval, Brenes, & Pérez, 1991). Un ejemplo de lo que se suscita en las especies vegetales que no fueron sometidas al proceso de climatización es la investigación realizada por Teixeira da Silva et al., 2015 con el género *Dendrobium* (Orchidaceae) donde los individuos, al encontrarse en condiciones diferentes a las de sus frascos, éstas no crecen lo suficiente y no presentan la cantidad necesaria de raíces fuertes para sobrevivir al medio. Cabe destacar que al omitir el proceso de climatización representaría además una pérdida del tiempo invertido en lograr la germinación de semillas y material utilizado dentro de los laboratorios (Cardoso, Rossi, Rosalem, & Teixeira da Silva, 2013)

El presente trabajo consta de tres capítulos, donde se logra explicar y generar un proceso paulatino de adaptación de dos especies de orquídeas, *Gongora* sp., y *Cattleya iricolor*, a condiciones *ex vitro* (invernadero). El primer capítulo describe, de manera detallada, las especies seleccionadas para el estudio, además establece conocimientos primordiales acerca de las condiciones que existen tanto dentro de un frasco de cultivo *in vitro* como las existentes en el invernadero, recalcando las dificultades a nivel morfológico que presentan las especies germinadas *in vitro*. El segundo capítulo, enmarca los materiales y métodos que se emplearon desde la selección de los individuos de acuerdo con su tamaño hasta los procedimientos llevados a cabo en cada semana para lograr una climatización exitosa. El tercer capítulo expone los resultados que se obtuvieron de todo el proceso, indicando el número de individuos que murieron e individuos que lograron sobrevivir.

La Universidad Técnica Particular de Loja ha realizado ensayos de aclimatación, en donde se extraía a la plántula desde el medio de agar y se trasplantaba en un sustrato sin ningún proceso adaptativo, dando como resultado la muerte de todos los individuos (Lucero - Mosquera *com. pers*). Por lo que, basándonos en dichos antecedentes, el presente trabajo nace bajo el objetivo de evaluar los métodos alternativos para la adaptación a condiciones *ex vitro* de plantas *in vitro*. Además, se busca monitorear el comportamiento de dos especies de orquídeas *in vitro* en su adaptación a condiciones *ex vitro*, evaluar el porcentaje de supervivencia de orquídeas germinadas *in vitro* en su proceso de adaptación a condiciones *ex vitro*, generar recomendaciones para la optimización del proceso de adaptación a condiciones *ex vitro* de plantas producidas *in vitro*

**CAPITULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## **1.1. Familia Orchidaceae.**

La palabra orquídea, tiene sus orígenes en el vocablo griego *orchis*, su significado hace alusión a testículo dado los pseudobulbos de algunas especies y al uso con fines medicinales, ya que eran usadas como afrodisíaco o como potenciadores de la fertilidad. Con el transcurso del tiempo, el término se transformó a *Orchidaceae*, nombrando así a la familia botánica más numerosa del Reino Vegetal (Segura Munguía & Torres Ripa, 2009)

### **1.1.1. Taxonomía.**

La clasificación, según el (Integrated Taxonomic Information System (ITIS), 2008), se establece:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

### **1.1.2. Distribución en Ecuador.**

El Ecuador tiene catalogadas 3.784 especies de orquídeas en estado natural, posicionándolo como el país con mayor número de especies considerando que es el más pequeño en Sur América (Calaway Dodson, 2003). Su rango de distribución se establece desde los 300 hasta 3000 m s.n.m, pudiendo encontrar, en este intervalo, alrededor de 3000 especies, es decir, el 77% de especies en el territorio nacional (Meisel & Woodward, 2005).

En una perspectiva regional, los 219 géneros de orquídeas que posee el país, se distribuyen de la siguiente manera: la Sierra con 2322 especies, Costa con 563 especies y la Amazonía con 579 especies (Jorgensen & León- Yáñez, 1999). El alto número de especies en el territorio nacional se debe a la existencia de una gran diversidad de microclimas y la escasa distancia que existe entre ellos, atribuyendo esto, a la ubicación del país en la línea ecuatorial y a que se encuentra atravesado a la Cordillera de los Andes que provoca una alta diversidad al generar distintos pisos climáticos (Portilla, 2007).

Otros factores que considerar son los aspectos físicos propios de las orquídeas, que han permitido un amplio radio de adaptación. Entre estos podemos encontrar:

- Epifitismo: que representa la forma de vida de géneros de orquídeas que poseen un alto estándar de especiación, permitiendo localizaciones divergentes en los árboles.

- La dispersión de semillas por el viento, las cuales al ser muy pequeñas y livianas pueden ser transportadas a grandes distancias.
- La gran cantidad de semillas producidas durante un único suceso polínico, llegando a generar, en un contexto general, miles de semillas. Además, las orquídeas poseen una variedad de adaptaciones para un gran número de polinizadores, en ciertos casos, una sola especie de polinizador actúa exclusivamente para una especie de orquídea.
- La flexibilidad genética: donde se establece que los controles genéticos que ayudan a conservar la naturaleza de la especie y disminuir cambios en la misma, pueden romperse de manera natural, dando como resultado la gran variedad de especies que se conocen en la actualidad.

Dichas peculiaridades, han facilitado la adaptación de las orquídeas a regiones como las estribaciones de los Andes donde presenta mayor endemismo, sin embargo, en regiones como la Amazonía, es común encontrar no más de 100 especies en un lugar determinado de estudio (Gentry & Dodson, 1987).

### **1.1.3. Endemismo.**

Notablemente, la selva amazónica es sin duda el hábitat de una gran diversidad de especies, no obstante, un gran número de plantas vasculares de Sur América está contenida en los bosques montanos de los Andes (Ataroff, 2001). Ecuador, ha reportado que alrededor del 48% de especies están confinadas a alturas de entre 900 y 3000m s.n.m (Balslev, 1988), lo que reafirma la idea de que los bosques tropicales montanos son abundantes en especies endémicas, dado que el 48% de las especies catalogadas en dichas elevaciones son exclusivas del país (Kruckeberg & Rabinowitz, 1985).

De acuerdo a (Endara, Williams, & León, 2009), la familia Orchidaceae contribuye con alrededor de un tercio al fitoendemismo del Ecuador, ya que 1707 especies de orquídeas son catalogadas como exclusivas del territorio nacional. Recalca, además, que los géneros con mayor contribución a la flora endémica son: *Lepanthes* con 240 especies, *Pleurothallis sensu lato* con 2015 especies, *Stelis sensu stricto* con 223 especies, *Epidendrum* con 205 especies, *Masdevallia sensu lato* con 151 especies, de lo cual se resalta que el 82% de especies son de hábito epífito, 8% terrestres y 5% son facultativas. Pero a pesar del estatus endémico que poseen, se plantea que 1455 especies se encuentra bajo amenaza el 2% se encuentran En peligro crítico, 11% En peligro y la gran mayoría (87%) en estado vulnerable (León et al., 2012).

#### 1.1.4. Género *Cattleya*

##### 1.1.4.1 Generalidades.

El género *Cattleya* está constituido por un total de 122 especies y 84 híbridos naturales, su denominación fue dada de la mano de John Lindley en 1824 quien propuso el nombre a este género en honor a William Cattley al haber sido la primera persona que obtuvo la floración de la especie *Cattleya labiata* (Hetherington & Ramírez, 2016). Se distribuye ampliamente desde América central, las Antillas hasta América del Sur, de hábito epífita en su mayoría, posee pseudobulbos que forman una delgada membrana, sus flores poseen variados tamaños con colores que van en tonos de rosa, blanco, púrpura y amarillo, sus hojas son de gran grosor y con estrías (Oak Hill Gardens, 2018a)



**Figura 1.** Representación anatómica de *Cattleya labiata*

**Fuente:** Higgins & Alrich, 2016

**Elaboración:** Higgins y Alrich, 2016

##### 1.1.4.1.1. Condiciones ambientales del género *Cattleya*.

Oak Hill (2018a) establece que las especies pertenecientes al género *Cattleya* necesitan:

- **Temperatura:** En el día, se adaptan a temperaturas entre 70 °F y 80 °F (21 °C a 27 °C) y en la noche se requiere temperaturas entre los 55 °F y 60 °F (13 °C y 16°C). La mayoría de las especies presenta afinidad por los climas tropicales
- **Luz:** necesita gran cantidad de luz indirecta, ya que tienden a quemarse con la luz solar
- **Humedad:** Se adapta a niveles de humedad entre 50% y 70%.

#### **1.1.4.2. Distribución**

El género *Cattleya* se encuentra distribuido desde Costa Rica hasta el Argentina, abarca diferentes hábitats, especialmente en a alturas entre los 100 a 2000m s.n.m (Van Den Berg, 2009).

#### **1.1.4.3. Taxonomía.**

La clasificación, según el (Integrated Taxonomic Information System (ITIS), 2008), se establece:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laliinae

Género: *Cattleya*

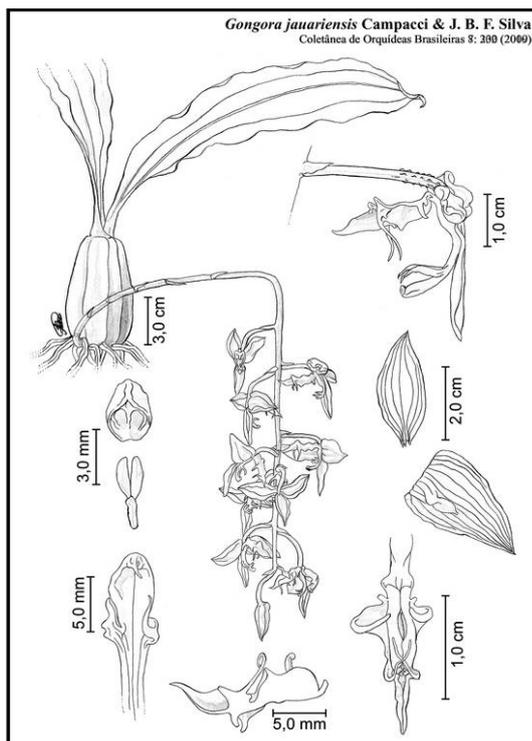
#### **1.1.4.4. *Cattleya iricolor*.**

*Cattleya iricolor* es una especie perteneciente a la familia Orchidaceae, de habito epífita, destacada por presentar sépalos y pétalos de color amarillo cremoso y su labelo es blanco con un patrón de colores lavanda y amarillos. Es una especie nativa de Ecuador y Perú. En Ecuador se la pude encontrar en elevaciones de entre 0 a 500m s.n.m y 500-1000m s.n.m, restringida a la región Amazónica, en las provincias de: Morona Santiago, Napo, Sucumbios (Ministerio del Ambiente, 2015; Missouri Bonanical Garden, 2009).

#### **1.1.5. Género Gongora.**

##### **1.1.5.1. Generalidades.**

El género *Gongora*, perteneciente a la familia Orchidaceae, abarca un total de 60 a 70 especies incluyendo subespecies (Jenny, 1993). Su nombre fue atribuido al nombre del Virrey de Nueva Granada (Colombia y Ecuador) Antonio Caballero y Gongora luego de que la especie haya sido descubierta en excursiones de los botánicos Dombey, Ruiz y Pavón (American Orchids Society, 2010). Son individuos de hábito epífita, sus raíces son aéreas, largas y delgadas de color blanco, presenta pseudobubos ovoidales y con surcos muy notorios, hojas son de forma lanceoladas de una por bulbo (Hetherington-Rauth & Ramírez, 2015) y con inflorescencias colgantes que nacen de la base de los pseudobulbos (Oak Hill Gardens, 2018b).



**Figura 2.** Representación anatómica de *Gongora* sp

**Fuente:** Swiss Orchid Foundation at the Herbarium

Jany Renz, 2016

**Elaboración:** Swiss Orchid Foundation at the Herbarium Jany Renz, 2016.

#### 1.1.5.1.1 *Condiciones ambientales para el género Gongora.*

Oak Hill (2018b) establece que las condiciones ambientales para el género *Gongora* son:

- **Temperatura:** Las especies del género *Gongora* tiene preferencia, durante el día, por temperaturas entre 70 °F y 85 °F, equivalente a 21 y 29 °C. No son capaces de soportar temperaturas frías por un largo periodo, por lo que las temperaturas, durante la noche, deben encontrarse en temperaturas de 55 °F y 60°F equivalentes a 13 °C y 16 °C
- **Luz:** Los individuos pertenecientes al género, están adaptadas a la claridad, pero no de manera directa.
- **Humedad:** Las especies del género *Gongora* necesitan entre 50 y 70% de humedad todo el día y toda la noche.

#### 1.1.5.2. *Distribución*

Las orquídeas del género *Gongora* se encuentran en la región Neotropical, pudiendo llegar desde el sur de México hasta a Sur América precisamente en las pendientes de las Cordillera de los Andes (Jenny, 1993). En Ecuador se encuentran 16 géneros que se distribuyen en los

Andes y a ambos lados de la misma, en las provincias de: Cotopaxi, Pichincha, Esmeraldas, Los Ríos, Morona Santiago, Napo, Zamora Chinchipe, Sucumbios, Tungurahua, Bolívar, El Oro, Guayas, Manabí, Carchi, pudiendo ubicarse a alturas de 0 a 500 y de 500 a 1000m s.n.m (Missouri Botanical Garden, 2009)

#### **1.1.5.3. Taxonomía.**

La clasificación, según el (Inventaire National du Patrimoine Naturel, s.f.), se establece:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Tribu: Cymbidieae Pfitzer

Subtribu: Stanhopeinae Benth

Género: *Gongora*.

### **1.2. Cultivo in vitro.**

Se establece al cultivo *in vitro*, como el conjunto de técnicas desarrolladas de modo aséptico, que son usadas para el manejo de plantas, órganos, tejido y células que permitan generar una población de plantas, bloqueando el fenómeno de una reproducción sexual normal (Krikorian, 1991).

Entre las ventajas señaladas por Villalobos & Thorpe (1991) se encuentran:

- Aumento en el número de individuos vegetales derivados de la planta madre
- Descenso en el tiempo de multiplicación
- La probabilidad de llevar a cabo la germinación de grandes cantidades de plantas en un espacio reducido a costos módicos.
- Poder generar rápidamente mayor número de individuos de especies donde existan pocos individuos.

#### **1.2.1. Germinación de semillas mediante cultivo in vitro.**

La germinación de semillas en condiciones *in vitro* es una de las técnicas con mayor uso para lograr la propagación de plantas superiores (Palmer, Newton, Doyle, Thomson, & Stewart, 1997). La germinación *in vitro* aporta con mayores beneficios, en contraste con la germinación natural, dado que puede suplir los problemas de inhibición total del proceso germinativo, aumentar su tasa y homogeneizarla (López & González, 1996).

En las orquídeas existe un problema en la germinación de sus semillas, descubierto el botánico Reissek en 1847, quién indica la presencia de un hongo micorrízico (en las raíces de las orquídeas), basiomicete clasificado en el género *Rhizoctonia*, proporcionando información de que la germinación de las semillas de orquídeas requiere una simbiosis hongo-planta. Sin embargo Knudson, en 1921 logra determinar que es posible la germinación asimbiótica de orquídeas en medios simples, en este caso el medio agar-agar con alto contenido de azúcar (Arditty, 1967).

### **1.2.2. Medios de cultivo.**

#### **1.2.2.1. Medios Simbióticos.**

Bajo condiciones naturales, la relación simbiótica entre orquídeas y hongos micorrizicos, surge debido a que las semillas de estas especies carecen de reservas suficientes por lo que el hongo se asocia con el propósito de brindar los nutrientes necesarios para la germinación (Richardson, Peterson, & Currah, 1992). Las orquídeas fotosintéticas son predominantes en la región tropical, pero en sus primeros estadios de desarrollo, éstas son micoheterotróficas llegando a adoptar hábitos mixotróficos al llegar a su estado adulto (Dearnaley, 2007).

El proceso para llevar a cabo la germinación de semillas *in vitro* requiere de una correcta selección de la cepa de micorriza que será sembrada en el medio. Para posteriormente el hongo crezca y se desarrolle logrando colonizar a la semilla, es aquí donde se genera la relación simbiótica (McKendric, 2000). Estudios como el realizado por Otero & Bayman (2009) comparan los cultivos *in vitro* tanto simbióticos como asimbióticos concluyen que el aplicar cultivos simbióticos representan una verdadera ventaja al reducir el tiempo de germinación y proveyendo mayor desarrollo de los protocormos.

#### **1.2.2.2. Medios Asimbióticos.**

Creado por Lewis Knudson, los medios asimbióticos *in vitro* fueron y son los primeros ensayos para lograr la germinación de semillas, en el caso de orquídeas, en ausencia de una simbiosis micorrízica, pues estos medios de cultivo son simples y están provistos de sales minerales y azúcares (Knudson, 1946; Salazar, 2012). La acogida a esta técnica tiene lugar dado que permite el desarrollo de un gran número de individuos en un medio artificial controlado y que puede ser alterado para suplir los requerimientos de cada especie (Rodríguez, 2013).

La germinación asimbiótica es mayormente usada en la propagación de orquídeas tropicales cuyo proceso germinativo es mucho más sencillo (Rodríguez, 2013). El medio conocido como MS (Murashige y Skoog), ha demostrado ser un medio óptimo para la germinación y desarrollo de un gran número de especies de orquídeas, pues en su composición se encuentran: sales

inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos proporcionando un alto contenido de nitrógeno y potasio (Murashige & Skoog, 1962).

### **1.2.3. Condiciones ambientales *In vitro*.**

#### **1.2.3.1. Humedad.**

La humedad en los cultivos *in vitro* se denomina humedad relativa y es considerada la cantidad de vapor de agua que puede ser medida en una atmósfera gaseosa. Tomando en consideración que los frascos de cultivo se encuentran herméticamente cerrados, la humedad relativa en su interior podría encontrarse en un rango de entre 98-99.5% ya que es dependiente de la temperatura del medio externo y puede llegar a equipararse con ésta. Es recomendable que los cultivos no sean hiperhídricos al crecer en condiciones de alta humedad, siendo favorable el desarrollo y crecimiento de los cultivos rodeados de aire que no se encuentra completamente saturado (George, Hall, & Klerk, 2008). Ciertos estudios recomiendan un nivel de humedad relativa para orquídeas, como el de Niveló & Rojas (2019) quienes obtuvieron resultados satisfactorios de germinación de semillas de *Epidendrum* con una humedad relativa de entre 60-75%.

#### **1.2.3.2. Luz.**

En los diferentes estudios realizados con orquídeas, con fines de micropropagación y conservación, se ha dejado al descubierto la importancia y papel importante que juega la luz en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* (Gupta & Jatothu, 2013). La fuente de luz, que se provee a los ensayos de micropropagación, es de naturaleza artificial bajo condiciones de temperatura controlada. La fuente lumínica con mayor acogida son los tubos fluorescentes, los cuales al irradiar luz en todos los estantes dentro del laboratorio evitan que se genere un gasto en crear condiciones de calor dentro del cuarto (George et al., 2008; Gomes da Rocha, Pedroso de Oliveira, Bueno, & Lyra dos Santos, 2010).

Tanto el desarrollo como el crecimiento de los individuos vegetales, están bajo control de la luz debido a dos procesos muy importantes: la fotosíntesis, a pesar de que en los cultivos *in vitro* es relativamente baja dado que la mayoría de cultivos son nutridos por sacarosa, y la fotomorfogénesis donde la luz promueve la forma y desarrollo de las estructuras vegetales (George et al., 2008). Un factor a tomar en cuenta es los fotoperiodos, es decir, la cantidad de luz que recibe el cultivo en determinada cantidad de tiempo, puesto que el fotoperiodo puede ayudar a evitar la dormancia o proveer, en algunas especies, un manejo del ciclo reproductivo-vegetativo, para llevarlo a cabo se recomienda un fotoperiodo de 16/8 D/N (Día/Noche) (Preece & Sutter, 1991).

En las zonas tropicales, tanto el fotoperiodo como la temperatura no presentan un amplio rango de variación, sin embargo se sabe que existen especies con la carencia de soportar un

cambio mínimo en estos factores (Gupta & Jatothu, 2013). Un ejemplo de este fenómeno lo establece Paula, Figueiredo, & Kerbauy, (2004), pues en un ensayo con la especie *Psygmorchis pusilla*, una orquídea epífita tropical, cuya floración fue inhibida cuando fue expuesta a 20h de fotoperiodo, sin embargo en fotoperiodos de 12/12 D/N (Día/Noche) existió una correcta floración.

#### **1.2.3.3. Temperatura.**

La temperatura tiene efecto en procesos de carácter fisiológico, en los cultivos vegetales, como son la respiración, fotosíntesis y su desarrollo. Generalmente la temperatura, en los cultivos *in vitro*, tiene rango aproximados de entre 20 °C y 27 °C pudiendo variar de acuerdo a los requerimientos del estudio (Kumar & Reddy, 2011). Por otro lado en zonas tropicales muchas especies de plantas, como por ejemplo el algodón o el arroz, son cultivadas en altas temperaturas: 27.7 °C o en rango de 24-32 °C (George et al., 2008). Cabe mencionar, que dentro de los frascos de cultivos, la temperatura no será similar a la que se encuentra el cuarto de cultivos, ya que al estar cerrados se produce un efecto invernadero que aumenta la temperatura del frasco, lo cual genera un aumento del vapor de agua (Fal, Majada, & Sánchez, 2014; George et al., 2008).

Generalmente, los tejidos vegetales tienden a reducir su tasa de crecimiento cuando ha disminuido la temperatura a niveles por debajo de la temperatura óptima, sin embargo al sobrepasar esta temperatura, los tejidos vegetales tienen a reducir su crecimiento de manera más rápida llegando a apreciarse como cultivos no sanos (George et al., 2008). En ensayos desarrollados con fines de conservación de orquídeas mexicanas, Díaz & Salgado-Garciglia, (2006) lograron obtener un 100% de germinación de las 9 especies escogidas para el estudio, llevando el procedimiento en un cuarto de cultivos a 25 °C. Por otro lado, Barbery & Morales, (2011) establecen que para el cultivo *in vitro* de *Cattleya*, la temperatura es de un rango de 22 y 24 °C, y su variación provocará que las plántulas crezcan más lento o mueran.

#### **1.2.3.4. Fase gaseosa.**

La atmósfera gaseosa de un cultivo *in vitro* depende de la forma del frasco que se emplea. Bateson, Grout, & Lane (1987) manifiesta en su estudio, que un contenedor de igual volumen logrará una mejor y equiparada difusión de los gases ayudando a incrementar el crecimiento. La composición de la atmósfera dentro del frasco de cultivo consta de tres gases: Dióxido de carbono, oxígeno y etileno (Read & Preece, 2003). El oxígeno, dentro de un frasco de cultivo cerrado, existirá en pequeña cantidad en comparación a la que se encuentra en el medio externo. El uso de este gas por parte de los tejidos crea un déficit que no puede ser fácilmente compensado debido a la interrupción del intercambio de gases con el medio externo (George et al., 2008). El dióxido de carbono, es el factor que favorece la formación de gas etileno y su

concentración puede llegar a los 2000 ppm, su ciclo se basa en un incremento en la noche pero disminución en el día (Bateson et al., 1987). (Kumar & Reddy, 2011) concluyen que el optar por el uso de frascos herméticamente cerrados puede desembocar en un crecimiento y desarrollo incorrecto por parte de los individuos en la fase de cultivo *in vitro*.

#### **1.2.3.5. Asepsia.**

Las condiciones que se generan gracias al explante, medio de cultivo y condiciones físicas es propicio para la proliferación de microorganismos, pues el mayor conflicto que se presenta al momento de generar los cultivos es enfrentar una posible contaminación por microorganismos, pudiendo ser hongos, bacterias, fitoplasmas y virus los que pueblan el medio de cultivo. (Levitus, Echenique, & Rubinstein, s.f.).

En muchas ocasiones el cultivo no se llega a perder, dado que el agente contaminante no destruye la muestra, pero compite por recursos con ésta. Existen dos fuentes de contaminación: la primera son los microorganismos que, en una mala desinfección, se quedaron en el explante y la segunda los errores en la siembra del explante en el laboratorio. Los géneros de microorganismos con mayor prevalencia en los medios de cultivo son: Bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) y de hongos filamentosos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora* (Levitus et al., s.f.).

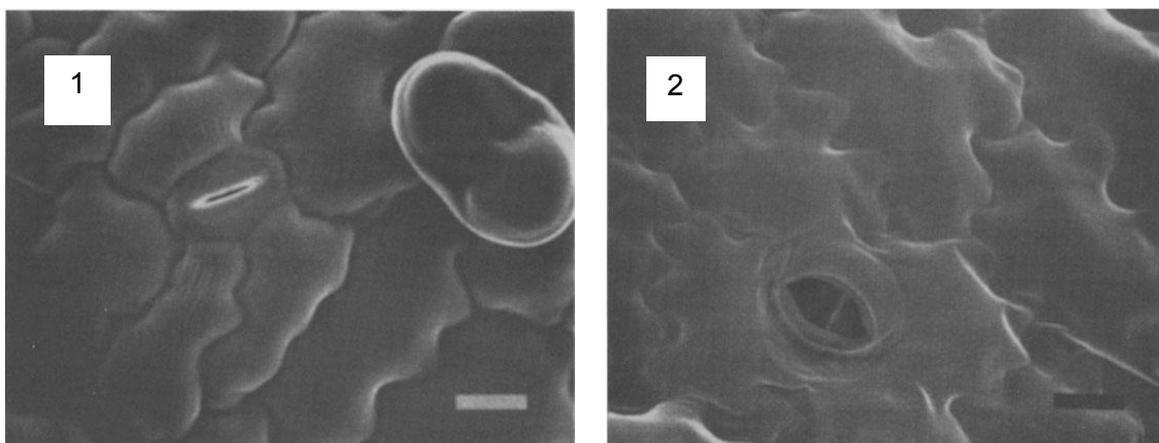
#### **1.2.4. Fisiología de las especies vegetales In vitro.**

El llevar a cabo un cultivo *in vitro*, implica germinar y mantener continuamente a determinadas especies a un solo microambiente, que ha sido diseñado para evitar que los individuos en desarrollo se encuentren sometidos a estrés. Los individuos que se desarrollan dentro del frasco de cultivo están sometidos a condiciones de baja intensidad de luz artificial, asepsia, atmósfera con alta humedad y una reserva de sacarosa y nutrientes que vuelve a las plántulas heterótrofas. Por lo que dichas condiciones provocan en las plántulas anomalías en morfología, anatomía y fisiología (Conner & Conner, 1984). Al unir todo este conjunto de factores, podremos darnos cuenta que un cultivo *in vitro* produce un individuo con pocas posibilidades de sobrevivir a un invernadero o suelo (Preece & Sutter, 1991).

La cutícula es una capa constituida principalmente por una matriz de cutina y ceras que cubren todos los tejidos vegetales. Dentro de un correcto funcionamiento, su propósito es regular la pérdida de agua mediante la transpiración (Martin & Juniper, 1970). Sin embargo las plántulas germinadas y desarrolladas *in vitro* presentan una estructura cristalina de la epicutícula muy diferente a la de las plantas germinadas en invernadero (Preece & Sutter, 1991). Un estudio

realizado por Grout (1975) con *Brassica oleracea* demostró que la estructura típica, que debe presentar la cutícula, es diferente en individuos desarrollados *in vitro*, pues ésta se presenta completamente lisa.

Los estomas, son estructuras que dentro de los cultivos *in vitro* presentan problemas en su correcto funcionamiento y están implicados en el desbalance hídrico que existe en los cultivos *in vitro* (Preece & Sutter, 1991), generando que exista un gran número de pérdidas de individuos, dado al poco control, que presentan los estomas, ante la pérdida de agua (George et al., 2008). Por un lado, se establece que existe mayor densidad de estomas, si tomamos como referencia los mm<sup>2</sup>, en ciertas especies cultivadas *in vitro*, como los manzanos en comparación con la cantidad de estomas existentes en plantas de invernaderos (Blanke & Belcher, 1989), pero sin duda alguna el mayor problema que puede existir en los estomas y que se ha reportado es la incapacidad que presentan estas estructuras para cerrarse cuando se han desarrollado en condiciones *in vitro* (Preece & Sutter, 1991)



**Figura 3.** Imagen tomada con microscopio electrónico del envés de la hoja de *Chrysanthemum morifolium*. (1) Individuo crecido en invernadero (2) Individuo germinado *in vitro*.

**Fuente:** Preece & Sutter, 1991

**Elaboración:** Preece y Sutter, 1991

La fotosíntesis, es sin duda, un proceso vital en la vida de un individuo vegetal, sin embargo los individuos mantenidos en condiciones *in vitro* son considerados como no-fotocompetentes (Hazarika, Teixeira da Silva, & Talukdar, 2006). En un medio de cultivo, la sacarosa, en forma de azúcar, es la fuente de carbono disponible y que hace a las plántulas heterótrofas. Por lo tanto el llevar a cabo la fotosíntesis y convertirse en organismos autótrofos es primordial para la supervivencia (Preece & Sutter, 1991).

Estudios como los llevados a cabo por Grout & Aston (1978), han determinado que la cantidad de carbono absorbido por un individuo vegetal *in vitro*, es ínfimo en la luz. Este tipo de resultados se pueden extrapolar a otras especies, determinando que los bajos rangos de

fotosíntesis en cultivos *In vitro* está estrechamente relacionado con la baja capacidad de la enzima rubisco, escasa cantidad de luz y el carente intercambio gaseoso (Grout, 1988).

### **1.3. Climatización.**

Partiendo del parentesco existente entre las palabras aclimatación y aclimatización, se establece que no son sinónimos, puesto que: al hablar de aclimatación nos referimos al proceso por el cual los organismos se ajustan o acostumbran a un nuevo clima como consecuencia de un proceso natural. Por el contrario, aclimatización involucra el accionar humano dado que el proceso debe ser guiado y ajustado paulatinamente. (Preece & Sutter, 1991). Cabe señalar que el idioma español no contempla la existencia de la palabra aclimatización por lo que el sinónimo y traducción adecuada de esta palabra sería climatización. Siguiendo dicho contexto, climatización, también conocida como endurecimiento, es el proceso dentro de la micropropagación donde se busca que las plántulas lleguen a un estado propicio para lograr su supervivencia a las condiciones de un medio externo, en este caso a condiciones de invernadero. (Hiti Bandaralage, Hayward, O'Brien, Beveridge, & Mitter, 2018). Los procesos de climatización deben ser dirigidos a corregir los problemas ya conocidos dentro de la fisiología de las plántulas germinadas y desarrolladas *in vitro* como lo son: una alta humedad relativa, escasa luz y un crecimiento autotrófico. Las distintas técnicas, para lograr la climatización, pueden ser aplicadas con las plántulas aún en cultivo *in vitro* (Preece & Sutter, 1991).

Para el desarrollo de la cutícula, Sutter & Langhans (1982) llevaron a cabo ensayos donde sometían a plántulas de repollo a una humedad relativa de 35% mientras seguían en un cultivo *in vitro*, como resultado se logró observar la formación de cutícula cuya morfología era similar a la formada por las plantas dentro de un invernadero. Otro proceso aplicado también con las plántulas aún en cultivo *in vitro* consiste en destapar los frascos de cultivo por varios días antes de su traspaso a invernadero. Este método fue aplicado en claveles, los frascos de cultivo que los contenían fueron destapados igualando así la humedad relativa a la del cuarto (50-70%) aumentando la capa de cera en las hojas y su rango de supervivencia de 75 a > 90% (Ziv, 1986).

Para el correcto funcionamiento de los estomas, se plantea un cambio en las condiciones ambientales incrementando la cantidad de luz y reduciendo la humedad relativa existente en los frascos de cultivo (Capellades, Fontarnau, Carulla, & Bebergh, 1984). Cabe recalcar que este proceso de retirar la tapa de los frascos puede ser paulatino, es decir, por los primeros días se pueden aflojar las tapas, seguidamente se las puede remover parcialmente por unos días más hasta removerlas completamente. La contaminación en el medio de agar no

representa un riesgo para la planta siempre y cuando no pase más de una semana desde su aparición (Preece & Sutter, 1991).

También existen metodologías para el cambio de heterotrofismo a autotrofismo, en los cuales se busca reducir la cantidad de oxígeno disponible en el frasco disminuyendo así la fotorespiración, seguidamente se busca disminuir o eliminar el suministro de azúcar (Hazarika et al., 2006). A este proceso se le añade la colocación de una membrana permeable clara, la cual ayudará al intercambio de gases (Kozai, 1988).

Entre los temas que debemos considerar y son poco discutidos son la genética de la especie a climatizar y la presencia de fotoinhibición. Por un lado, la genética posee relación con la organogénesis y climatización de nuevos órganos a condiciones *ex vitro* (Hazarika et al., 2006). Mientras que, el fenómeno de la fotoinhibición que consiste en la pérdida de la capacidad de los organismos vegetales de realizar la fotosíntesis por exceso de luz, dado que ésta daña los aparatos fotosintéticos haciendo que las hojas luzcan enfermas o marchitas (Sonoike, 2011).

### **1.3.1. Invernadero.**

Invernadero es la estructura elaborada de materiales plásticos transparentes para permitir el paso de la luz y son destinados al cultivo y cuidado de plantas bajo condiciones climáticas controladas. Las ventajas que aportan estas estructuras son: un incremento en el rendimiento de las plantas, productos sanos, limpios, homogéneos y menor incidencia de plagas y enfermedades (Tapia, 2009)

### **1.3.2. Condiciones Ambientales Ex vitro.**

#### **1.3.2.1. Humedad.**

Se considera que la humedad dentro de un invernadero tiene un rango aproximado de 40-70% (Talbot, Rahveh, & Zeiger, 2003). Por lo que la humedad en el invernadero es relativamente baja en comparación con la cantidad de humedad existente dentro de un frasco de cultivo (Preece & Sutter, 1991). Dado estas condiciones, es debido al cambio abrupto en la humedad del ambiente, que se producen las mayores pérdidas de plántulas que se desarrollaron *in vitro* como consecuencia de los factores anatómicos que presentan estos individuos (George et al., 2008).

En cuanto a las especies de este estudio, Arbós (s.f.) propone que *Cattleya* es un género que necesita rangos de humedad, en el invernadero, de entre el 50 y el 80%, mientras que *Gongora* sp. necesita niveles altos de humedad para su mantenimiento *ex vitro* (American Orchids Society, 2010). La mayor pérdida de individuos que están en proceso de climatización se da cuando las plántulas, que han crecido en un ambiente con mucha humedad, son

sacadas a un ambiente mucho más seco por lo que son propensas a la desecación, ésto debido a que no poseen un control en la apertura y cierre de sus estomas (George et al., 2008).

#### **1.3.2.2. Luz.**

En un invernadero o fuera de él, la fuente lumínica es natural y proviene del sol. La energía radiante solar es un componente, en las condiciones climatológicas de un invernadero, que no puede ser almacenado y únicamente puede ser aprovechado durante el día (ACEA, s.f.). La cantidad de luz que se transfiere al invernadero, puede depender del estado atmosférico, es decir, que en los días despejados al invernadero ingresará una gran cantidad de luz, a diferencia de los días nublados la cantidad de radiación que entra es tan pequeña que el invernadero requerirá contar con una cubierta mayormente transparente para lograr una mayor captación de luz (Martínez, 2002).

Para los invernaderos construidos en zonas tropicales o subtropicales, la radiación no representa un problema a considerar, salvo en los meses de verano donde la radiación se incrementa y en los meses de invierno donde los niveles de radiación, en comparación con los del verano, llegan a disminuir entre 50 y 70% (De Pedro, 2015). Los individuos vegetales micropropagados al ser expuestos a niveles altos de luz, sus hojas pueden volverse cloróticas o quemarse (Preece & Sutter, 1991). La cantidad de luz que las orquídeas pueden tolerar cambiará de acuerdo a la especie con la que se trabaje; expertos mencionan que para saber la cantidad de luz que las orquídeas necesitan debemos basarnos en su morfología, de tal manera que: si sus hojas son carnosas, la especie requerirá de más luz y si sus hojas son blandas, finas y anchas la especie necesitará de mayor sombra (V. Gil, Bastidas, Flores, & Navarro, 2007). Demasiada cantidad de luz puede generar lesiones en las hojas, dado que destruye la clorofila, haciendo que estas se vuelvan cloróticas o luzcan quemadas (Griffis, Hennen, & Oglesby, 1983)

#### **1.3.2.3. Temperatura.**

Dentro de los tipos de radiación lumínica, se considera que las ondas infrarrojas cortas, están estrechamente relacionadas con la temperatura dentro de los invernaderos. Estas ondas tienen la capacidad de atravesar el material plástico y ser captadas por hojas y terreno, y así lograr un incremento en la temperatura interna e irradiando calor que caliente el aire (Martínez, 2002). En los trópicos, precisamente en los meses de verano, es aconsejable enfriar el aire y en los meses de invierno se lo debe calentar, además se puede ajustar la cantidad de sombra y humedad con el propósito de controlar la temperatura (Preece & Sutter, 1991). Entre los cuidados que destaca el género *Cattleya*, se menciona que este género necesita temperaturas en el día de entre 16 a 25 °C y en la noche temperaturas de entre 6 a 8 °C (Arbós, s.f.)

#### **1.3.2.4. Sustrato.**

Se denomina sustrato al material que puede ser sólido o poroso y de naturaleza sintética o natural, y que provee a las orquídeas un crecimiento adecuado en condiciones climáticas controladas (Abad, 1989). El sustrato es un factor importante en el proceso final de climatización puesto que brinda sostén y otorga un incremento en la absorción de aire y agua mediante las raíces (Tortosa, 1990). Al momento de seleccionar un sustrato, se debe tomar en consideración las especies con las que se trabaja; En Ecuador tiene mayor acogida los sustratos elaborados con: corteza de pino, musgo (*Sphagnum*) y helecho arbóreo, combinados con trozos de carbón, cerámica o grava (Portilla, 2007). Si se trata de especies de orquídeas epífitas, el sustrato deberá tener las siguientes propiedades: ser ácido, proveer de aireación y permeabilidad (Iriarte, Aravia, & Matias, 2002)

#### **1.4. Cuidados.**

##### **1.4.1. Fertilización y riego.**

Es aconsejable el aportar con macro y micronutrientes al medio en el que las plántulas desarrollan su vida fuera del frasco de cultivo, estos pueden ser agregados de forma libre pero se aconseja que debe encontrarse diluido  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  (Preece & Sutter, 1991). La fertilización reporta ser beneficiosa para las especies dado a que se evidencian crecimientos vigorosos después de la trasplantación (Day, Witte, & Dickerson, 1988). En orquídeas la fertilización y el riego se debe realizar con atomizador entre cada 2 a 3 días dependiendo el clima. La fertilización puede darse semanalmente con 150 ppm de fertilizante NPKN (Mosqueda, Cázares, de la Cruz, & Flores, 2010)

##### **1.4.2. Fumigación.**

El cuidado y control del ataque de plagas es una actividad que se debe tener presente desde el inicio y durante el proceso de climatización dado la delicadeza que presentan las plántulas, cabe recalcar que la humedad del invernadero puede ser propicio para el ataque de bacterias y hongos (Preece & Sutter, 1991). Sin embargo, el uso de pesticidas es un tema aún bajo discusión debido al daño que este puede generar (Griffis et al., 1983). A pesar del uso de pesticidas para combatir plagas, muchos de ellos las previenen más no las curan, en orquídeas, para combatir infecciones es común el uso de la canela (Bottom, 2016). Cinnamaldehído es un compuesto químico orgánico, que fue obtenido del aceite esencial de la canela en 1834 y es usado para protección contra plagas, se reporta usos efectivos contra la enfermedad de la burbuja seca causada por el hongo *Fusarium moniliforme* (Yoon, Cha, & Kim, 2013).

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Selección de individuos vegetales.

Las especies seleccionadas para llevar a cabo el estudio fueron *Cattleya iricolor* y *Gongora* sp. tomando como muestra un total de nueve individuos por cada especie. Los individuos llevaban dos años dentro de los frascos de cultivo, en condiciones controladas y en un medio de cultivo semisólido estándar, al interior del cuarto de micropropagación de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL). El criterio de selección fue basado según su tamaño para *Cattleya iricolor* el rango de crecimiento se encontraba entre 1cm. y 6.9cm., mientras que el rango para *Gongora* sp. fue entre 1cm y 4cm. Los frascos fueron numerados para llevar registro particular de cada individuo.

## 2.2. Sitio de estudio.

El ensayo fue llevado a cabo en el invernadero de orquídeas de la Universidad Técnica Particular de Loja, la cual se encuentra situada en el barrio San Cayetano, a una altitud de 2.060m s.n.m. El invernadero de orquídeas UTPL tiene un área total aproximada de 446.603 m<sup>2</sup>, su construcción de estructura metálica cuyas paredes y techos están cubiertos con plástico de polietileno.



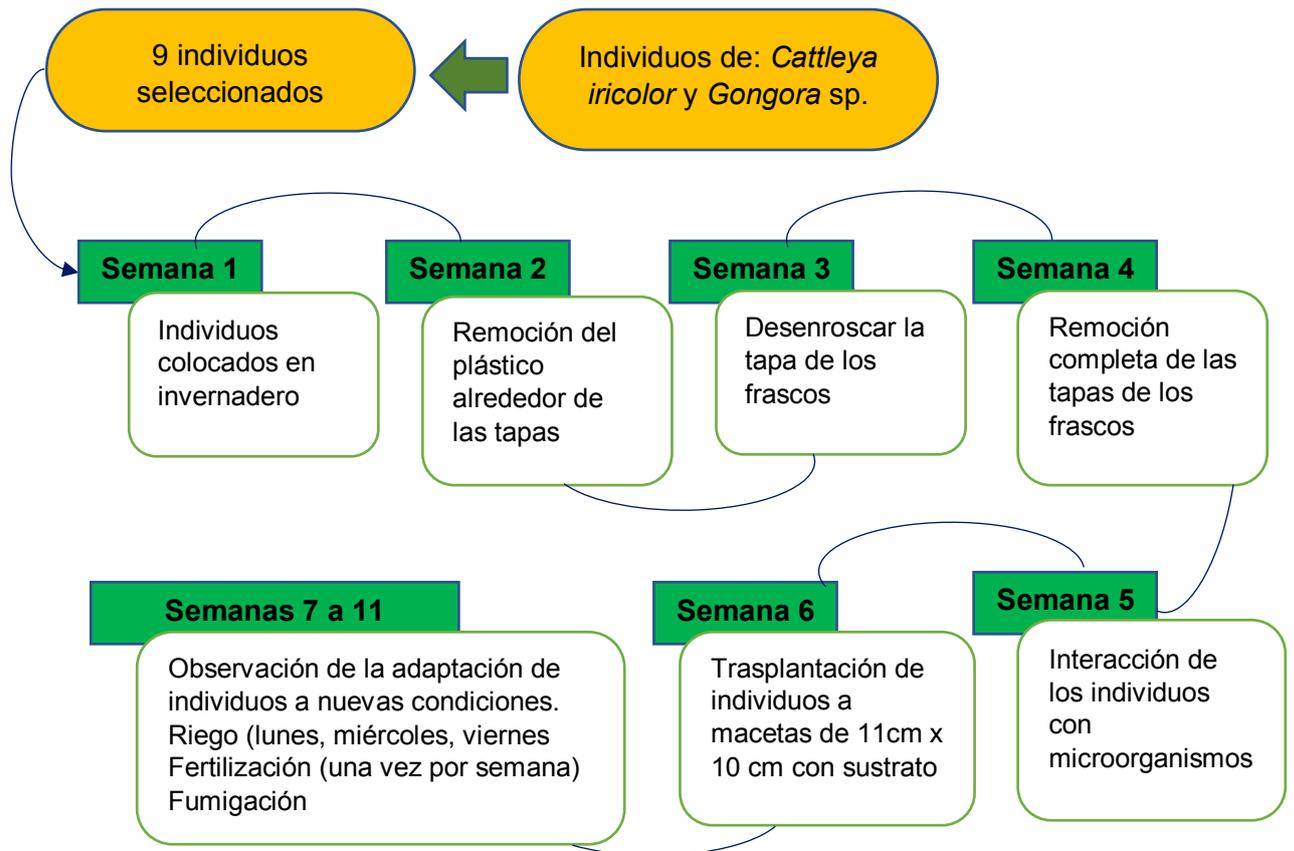
**Figura 4.** Ubicación del sitio de estudio dentro del Campus UTPL

**Fuente:** (Google Maps, s.f.)

**Elaboración:** Autor

## 2.3. Proceso de climatización

La climatización de los individuos sometidos a estudio se realizó en los meses de julio, agosto y septiembre comprendiendo un lapso de 11 semanas (Figura 5), en cada una, se desarrolló una actividad específica llevando así un proceso de manera paulatina. Se desarrollaron actividades secundarias para solventar los problemas de estrés presente en los individuos (Anexo 1-Tabla 4).



**Figura 5.** Esquema del proceso de aclimatización de *C. iricolor* y *Gongora* sp.

**Fuente:** Autor

**Elaboración:** Autor



**Figura 6.** Colocación de microinvernadero, con los individuos a aclimatar, en el invernadero (Semana1).

**Fuente:** Autor.

**Elaboración:** Autor.

Para la trasplantación de los individuos se usó macetas de 11cm de ancho x 10cm de alto (Figura 7), en las que se colocó sustrato de contextura gruesa, con la finalidad de proveer mayor soporte a los individuos. El sustrato está constituido por piedra pómez, corteza de pino previamente tratada y musgo. En este proceso, no se enterró por completo las raíces, pues, al tratarse de especies epífitas, sus raíces son áreas con el propósito de tomar nutrientes del aire. Los riegos fueron realizados de acuerdo con el estado de humedad del sustrato, estableciendo como días de riego lunes, miércoles y viernes.

La fertilización fue llevada a cabo durante las dos últimas semanas de la climatización. Se elaboró un fertilizante se disolvió 0.20g fertilizante Sol-U-Gro y 0.016g de  $KNO_3$  para la cuarta parte de un litro. La aplicación de éste se realizó una vez por semana con la ayuda de un atomizador. La fumigación se la realizó una vez por semana, colocando canela molida en las plántulas y en el sustrato.



**Figura 7.** Individuos trasplantados de frascos de cultivo a macetas.

**Fuente:** Autor.

**Elaboración:** Autor.

Para tener conocimiento de las condiciones climáticas bajo las cuales se realizaba el proceso de climatización, se elaboró una bitácora (Anexo 2, Tabla 5), donde se procedió a la toma de datos, de temperatura y humedad tanto del invernadero como de los lugares donde se encontraban las especies, durante la mañana y tarde, con la ayuda de dos termohigrómetros.

A esta actividad, se le incluyó la observación y toma de datos acerca de estrés o marchitamiento en los individuos estudiados.

#### 2.4. Análisis de datos:

Para determinar cómo reaccionaron las especies al proceso de adaptación, durante las 11 semanas de estudio, se tomó como referencia una tabla de porcentajes de Paredes (2012) (Tabla 1), en la cual se expresa las variables evaluadas, es decir: porcentaje de individuos adaptados, individuos que presentaron estrés e individuos que murieron durante el proceso. Las variables fueron expresadas como:

**Tabla 1.** Cuadro indicativo para expresar el % de individuos saludables, con estrés y muertos en las 11 semanas de estudio

| N° de individuos sometidos al proceso | <i>Especie</i>     |          |          |          |          |               |          |          |          |           |           |
|---------------------------------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|---------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
|                                       | Frascos de cultivo |          |          |          |          | Trasplatación |          |          |          |           |           |
| Variables                             | Semana 1           | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 | Semana 6      | Semana 7 | Semana 8 | Semana 9 | Semana 10 | Semana 11 |
| Tiempo                                |                    |          |          |          |          |               |          |          |          |           |           |
| <b>% de individuos saludables</b>     |                    |          |          |          |          |               |          |          |          |           |           |
| <b>% de individuos con estrés</b>     |                    |          |          |          |          |               |          |          |          |           |           |
| <b>% de individuos muertos</b>        |                    |          |          |          |          |               |          |          |          |           |           |

Fuente: Paredes, 2012

Elaboración: Paredes, 2012

**CAPÍTULO III  
RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN**

### 3.1. Comportamiento de las especies durante el proceso de climatización.

#### 3.1.1. Climatización de *Cattleya iricolor*.

En el proceso de climatización de la especie *Cattleya iricolor*, se muestra que a medida que aumenta el paso del tiempo entre la semana uno y la 11, los individuos pierden salud desde un 100% (nueve individuos) hasta un 55.5 %. Así mismo los valores de estrés aumentan y fluctúan de 0%, 11% y 22%, este último valor se presentó entre las siete, ocho y nueve. Finalmente, los individuos muertos representan porcentajes de 22 al 33% entre las semanas nueve, diez y once.

**Tabla 2.** Porcentaje de individuos sanos, con estrés y muertos de la especie *Cattleya iricolor*.

| Nueve individuos sometidos a climatización | <i>Cattleya iricolor</i> |          |          |          |          |                |          |          |          |           |           |
|--|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
|  | Frascos de cultivo       |          |          |          |          | Trasplantación |          |          |          |           |           |
| Variables                                  | Semana 1                 | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 | Semana 6       | Semana 7 | Semana 8 | Semana 9 | Semana 10 | Semana 11 |
| % de individuos saludables                 | 100                      | 100      | 100      | 88.88    | 88.88    | 88.88          | 77.77    | 77.77    | 55.55    | 55.55     | 55.55     |
| % de individuos con estrés                 | 0                        | 0        | 0        | 11.11    | 11.11    | 11.11          | 22.22    | 22.22    | 22.22    | 11.11     | 11.11     |
| % de individuos muertos                    | 0                        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0              | 0        | 0        | 22.22    | 33.33     | 33.33     |

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

#### 3.1.2. Climatización de *Gongora sp.*

En el proceso de climatización de la especie *Gongora sp.*, se muestra que apenas iniciado el proceso, la salud de los individuos comienza a deteriorarse de 100% (nueve individuos) a 66.66%, para luego seguir decayendo hasta 33.33%, sin embargo se presenta la recuperación de un solo individuo las últimas cuatro semanas de estudio. Así mismo, los valores de estrés aumentan y fluctúan de 33.33%, 55.55% y 66.66%, este último presentándose en las semanas cinco, seis y siete. Finalmente, existió un solo individuo muerto, en la semana 11, representando un porcentaje de 11.11%.

**Tabla 3.** Porcentaje de individuos sanos, con estrés y muertos de *Gongora sp.*

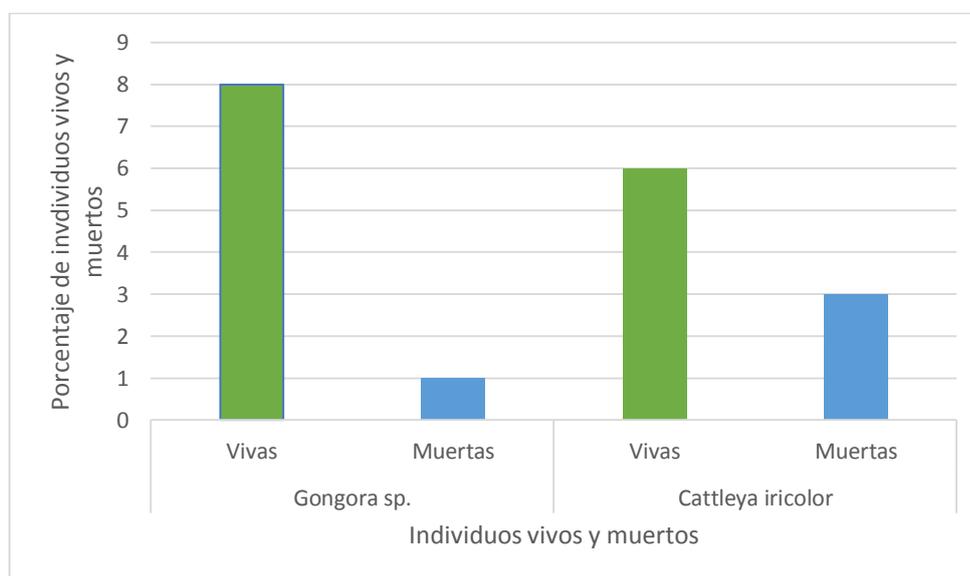
| Nueve individuos sometidos a climatización | <i>Gongora sp</i>  |          |          |          |          |               |          |          |          |           |           |
|--|--------------------|----------|----------|----------|----------|---------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
|  | Frascos de cultivo |          |          |          |          | Trasplatación |          |          |          |           |           |
| Variables                                  | Semana 1           | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 | Semana 6      | Semana 7 | Semana 8 | Semana 9 | Semana 10 | Semana 11 |
| Tiempo                                     |                    |          |          |          |          |               |          |          |          |           |           |
| % de individuos saludables                 | 66.66              | 66.66    | 44.44    | 44.44    | 33.33    | 33.33         | 33.33    | 44.44    | 44.44    | 44.44     | 44.44     |
| % de individuos con estrés                 | 33.33              | 33.33    | 55.55    | 55.55    | 66.66    | 66.66         | 66.66    | 55.55    | 55.55    | 55.55     | 44.44     |
| % de individuos muertos                    | 0                  | 0        | 0        | 0        | 0        | 0             | 0        | 0        | 0        | 0         | 11.11     |

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

### 3.2. Supervivencia de individuos.

Durante la onceava semana, cuando el estudio finalizó, se procedió a la contabilización de los individuos que lograron sobrevivir (estrés y sanas) y los que perecieron (Figura 8).



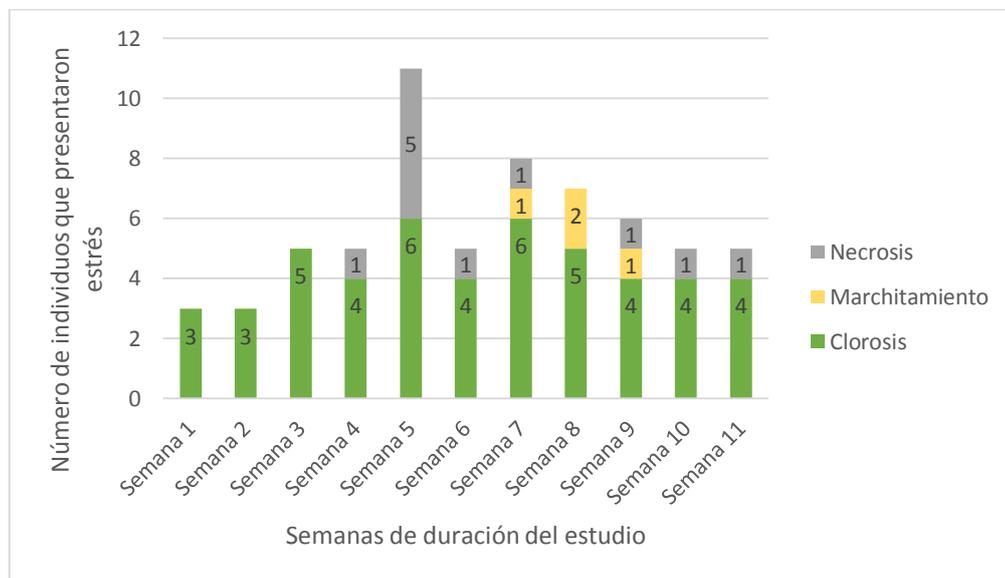
**Figura 8.** Número de individuos, de *C. iricolor* y *Gongora sp.*, que sobrevivieron y perecieron en el proceso de climatización.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

### 3.3. Presencia de estrés en las especies climatizadas

La clorosis fue el daño con mayor incidencia en los individuos. Para *Gongora* sp. (Figura 9), la clorosis estuvo presente desde la primera semana de estudio, tuvo mayor incidencia en las semanas cinco y siete y persistió hasta la semana final del estudio en solo cuatro individuos. La necrosis fue el segundo daño con mayor incidencia en los individuos, presentándose inicialmente en la semana cuatro, y teniendo mayor incidencia en la semana cinco. Finalmente, el marchitamiento se presentó durante las semanas siete, ocho y nueve siendo la señal de estrés con menor incidencia en el estudio



**Figura 9.** Incidencia de clorosis, marchitamiento y necrosis en individuos de *Gongora* sp, durante las 11 semanas de estudio.

**Fuente:** Autor.

**Elaboración:** Autor.

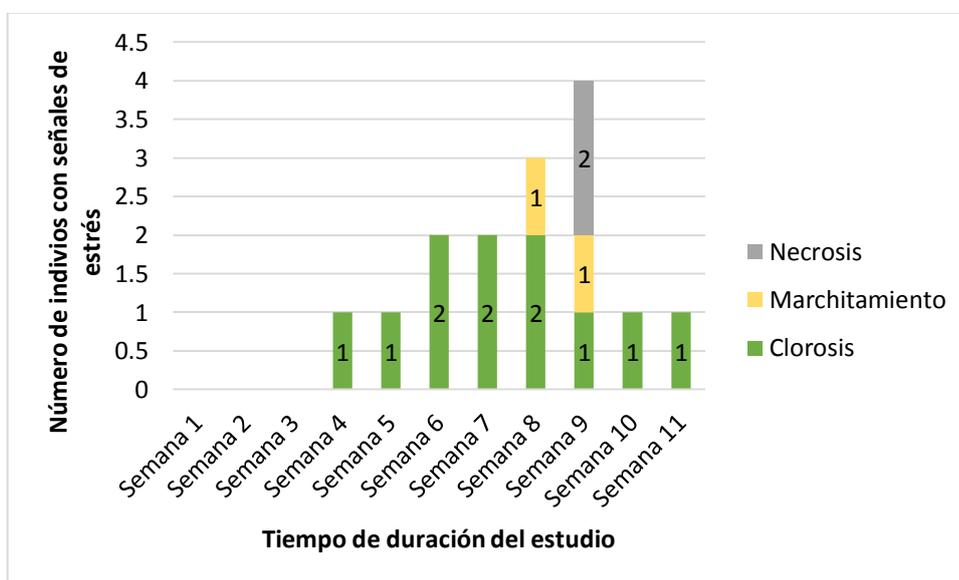


**Figura 10.** Individuo de *Gongora* sp., con presencia de clorosis durante la primera semana de estudio

**Fuente:** Autor.

**Elaboración:** Autor.

A pesar de que, en *Cattleya iricolor*, la clorosis tiene mayor prevalencia a lo largo del estudio en comparación con otras señales de estrés (Figura 11,12), su presencia radica a partir de la semana cuatro y fluctúa mostrando prevalencia en dos individuos en las semanas seis, siete y ocho. Por el contrario, la necrosis y el marchitamiento únicamente aparecen en las semanas ocho y nueve del estudio.



**Figura 11.** Incidencia de clorosis, marchitamiento y necrosis en individuos de *Cattleya iricolor*, durante las 11 semanas de estudio.

**Fuente:** Autor.

**Elaboración:** Autor.



**Figura 12.** Individuo de *C. iricolor* con presencia de clorosis en una de sus hojas durante las semanas finales del estudio.

**Fuente:** Autor.

**Elaboración:** Autor.

### 3.4. Discusión

El proceso de climatización de individuos vegetales, provenientes de técnicas *in vitro*, es un proceso de gran relevancia para la supervivencia *ex vitro* de los individuos, llegando a considerarse como la fase crítica en micropropagación (E. Gil, López, & López, 2017). En el presente estudio, llevando una técnica de climatización paulatina, logramos obtener como resultados finales: un 88.88% de supervivencia en *Gongora* sp y 66.66% de supervivencia en *Cattleya iricolor*; Nuestros resultados se afianzan con el estudio realizado por Paredes (2012), en dónde las orquídeas son sometidas a climatización bajo condiciones de un microinvernadero haciendo variar la humedad relativa pero en temperatura constante, obteniendo 81.5% de *Epidendrum schistochilum*, y del 73,3% en *Oncidium cultratum*. Estos resultados nos permiten inferir que se obtuvo un proceso de climatización satisfactorio, pues (Sandoval et al., 1991) plantea que se debe recordar la principal premisa de un proceso de climatización la cual es lograr conseguir un número considerable de individuos capaces de resistir a la trasplatación tanto al suelo o sustrato.

Sin embargo, en diversas investigaciones, como las realizadas por: E. Gil et al., (2017) y Sandoval et al., (1991), han obtenido porcentajes de climatización mayores al 80%, estableciendo que se puede considerar como satisfactorio un proceso de climatización que sea mayor a dicho porcentaje. Por lo que, tomando como referencia este enunciado, concluiríamos que: de las especies utilizadas en el estudio, el proceso de climatización para *C. iricolor* no fue del todo correcto, abriendo la puerta a futuros estudios destinados a la elaboración de protocolos de climatización específicos para cada taxón, puesto que según

(Dustan & Turner, 1984), se ha establecido la existencia de diferencias de adaptación entre distintas especies. Cabe recalcar, que un factor poco estudiado y que puede responder a los escasos porcentajes de supervivencia es la genética de las especies a las que se busca aclimatar, puesto que los genes influyen también en la capacidad de resistencia de plántulas a condiciones *ex vitro* (Hazarika et al., 2006). Cabe mencionar, que las condiciones climatológicas del invernadero no eran las adecuadas para la adaptación de *Cattleya iricolor* (Anexo 1), puesto que al ser una especie nativa de los Andes orientales las condiciones en la que ésta se desarrolla son: en los días de verano 28-29 °C y en noches de 22 °C, mientras que en los días de invierno son: en el día 25-26 °C y en las noches: 17-19 °C (C Dodson & Dodson, 1982).

El proceso paulatino de climatización, que se empleó en este estudio es mencionado por (Preece & Sutter, 1991). Por lo que, en dicho contexto, el haber llevado paso a paso este proceso generó una alteración en la temperatura y humedad. El estudio realizado por (Ziv, 1986), confirma el éxito de este procedimiento, al destapar frascos de cultivo que contenían claveles en su interior dentro del cuarto de climatización; éstos mejoraron su estructura epicutícula, evitando que sufran estrés por pérdida de agua e incrementando su supervivencia a rangos de entre 75 > 90%. Además, con la remoción paulatina de las tapas, se pudo generar condiciones para solventar los problemas fisiológicos que las plantas *in vitro* poseen. Pues, al haber generado cambios de humedad relativa e igualar este parámetro con la del invernadero se pudo reactivar los estomas, Capellades et al., (1984), logró esto con individuos de rosa germinadas *in vitro* al haber incrementado el nivel de luz de 25 a 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y reduciendo la humedad de 100% a 75%. Por otra parte, el incrementar el intercambio gaseoso y cambiar de medio de cultivo a sustrato, pudo generar que los individuos cambiasen de heterotrofismo a autotrofismo al haber aumentado la cantidad de CO<sub>2</sub> presente en el aire y restringiendo la fuente de sacarosa (Hazarika et al., 2006; Kozai, Hayashii, Hirokawa, Kodama, & Watanabe, 1987)

La señal de estrés en los individuos climatizados, con mayor notoriedad fue la clorosis. La luz natural, no siempre es beneficiosa para los organismos cultivados *in vitro*, puesto que ante su excesiva incidencia las hojas pueden presentar clorosis o quemaduras (Preece & Sutter, 1991). *Gongora* sp. presentó los individuos con mayor incidencia de clorosis en todas las semanas de estudio. Posiblemente este fenómeno tuvo origen al haber colocado desde la primera semana de estudio el microinvernadero en un sitio con incidencia de luz directa, (Granada, 1990) manifiesta que en lo concerniente a especies vegetales tropicales, en proceso de climatización, los individuos necesitan de una baja intensidad lumínica (70% sombra) que se puede obtener con la colocación en el invernadero de mallas que filtren la

cantidad excesiva de radiación y que conforme el proceso avance la sombra debe ir reduciéndose. Si nos remitimos al anexo 3 (Tabla 6), encontraremos que las temperaturas, en el punto donde se climatizaba *Gongora* sp., eran mucho mayores indicando una gran incidencia de radiación solar, pudiendo llevarse a cabo un fenómeno conocido como fotoinhibición, en el cual la fotosíntesis es inhibida por excesiva radiación solar (Sonoike, 2011). Los individuos, pueden recuperarse de este fenómeno siempre y cuando la radiación solar no haya destruido los aparatos fotosintéticos, en ese caso, las hojas aparecerán con señales de estrés (Demming-Adams & Adams, 1992).

La necrosis, a pesar de no haber tenido mayor incidencia en los individuos de ambas especies, se la trató como síntoma de una enfermedad que los individuos pueden estar sobrellevando (Painter, 2017). Estos síntomas presentes en las hojas se han reportado como infecciones dadas por hongos, bacterias y virus, que si no son combatidas a tiempo pueden tornar necrótica a la hoja (Painter, 2017). Cinnamaldehído es un compuesto químico orgánico, que es obtenido del aceite esencial de la canela y es usado para protección contra plagas, se reporta usos efectivos contra diversos hongos causantes de enfermedades en individuos vegetales como por ejemplo: *Trichophyton rubrum* y *Aspergillus fumigates* teniendo resultados favorables para la erradicación de estos hongos.

## CONCLUSIONES

- Dado que el porcentaje de supervivencia de *Cattleya iricolor* es menor en comparación al porcentaje de éxito mencionado en otros estudios, se puede concluir que la metodología empleada en el presente estudio no es el correcto para esta especie. Sin embargo, si tomamos en consideración el número de individuos destinados al presente estudio, podemos concluir que el porcentaje obtenido es considerable para llamar exitoso a este protocolo
- El alto porcentaje de supervivencia presentado por *Gongora* sp. señala que el método de climatización llevado en el estudio está acorde a los requerimientos de la especie.
- No se brindó una cantidad adecuada de sombra (70 por ciento) para cada especie durante el proceso, por lo que se observó señales de estrés como la clorosis presente en sus hojas.

## RECOMENDACIONES

### Generales

Llevar a cabo un proceso de climatización paulatino podrá asegurar la supervivencia de los individuos sometidos al proceso puesto que, resulta de menor agresividad y asegura que los individuos se aclimaten de manera progresiva al ambiente *ex vitro*.

Se debe considerar este procedimiento cuando los individuos a climatizar llevan un tiempo considerable en el interior de los frascos de cultivo pues permitirá lograr conseguir un mayor porcentaje de supervivencia.

Se debe empezar con la fertilización de los individuos apenas son colocados en el sustrato puesto que ya no reciben los nutrientes que se encontraban en el medio de cultivo.

Los riegos deben realizarse por intervalos de tiempo, recomendamos que se realicen tres riegos a lo largo de cada semana y durante la mañana para que a lo largo del día ésta se evapore. Los riegos deben realizarse continuos cuando el sustrato se seque periódicamente.

En el presente trabajo no se realizó alguna acción con las raíces. Sin embargo, el desarrollo de raíces es vital para la supervivencia de los individuos sometidos al proceso de climatización, por lo que se recomienda que en la etapa de trasplantación éstas sean lavadas con sustancias que promuevan su desarrollo como BPA (benzyl-amino-purine).

Durante la apertura de los frascos de cultivo, el medio se empezará a poblar de microorganismos, por lo que se señala no dejar por más de una semana que el medio se llene completamente de hongos y bacterias puesto que podrían llegar a infectar la planta.

### ***Cattleya iricolor.***

Se debe considerar las condiciones de humedad bajo las cuales esta especie, en condiciones naturales, se desarrolla. Por lo que brindar de mayor humedad al invernadero aportará con mayores posibilidades de supervivencia a los individuos que se encuentran en el proceso.

Se recomienda la implementación de equipos electrónicos para generar las condiciones adecuadas para la especie, en este caso generar mayor humedad en el invernadero.

### ***Gongora sp.***

Dado que la luz genera lesiones en las hojas de los individuos sometidos a climatización, se recomienda que la cantidad de luz que éstas reciban debe ser proporcionada de manera paulatina, empezando por colocar las especies en lugares de sombra y terminando por colocarlas en lugares con mucha cantidad de luz.

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Descripción detallada de las actividades desarrolladas durante las 11 semanas de estudio

**Tabla 4.** Descripción de las actividades realizadas durante el proceso de climatización en el lapso de 11 semanas.

| Semanas  | Actividades   | Actividades especiales  |
|----------|---|---|
| Semana 1 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Selección de individuos</li> <li>• Colocar los individuos en un microinvernadero</li> <li>• Colocar el microinvernadero en el invernadero</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Los individuos seleccionados deben encontrarse en un grado de desarrollo considerable: mayor de dos centímetros.</li> <li>• En caso de presentar señales de estrés se puede retirar la tapa del microinvernadero aun no habiéndose completado la semana</li> </ul> |
| Semana 2 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se retira el plástico de embalar de alrededor de las tapas de los frascos</li> </ul>   |   |
| Semana 3 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Únicamente se afloja las tapas de los frascos para permitir un mayor intercambio gaseoso con el exterior</li> </ul>                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solo se afloja las tapas de los frascos dado el tiempo que llevan los individuos dentro del frasco, minimizando el impacto</li> <li>• La clorosis persistió en <i>Gongora</i> por lo que se buscó un lugar en el invernadero con</li> </ul>                        |

|          |   |  |
|----------|---|--|
|          |   | mayor recepción de luz solar   |
| Semana 4 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se retiran por completo las tapas de los frascos</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se empezará a observar colonización de hongos y bacterias</li> </ul>  |
| Semana 5 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inicio de interacción con microorganismos dada la colonización de hongos y bacterias</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se pueden observar raíces oscuras por lo cual se procedió a levantarlas con una pinza</li> </ul>  |
| Semana 6 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se procede a la trasplatación de los individuos a macetas de (dimensiones) con sustrato grueso</li> <li>• Los individuos no deben ser del todo cubiertos con el sustrato, se debe cuidar que, en caso de orquídeas epífitas, sus raíces queden descubiertas.</li> <li>• Se coloca a los individuos de ambas especies en un sitio con gran cantidad de luz natural directa</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se lavaron y desinfectaron las macetas ya que habían sido ocupadas</li> <li>• Se debe realizar el primer riego luego de la trasplatación</li> <li>• Los riegos deben ser realizados cada que el sustrato se encuentre seco</li> </ul> |
| Semana 7 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se realiza un cambio de macetas a unas de mayor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• El cambio a macetas más grandes se lo</li> </ul>  |

|           |   |   |
|-----------|---|---|
|           | tamaño (11 cm x 10 cm)  | realiza al ver que en las macetas más pequeñas el sustrato se secaba muy rápido   |
| Semana 8  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Observación de señales de estrés o marchitamiento</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Se observa marchitamiento en individuos de <i>Cattleya</i> por lo que se las coloca en un lugar sin luz solar directa</li> </ul>   |
| Semana 9  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Observación de señales de estrés o marchitamiento</li> </ul>   |   |
| Semana 10 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Se decide establecer como días de riego: lunes, miércoles y viernes.</li> <li>Ante señales de marchitamiento se procede a la fertilización de individuos.</li> <li>La fertilización se realiza mediante atomizador una vez por semana</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dado las muertes en <i>Cattleya</i> se establecen riegos saltando un día</li> <li>Dado el marchitamiento en <i>Cattleya</i> se decide cambiar los individuos a un lugar con mayor humedad</li> <li>Preparación del fertilizante: <math>\text{KNO}_3</math> (0.016g) + Fertilizante comercial (nombre) (0.20g). Estas cantidades deben ser divididas para cuatro dado el</li> </ul> |

|           |   |  |
|-----------|---|--|
|           |   | volumen del atomizador   |
| Semana 11 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Observación de señales de estrés y marchitamiento</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Los riegos deben ser realizados alternando un día.</li> </ul> |

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

## Anexo 2. Bitácora para la toma de datos

**Tabla 5.** Esquema de la bitácora para la toma de datos en la mañana y tarde.

|                                  |                                  |                          |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| SEMANA N°                        |                                  |                          |
| Hora:                            |                                  | Fecha:                   |
| <b>Datos</b>                     |                                  |                          |
| <b>Invernadero:</b>              | <b>Microinvernadero/Especies</b> |                          |
|                                  | <i>C. iricolor</i>               | <i>Gongora</i>           |
|                                  | Temperatura:<br>Humedad:         | Temperatura:<br>Humedad: |
| <b>Observaciones/Actividades</b> |                                  |                          |
| <i>Cattleya iricolor</i>         |                                  | Gongora                  |

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

**Anexo 3. Tabla de temperaturas y humedad en el invernadero y en los puntos de climatización**

**Tabla 6.** Promedio de temperatura y humedad relativa tomadas tanto en invernadero como en puntos del invernadero donde se realizó el proceso de climatización.

| <b>Invernadero</b>       |                  |               |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |
|--------------------------|------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| Tiempo                   |                  | Semana 1      | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 | Semana 6 | Semana 7 | Semana 8 | Semana 9 | Semana 10 | Semana 11 |
| Datos.                   |                  |               |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |
|                          | Temperatura (°C) | <b>Mañana</b> | 28.12    | 21.4     | 18.8     | 17.2     | 17.4     | 20.8     | 21.3     | 19.6     | 22        | 20.8      |
| <b>Tarde</b>             |                  | 20.12         | 20       | 19.92    | 16.66    | 16.2     | 20.8     | 19       | 19.6     | 20       | 21.2      | 21.2      |
| Humedad (%)              | <b>Mañana</b>    | 52.6          | 47.8     | 53.6     | 64.4     | 66.4     | 61.2     | 53.2     | 60.2     | 51.8     | 54        | 57.4      |
|                          | <b>Tarde</b>     | 56.4          | 45.6     | 53.2     | 65.8     | 66.6     | 54       | 56.8     | 56.2     | 54       | 48.8      | 47.8      |
| <b>Cattleya iricolor</b> |                  |               |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |
| Temperatura (°C)         | <b>Mañana</b>    | 25.38         | 22.8     | 20.2     | 17.96    | 18.6     | 20.36    | 24.04    | 21.18    | 24.84    | 23.54     | 23.36     |
|                          | <b>Tarde</b>     | 23.83         | 24.04    | 19.64    | 17.08    | 16.26    | 32.54    | 18.88    | 20.6     | 21.52    | 23        | 23.16     |
| Humedad (%)              | <b>Mañana</b>    | 52            | 46.8     | 50.4     | 68.4     | 66.8     | 51.6     | 60.2     | 66.4     | 53.8     | 52.8      | 62.6      |
|                          | <b>Tarde</b>     | 52.50         | 41.6     | 51.6     | 68.6     | 59.2     | 55.8     | 71       | 61.8     | 64.6     | 51        | 58        |
| <b>Gongora sp.</b>       |                  |               |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |
| Temperatura (°C)         | <b>Mañana</b>    | 25.38         | 22.8     | 20.24    | 17.96    | 18.7     | 20.36    | 24.04    | 21.46    | 24.7     | 24.4      | 23.42     |
|                          | <b>Tarde</b>     | 23.83         | 24.04    | 19.8     | 17.06    | 16.48    | 32.54    | 18.88    | 20.14    | 20.26    | 22.76     | 22.88     |
| Humedad (%)              | <b>Mañana</b>    | 52            | 46.8     | 52.2     | 72.8     | 60.4     | 51.6     | 60.2     | 67.6     | 57.2     | 57        | 56.4      |
|                          | <b>Tarde</b>     | 52.50         | 41.6     | 52.4     | 73.6     | 59.8     | 55.8     | 71       | 60.6     | 67       | 57.4      | 58        |

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Anexo 4. Resumen fotográfico del proceso de climatización llevado a cabo

## Proceso de climatización



Semana 1

Colocación de individuos en microinvernadero y luego en el invernadero



Semana 2

Se retira el frasco de las tapas



Semana 3

Se afloja las tapas de los frascos de cultivo



Semana 4

Se retira las tapas de los frascos de cultivo



Semana 5

Comienzo de la colonización de microorganismos



Semana 6

Trasplante de individuos a macetas

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Anexo 5. Resumen fotográfico acerca de señales de estrés en individuos

## Señales de estrés en los individuos

### Clorosis



Semana 3 - *Gongora* sp. #3



Semana 4- *Gongora* sp. #8



Semana 7- *C. iricolor* #8

### Raíces oscuras



Semana 5 - *Gongora* sp. #6



Semana 5 - *Gongora* sp. #6

### Necrosis



Semana 8 - *C. iricolor* #9

### Marchitamiento



Semana 10 - *C. iricolor* #8

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

## Anexo 6. Composición del fertilizante usado



Fuente: Autor

Elaboración: Autor

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, M. (1989). Los sustratos en horticultura ornamental. *Revista Agrícola Vegetal*, 3, 146–152.
- ACEA. (n.d.). Los factores ambientales y su influencia en invernaderos. Recuperado October 23, 2019, de <https://acea.com.mx/articulos-tecnicos/alex-j-pacheco/60-los-factores-ambientales-y-su-influencia-en-invernaderos-313-la-luz-dentro-del-invernadero>
- American Orchids Society. (2010). Góngora. Recuperado October 12, 2019, de <http://www.aos.org/orchids/collectors-items/gongora.aspx>
- Arbós, A. (n.d.). Las orquídeas. Su cultivo. *Horticultura*, 33–48.
- Arditty, J. (1967). *Factors affecting the germination of orchid seeds* (1era ed.). California: Revista Botánica.
- Ataroff, M. (2001). *Bosques Nublados del Neotropico*. (M. Kappelle & A. Brown, Eds.). Costa: Editorial IMBIO.
- Balslev, H. (1988). Distribution Pattern of Ecuadorean Plant Species. *Taxon*, 3(3), 567–577.
- Barbery, R., & Morales, I. (2011). Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquídea *Cattleya nobilior* “ Flor símbolo de Concepción .” *Centro Para La Participación y El Desarrollo Humano Sostenible CEPAD – Bolivia*. Bolivia: Centro para la Participación y el Desarrollo Humano Sostenible CEPAD. Recuperado de <https://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>
- Bateson, J., Grout, B., & Lane, S. (1987). *The influence of container on the multiplication rate of regenerating plant cell cultures*.
- Blanke, M., & Belcher, A. (1989). Stomata of apple leaves cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 19, 85–89.
- Bottom, S. (2016). ORCHIDS. *Orchid Disease Control: Part1*, 85(2), 109.
- Calderón, E. (2007). Orquídeas primera parte. In *Libro Rojo de plantas de Colombia* (6th ed.). Bogotá: Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C., & Bebergh, P. (1984). Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured rosa multiflora. *American Society of Horticulture*, 115, 141–145.
- Cardoso, J. C., Rossi, M. L., Rosalem, I. B., & Teixeira da Silva, J. A. (2013). Pre-

- acclimatization in the greenhouse: An alternative to optimizing the micropropagation of gerbera. *Scientia Horticulturae*, 164, 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.022>
- Conner, L., & Conner, A. (1984). Comparative water loss de leaves of *Solanum laciniatum* plants cultured in vitro and in vivo. *Plant Science Letters*, 36, 241–246.
- Cribb, P., & Whistler, A. (1996). *Orchids of Samoa* (Eighteen). London: Royal Botanic Gardens.
- Day, J., Witte, W., & Dickerson, H. (1988). The response of *Acer robrum* cvs. and *Betula nigra* “Heritage” to fertilizer rate and light regime. *HortScience*, 230–820.
- De Pedro, L. (2015). *Invernaderos en regiones tropicales y sub-tropicales Balance de energía, diseño y manejo del ambiente físico*. Universidad Nacional del Litoral. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/769/TFI.pdf?sequence=1>
- Dearnaley, J. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17, 475–486. <https://doi.org/DOI 10.1007/s00572-007-0138-1>
- Demming-Adams, B., & Adams, W. (1992). Photoprotection and others responses of plants to high light stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 599–626.
- Díaz, I., & Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biologicas*, 8(8), 138–149. Recuperado de <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/view/9/9>
- Dodson, C., & Dodson, M. (1982). Orchids of Upland Ecuador. *Icones Plantarum Tropicarum*, 5, 401–500.
- Dodson, Calaway. (2003). WHY ARE THERE SO MANY ORCHID SPECIES ? *Lankesteriana*, 7, 99–103.
- Dustan, D., & Turner, K. (1984). The acclimation of micropropagated plants. In *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. (First, pp. 123–129). Academic Press, Inc.
- Endara, L., Williams, N. H., & León, S. (2009). Patrones de endemismo de orquídeas endémicas ecuatorianas: perspectivas y porioridades para la conservación. In J. Suarez (Ed.), *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchid* (pp. 63–70). Loja: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Fal, M., Majada, J., & Sánchez, R. (2014). Physical environment in non-ventilated culture vessels affects in vitro growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus*

- caryophyllus* l. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 38(6), 589–594.
- Gentry, A., & Dodson, C. (1987). Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 74(2), 205–233.
- George, E., Hall, M., & Klerk, G.-J. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. (E. George, M. Hall, & G.-J. Klerk, Eds.) (3era ed.). Springer.
- Gil, E., López, S., & López, A. (2017). Aclimatación de plántulas in vitro de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “violeta africana” a condiciones de invernadero. *Arnaldoa*, 24(1), 343–350.
- Gil, V., Bastidas, T., Flores, E., & Navarro, L. (2007). Reproducción y manejo de orquídeas. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Gomes da Rocha, P., Pedroso de Oliveira, R., Bueno, W., & Lyra dos Santos, U. (2010). Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação in vitro de morangueiro Light-emitting. *Ciencia Rural*, 40, 1922–1928.
- Google Maps. (n.d.). Mapa UTPL. Recuperado November 5, 2019, de <https://www.google.com.ec/maps/@-3.9877396,-79.1971492,299m/data=!3m1!1e3?hl=es>
- Granada, C. (1990). Manejo de plantas en el invernadero. In C. Rosell & V. Villalobos (Eds.), *Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales* (pp. 85–88). Roma: FAO.
- Griffis, J., Hennen, G., & Oglesby, R. (1983). Establishing tissue cultured plants in soil. *Comb Proc Intl Plant Prop Soc*, 33, 629–622.
- Grout, B. (1975). Wax development of leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. Currawong regenerated de meristem culture. *Plant Science Letters*, 5, 401–405.
- Grout, B. (1988). Photosynthesis of regenerated plantlets in vitro, and the stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*, 230, 129–135.
- Grout, B., & Aston, M. (1978). Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated de meristem culture. *Annals of Botany*, 42, 993–995.
- Gupta, S., & Jatothu, B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes ( LEDs ) in in vitro plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 7(July 2013), 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>
- Hazarika, B. N., Teixeira da Silva, J. A., & Talukdar, A. (2006). Effective acclimatization of in vitro cultured plants: methods, physiology and genetics. *Floriculture, Ornamental and*

*Plant Biotechnology Volume II*, (December 2006), 427–438.

- Hetherington-Rauth, M. C., & Ramírez, S. R. (2015). Evolutionary Trends and Specialization in the Euglossine Bee–pollinated Orchid Genus *Gongora*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 100(4), 271–299. <https://doi.org/10.3417/2014035>
- Hetherington-Rauth, M. C., & Ramírez, S. R. (2016). Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of Botany*, 118, 135–148. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw072>
- Higgins, W., & Alrich, P. (2016). *Cattleya*. *ORCHIDS*, 660–666.
- Hiti Bandaralage, J. C. A., Hayward, A., O'Brien, C., Beveridge, C., & Mitter, N. (2018). Acclimatization of micropropagated mature avocado. *Acta Horticulturae*, 1224, 13–20. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1224.3>
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). (2008). *Orchidaceae Taxonomic*. Recuperado October 5, 2019, de [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=43397#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=43397#null)
- Inventaire National du Patrimoine Naturel. (n.d.). *Gongora maculata* Lindl. Recuperado October 12, 2019, de [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/735378/tab/taxo](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/735378/tab/taxo)
- Iriarte, A., Aravia, L., & Matias, C. (2002). *Acondicionamiento térmico con energía solar de un invernadero rusticadero para la producción de plantas*. *Congreso regional de ciencia y tecnología*.
- Jenny, R. (1993). *Monograph of the genus Gongora Ruiz & Pavon*. USA: Koeltz Scientific Books.
- Jorgensen, P., & León- Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. Louis, Missouri: Monographs in Systematic Botany de the Missouri Botanical Garden.
- Knudson, L. (1946). A nutrient for germination of orchids seeds. *American Orchids Society*, 15, 214–217.
- Kozai, T. (1988). High technology in protected cultivation de environmental control engineering point of view. *Horticulture in High Technology*, 1–43.
- Kozai, T., Hayashii, M., Hirosawa, Y., Kodama, T., & Watanabe, I. (1987). Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivation. In *Environmental control for acclimatization of in vitro cultured plants* (pp. 349–358).

- Krikorian, D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In W. Roca & L. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones* (pp. 41–78). Cali: Centro Internacional de agricultura Tropical.
- Kruckeberg, A., & Rabinowitz, D. (1985). Biological aspects of endemism in higher plants. *Ecological System*, 16, 447–479.
- Kumar, N., & Reddy, M. (2011). In vitro Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest and Environmental Science*, 27(2), 61–72.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P., & Kongbangkerd, A. (2018). In vitro propagation of *Epipactis flava* Seidenf., an endangered rheophytic orchid: a first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 135(3), 419–432. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1475-9>
- León, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2012). Libro Rojo de plantas endémicas del Ecuador. Recuperado October 11, 2019, de <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500330>
- Levitus, G., Echenique, V., & Rubinstein, C. (n.d.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. (G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski, Eds.). Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- López, C., & González, I. (1996). A propósito de semillas. Enc. en la Biol.
- Luan, V., Thien, N., Khiem, D., & Nhut, D. (2006). In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. In *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*. (pp. 175–177). Ho Chi Minh: Nong Lam University.
- Martin, J., & Juniper, B. (1970). The Cuticles of Plants. *Martin's Press*.
- Martínez, G. (2002). Materiales plásticos para cubiertas de invernadero. Irapuato: Programa conjunto de la Universidad de Valencia y la Universidad de Guanajuato.
- McKendric, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Meisel, J. E., & Woodward, C. L. (2005). Andean Orchid Conservation and the Role of Private Lands: A Case Study de Ecuador. *Selbyana*, 26(February), 49–57. <https://doi.org/10.2307/41760173>
- Ministerio del Ambiente. (2015). *Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda*

- comercial* (Primera). Perú: Editora Image Print Peru.
- Missouri Botanical Garden. (2009). *Cattleya iricolor* Rchb. f. Recuperado October 12, 2019, de <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=23511665&projectid=2>
- Missouri Botanical Garden. (2009). *Gongora Ruiz & Pav.* Recuperado October 12, 2019, de <http://www.tropicos.org/Name/40016104?projectid=2>
- Mosqueda, A. M., Cázares, J. G., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). *Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco División Académica de Ciencias Agropecuarias.* Recuperado de <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 15, 437–497.
- Nagaraju, V., & Mani, S. K. (2005). Rapid in vitro propagation of orchid *Zygopetalum intermedium*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14(1), 27–32. <https://doi.org/10.1007/BF03263220>
- Nivelo, A., & Rojas, C. (2019). *Evaluación de un medio óptimo para el crecimiento in vitro y ex vitro de orquídeas del género Epidendrum micorrizadas.* Universidad de Cuenca.
- Oak Hill Gardens. (2018a). Orquídea *Cattleya*. Recuperado October 12, 2019, de <https://www.oakhillgardens.com/blog/cattleya-orchids>
- Oak Hill Gardens. (2018b). Orquídeas *Gongora*. Recuperado October 12, 2019, de <https://www.oakhillgardens.com/blog/gongora-orchids>
- Otero, J., & Bayman, P. (2009). Symbiotic vs. asymbiotic seed germination in epiphytic orchids. *Acta Agronomica*, 58(October 2009), 270–2776.
- Painter, T. (2017). The Definition of Necrosis in Plants. Recuperado January 21, 2020, de <https://sciencing.com/the-definition-of-necrosis-in-plants-12003546.html>
- Palmer, H., Newton, A., Doyle, C., Thomson, S., & Stewart, L. (1997). An economic evaluation of alternative genetic improvement strategies for farm woodland trees. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 71, 333–347.
- Paredes, E. F. (2012). *Determinación de los protocolos para cultivo in-vitro de las especies Epidendrum schistochilum y Oncidium cultratum.* Universidad Politécnica Salesiana (Sede Quito). Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4072>
- Paula, A., Figueiredo, R. D. C., & Kerbauy, G. B. (2004). Photoperiod and temperature effects

- on in vitro growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.008>
- Pearce, F. (2002). Tesoro de los Andes Ecuatorianos. World Wildlife Foundation (WWF).
- Portilla, J. (2007). *Orquídeas Manual de Cultivo* (Primera). Cuenca: Ecuagenera.
- Pospisilovva, J., Ticha, I., Kadlecěk, P., Haisel, D., & Plzákova, S. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, 42, 481–497.
- Preece, J. E., & Sutter, E. G. (1991). *Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field*. (P. Debergh & R. Zimmerman, Eds.), *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_5)
- Read, P. E., & Preece, J. E. (2003). Environmental management for optimizing micropropagation. *Acta Horticulturae*, 616, 49–58. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.2>
- Richardson, K., Peterson, L., & Currah. (1992). Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, 70, 291–300.
- Rodríguez, A. (2013). *Inducción de la germinación in vitro de Epidendrum radicans Pav. ex Lindl.* Universidad Nacional de México.
- Salazar. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plantulas de *Cattleya mendelii* dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronomica*, 61(1), 69–78.
- Salazar, F., Benavides, O., Trespacios, L., & Pinzón, F. (2010). *Informe sobre el Estado de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente, Componente de biodiversidad Continental-2009*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos.
- Sánchez, A., & Rodríguez, K. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador. *Ecovida*, 8(1), 64–83.
- Sandoval, J., Brenes, G., & Pérez, L. (1991). *Micro propagación del “plátano” y “banano.”* Costa Rica: CATIE.
- Segura Munguía, S., & Torres Ripa, J. (2009). *Historia de las plantas en el mundo antiguo* (Primera). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Sonoike, K. (2011). Photoinhibition of photosystem I. *Physiologia Plantarum*, 142, 56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01437.x>
- Sutter, E., & Langhans, R. (1982). Deletion of epicuticular wax and its effect on water loss in

- cabbage plants regenerated de shoot-tip culture. *Can J Bot*, 60, 2896–2902.
- Swiss Orchid Foundation at the Herbarium Jany Renz. (2016). *Gongora jauariensis* Campacci & J.B.F.Silva. Recuperado October 28, 2019, de [https://orchid.unibas.ch/index.php/en/?option=com\\_content&view=article&id=3&SearchResultID=254110/Gongora/jauariensis&setLang=en-GB](https://orchid.unibas.ch/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=3&SearchResultID=254110/Gongora/jauariensis&setLang=en-GB)
- Talbott, L. D., Rahveh, E., & Zeiger, E. (2003). Relative humidity is a key factor in the acclimation of the stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 54(390), 2141–2147. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg215>
- Tapia, M. (2009). Fundamentos de Producción de Cultivos: Invernaderos. Recuperado October 24, 2019, de [http://www.sap.uchile.el/descargas/prod\\_cultivos/FPC\\_linveraeros.pdf](http://www.sap.uchile.el/descargas/prod_cultivos/FPC_linveraeros.pdf)
- Thorpe, T., & Yeung, E. (2011). *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media.
- Tortosa, J. (1990). La turba, su caracterización física y química, evaluación para cultivos en contenedores. *Revista Agrícola Vegetal*, 106, 777–783.
- Van Den Berg, C. (2009). Phylogeny and systematics of *Cattleya* and *Sophranitis*. In *The 19th World Orchid Conference* (pp. 319–323). Miami.
- Villalobos, M., & Thorpe, A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In W. Roca & L. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones* (pp. 127–141). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Yoon, M., Cha, B., & Kim, J. (2013). Recent Trends in Studies on Botanical Fungicides in Agriculture. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 1–9.
- Ziv, M. (1986). In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In A. P. G. (Ed.), *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications* (pp. 187–196). Butterworths: Withers LA.