

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Germinación asimbiótica y cultivo *in vitro* de la orquídea epífita
Epidendrum jamiesonis y de la orquídea terrestre *Pleurothallis
pulchella***

Proyecto de Investigación

Nathalia Gabriela Valencia Glushchenko

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 23 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACION DE TRABAJO DE TITULACION

Germinación asimbiótica y cultivo *in vitro* de la orquídea epífita *Epidendrum jamiesonis* y de la orquídea terrestre *Pleurothallis pulchella*

Nathalia Gabriela Valencia Glushchenko

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

María Mercedes Cobo, MSc.

Firma del profesor:

Nombre del profesor, Título académico:

Andrea Montero, MSc.

Firma del profesor:

Quito, 23 de mayo de 2019

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Nathalia Gabriela Valencia Glushchenko

C. I.:

1723766463

Código:

00123609

Fecha:

Quito, 23 de mayo de 2019

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis padres y mi hermano, por su apoyo incondicional y eterno durante cada uno de los pasos de mi formación, por siempre confiar en mí, por su ejemplo, paciencia y amor.

También, quiero agradecer a María de Lourdes Torres por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y su guía continua. Así como a Andrea Montero y María Mercedes Cobo por sus valiosas enseñanzas y apoyo constante. De igual forma, a los miembros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal por su ayuda en todo momento.

Además, quiero agradecer a José Ricardo por su apoyo incondicional, alegría y motivación. Como también a increíbles amigos con quienes compartimos conocimiento, alegrías y miles de recuerdos durante toda la carrera, Ricki, Sol, Cami, Camilo, Pedro, Sofí, Pame, Martín, Caro, Gaby y amigos en general.

Resumen

Ecuador es considerado un país con altísima diversidad de especies de orquídeas; sin embargo, algunas especies se encuentran en estado de vulnerabilidad y otras en peligro crítico de extinción. Los principales factores que amenazan a las orquídeas son la destrucción de hábitat, el manejo inadecuado de recursos, la contaminación ambiental y la sobrecolección de muestras. Las cápsulas de orquídeas contienen generalmente de 2-3 millones de semillas, pero en condiciones naturales únicamente germina el 2-3%. Estos bajos porcentajes de germinación se deben principalmente a la carencia de endospermo, la necesidad de formar relaciones simbióticas con micorrizas y su lento crecimiento. Una alternativa para obtener una germinación eficiente, que permite sobrellevar estas limitaciones, es emplear técnicas de cultivo *in vitro*. El objetivo de este estudio fue introducir a condiciones *in vitro* semillas de las especies *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella*. Se colectaron cápsulas maduras de plantas de orquídeas y se probó dos formas de siembra, una con semillas obtenidas directamente de la cápsula desinfectada y otra con semillas secadas previamente en sílica gel. Para la siembra se emplearon 8 tratamientos, usando 2 medios de cultivo basales ($\frac{1}{2}$ MS y KC), suplementados o no con carbón activado (2000 mg L^{-1}) y ácido giberélico (0.2 mg L^{-1}). Mediante un análisis de varianza se determinó que el medio de cultivo es el factor que más aporta sobre cada variable de respuesta analizada, desde el avance hasta fase 5 y elongación. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS, que se caracteriza por presentar una mayor concentración y variedad de sales. El tratamiento de $\frac{1}{2}$ MS con GA_3 fue el más eficiente para el desarrollo hasta fase 5 de semillas de *E. jamiesonis*, (además que mostró el menor número de días para iniciar la germinación). Mientras que en el caso de *Pleurothallis pulchella*, el medio ideal para la etapa inicial de germinación resultó ser $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado. Para el desarrollo posterior de elongación el mejor medio fue el de $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado para semillas de *E. jamiesonis* (1.54 cm en 17 semanas). Para la aclimatación de *E. jamiesonis*, se probaron 3 sustratos diferentes, siendo la combinación de musgo *Spaghnum* y piedra pómez, donde se obtuvo la mayor supervivencia (cercana al 100%). Los resultados obtenidos representan una alternativa adecuada para introducir a la especies *E. jamiesonis* y *P. pulchella*, en condiciones *in vitro*, para su propagación y pueden servir como herramienta para la conservación y el estudio de especies de importancia para Ecuador.

Abstract

Ecuador is considered a country with a high diversity of orchid species; however, some species are in a vulnerable state and others are critically endangered. The main factors that threaten orchids' species are the destruction of their habitat, the inadequate management of resources, environmental contamination and overcollection of specimens. Orchid capsules generally contain 2-3 million seeds, but under natural conditions only 2-3% germinate. These low percentages of germination are mainly due to the lack of seeds endosperm, to the need of forming symbiotic relationships with mycorrhizae and to their slow growth. An alternative to overcome these limitations and obtain an efficient germination, is the use of *in vitro* culture techniques. The objective of this study was to introduce seeds of *Epidendrum jamiesonis* and *Pleurothallis pulchella* to *in vitro* conditions. Mature capsules of orchid plants were collected, and two forms of germination were tested, one with seeds obtained directly from the disinfected capsule and another with seeds previously dried in silica gel. For the germination, 8 treatments were tested, using 2 basal culture media ($\frac{1}{2}$ MS and KC), supplemented or not with activated charcoal (2000 mg L⁻¹) and gibberellic acid (0.2 mg L⁻¹). An analysis of variance was performed, and it was determined that the culture medium is the factor that contributes the most to each response variable analyzed, nil seeds reached to phase 5 and elongation. Overall, the best results were obtained in the $\frac{1}{2}$ MS culture medium, which is characterized by a higher salt concentration and variety, which is essential for the plant development. For the development of *E. jamiesonis*' seeds to phase 5, the culture media $\frac{1}{2}$ MS supplemented with GA₃ was the most efficient (in addition, it showed the first case of germination). In the case of *Pleurothallis pulchella* seeds, the best medium for the initial stage of germination was $\frac{1}{2}$ MS with activated charcoal. For the elongation, the best culture medium was $\frac{1}{2}$ MS with activated charcoal for *E. jamiesonis* plantlets (1.54 cm in 17 weeks). For the acclimation of *E. jamiesonis* plants, 3 different substrates were tested, and the combination of *Spaghnum* moss and pumice stone, presented the highest survival rate (close to 100%) and growth rate. The results obtained in this study represent an adequate alternative to introduce *E. jamiesonis* and *P. pulchella* seeds to *in vitro* conditions, for their propagation. The protocols presented in this study could serve as a tool for the conservation and study of species of importance in Ecuador.

Tabla de contenido

Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción	11
1.1. Orquídeas	11
1.1.1. Diversidad, distribución y características generales	11
1.1.2. Descripción morfológica.....	12
1.1.3. Tipos de reproducción.....	14
1.1.4. Limitaciones fisiológicas de germinación de orquídeas	16
1.1.5. Adaptaciones a distintos hábitats	16
1.1.6. Importancia de las orquídeas a nivel ecológico	17
1.1.7. Estado de conservación de orquídeas	18
1.2. Orquídeas en el Ecuador	19
1.2.1. Diversidad	19
1.2.2. Conservación.....	20
1.3. Epidendrum jamiesonis.....	20
1.4. Pleurothallis pulchella.....	21
1.5. Germinación y cultivo in vitro de orquídeas.....	22
1.5.1. Medios de cultivo.....	23
1.5.2. Reguladores de crecimiento	23
1.6. Aclimatación	24
1.6.1. Sustratos	24
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo general.....	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. Área de estudio.....	26
4. Justificación	26
5. Materiales	27
5.1. Material vegetal fresco.....	27
5.2. Material vegetal seco	27
5.3. Material para desinfección.....	28
5.4. Material para siembra	28
5.5. Toma de datos	29
5.6. Subcultivo	29
5.7. Material para aclimatación.....	29
5.8. Programas para análisis de datos	29
6. Metodología	30
6.1. Recolección de material inicial y almacenamiento de material vegetal	30
6.2. Siembra de semillas de orquídeas a partir de cápsulas frescas	31
6.1.2. Desinfección	31

6.1.3.	Introducción del material a condiciones in vitro.....	31
6.2.	Siembra de semillas secas de orquídeas.....	32
6.2.1.	Desinfección	32
6.2.2.	Introducción del material a condiciones in vitro.....	33
6.3.	Ensayos de elongación y aclimatación de plántulas obtenidas de semillas frescas y secas	33
6.3.1.	Subcultivos.....	33
6.3.2.	Aclimatación.....	34
6.4.	Análisis de datos	35
7.	Resultados.....	36
7. 1.	Germinación.....	36
7. 1. 1.	Germinación de Epidendrum jamiesonis a partir de semillas frescas.....	36
7. 1. 2.	Germinación de Epidendrum jamiesonis a partir de semillas secas	38
7. 1. 3.	Comparación de germinación entre semillas frescas y secas.....	39
7. 1. 4.	Germinación de Pleurothallis pulchella a partir de semillas frescas.....	39
7. 1. 5.	Comparación de la germinación de Epidendrum jamiesonis y Pleurothallis pulchella a partir de semillas obtenidas de cápsulas frescas.....	40
7. 2.	Elongación	41
7. 2. 1.	Elongación de plántulas	41
7. 3.	Aclimatación.....	42
7. 3. 1.	Supervivencia y crecimiento de plántulas aclimatadas, que pasaron por dos periodos distintos de elongación (32 y 55 semanas en periodo de elongación)	42
8.	Discusión	43
8. 1.	Componentes de medios de cultivo	43
8. 2.	Germinación.....	45
8. 3.	Elongación	50
8. 4.	Aclimatación.....	51
9.	Conclusión	53
10.	Recomendaciones	53
11.	Bibliografía	56
12.	Tablas	67
13.	Figuras	72

Índice de tablas

Tabla 1. Tratamientos probados para las etapas de germinación y elongación de las especies de estudio	67
Tabla 2. Fases de desarrollo inicial de especies de orquídeas	67
Tabla 3. Porcentaje de germinación y porcentaje de semillas que se desarrollaron hasta fase 5, de semillas frescas y secas de <i>Epidendrum jamiesonis</i> en 8 tratamientos probados.	68
Tabla 4. Porcentaje de germinación total y porcentaje de desarrollo hasta fase 5 (independiente del tratamiento probado) de semillas frescas y semillas secas de <i>Epidendrum jamiesonis</i> y resultados de la prueba t pareada	68
Tabla 5. Porcentaje de germinación y desarrollo hasta fase 5 de semillas obtenidas de cápsulas frescas de <i>Pleurothallis pulchella</i> in vitro sobre los 8 tratamiento.....	69
Tabla 6. Porcentaje de germinación total de semillas obtenidas de cápsulas frescas de <i>Epidendrum jamiesonis</i> y de <i>Pleurothallis pulchella</i> y resultados del análisis de varianza.....	69
Tabla 7. Elongación de plántulas obtenidas de semillas frescas y semillas secas de <i>Epidendrum jamiesonis</i> durante 17 semanas in vitro en 8 tratamientos probados.	70
Tabla 8. Resultados de supervivencia y crecimiento de plántulas aclimatadas durante tres meses, que pasaron por un periodo previo de elongación de 32 y 55 semanas in vitro.	70
Tabla 9. Composición de medios de cultivo empleados en los ensayos realizados con <i>Epidendrum jamiesonis</i> y <i>Pleurothallis pulchella</i>	71

Índice de figuras

- Figura 1.** Fotografías de las especies de estudio *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella* 72
- Figura 2.** Fotografías del desarrollo de las semillas por las distintas 5 fases de desarrollo iniciales de las dos especies de estudio, tomadas bajo el estereomicroscopio con un aumento de 1.6X.73
- Figura 3.** Gráficas de magnitud de cada factor probado y sus interacciones sobre el porcentaje de semillas germinadas después de 4 semanas. **A.** Ensayo de semillas frescas de *E. jamiesonis*. **B.** Ensayo de semillas secas de *E. jamiesonis*. **C.** Ensayo de semillas de *P. pulchella*. A la derecha de cada barra se identifican los valores p, resultado del ANOVA del diseño factorial para la comparación de porcentaje de germinación. Las barras de color morado representan a los factores o interacciones significativas, mientras que las grises representan a los factores o interacciones no significativas. Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%. 74
- Figura 4.** Desarrollo de las semillas por las distintas fases de desarrollo a las 4, 8 y 12 semanas. **A)** Semillas frescas de *E. jamiesonis*. **B)** Semillas secas de *E. jamiesonis* **C)** Semillas frescas de *P. pulchella*. 75
- Figura 5.** Gráficas de magnitud de cada factor probado y sus interacciones sobre el porcentaje de semillas germinadas que avanzaron hasta fase 5 de desarrollo después de 13 semanas. **A.** Ensayo de semillas frescas de *E. jamiesonis* **B.** Ensayo de semillas secas de *E. jamiesonis*. **C.** Ensayo de semillas de *P. pulchella*. A la derecha de cada barra se identifican los valores p, resultado del ANOVA del diseño factorial para la comparación de porcentaje de germinación. Las barras de color morado representan a los factores o interacciones significativas, mientras que las grises representan a los factores o interacciones no significativas. Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%. 76
- Figura 6.** Fotografías ejemplo de elongación de plántulas en los distintos periodos de tiempo, en los cuales se lograron identificar diferencias significativas en el crecimiento. Puesto que el medio KC, mostro poco crecimiento; mientras que ½ MS con carbón activado presentó el mayor crecimiento..... 77
- Figura 7.** Gráficas de magnitud de cada factor probado y sus interacciones sobre el crecimiento de plántulas de *E. jamiesonis* después de 13 semanas en etapa de elongación. A la derecha de cada barra se identifican los valores p, resultado del ANOVA del diseño factorial para la comparación de porcentaje de germinación. Las barras de color morado representan a los factores o interacciones significativas, mientras que las grises representan a los factores o interacciones no significativas. Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%. 78
- Figura 8.** Fotografías de aclimatación **A)** Plántulas obtenidas in vitro que pasarán a aclimatación. **B)** Plántulas en aclimatación en sustrato de musgo *Sphagnum* y piedra pómez. **C)** Plántulas en aclimatación en sustrato de cáscara de arroz y cuesco de palma africana. **D)** Plántulas en aclimatación en sustrato de aserrín y piedra pómez. 79
- Figura 9.** Gráfica porcentaje de supervivencia y crecimiento de plántulas de *E. jamiesonis* en aclimatación. El crecimiento de las plántulas hace referencia a la diferencia de tamaño de las plántulas desde el inicio de la aclimatación y el tamaño en cada semana. **A)** Plántulas que crecieron durante 42 semanas de in vitro. Resultados del ensayo de aclimatación después 24 semanas de aclimatación. **B)** Plántulas que crecieron durante 67 semanas in vitro. Resultados del ensayo de aclimatación después 12 semanas de aclimatación. 80

1. Introducción

1.1. Orquídeas

1.1.1. Diversidad, distribución y características generales

La familia Orchidaceae constituye uno de los filos de plantas más diversos, incluyendo alrededor de 900 géneros, de los cuales se estima que existen entre 25000 y 35000 especies (Dressler, 1993; Mabberley, 1997). Toda su diversidad está relacionada con un alto número de especies, que se caracterizan por una amplia variedad de formas, tamaños y colores, como un sinnúmero de hábitats (Dressler, 1993).

Las orquídeas son consideradas cosmopolitas, puesto que se encuentran en casi en todos los ambientes a excepción de los desiertos y glaciares, mientras que su mayor diversidad se encuentra en los trópicos. De forma general en el área tropical de América del Sur existen alrededor de 350 género, en la zona tropical de Asia alrededor de 300 géneros, en la zona tropical de África alrededor de 150 géneros, en Oceanía alrededor de 70 géneros, en Europa y Asia alrededor de 60 y por último en América del Norte alrededor del 30 géneros (Lakshman, 2015). Muchas especies de orquídeas son endémicas, es decir están limitadas a áreas geográficas y rangos altitudinales específicos (Cardelus *et al.*, 2006). Se han identificado áreas con alto endemismo entre las que destacan: Ecuador, Colombia, Madagascar, Guayana, Nueva Guinea y la costa de Brasil (Pridgeon *et al.*, 2009)

Las orquídeas se caracterizan por ser monocotiledóneas (Menchaca & Moreno, 2011) y pueden ser diferenciadas según su tipo de crecimiento: monopodial o simpodial. El crecimiento monopodial hace referencia a una planta que desarrolla un solo tallo principal, con hojas alternadas, inflorescencia axilar y con raíces aéreas que se originan entre los nudos. Mientras que el crecimiento simpodial, más común en orquídeas, es un tipo de

crecimiento en el cuál se desarrollan varios tallos, del cual regeneran yemas laterales y pseudobulbos (Ruiz *et al.*, 2016).

1.1.2. Descripción morfológica

Las orquídeas presentan varias características morfológicas que las convierten en plantas atractivas y distintivas. Se destaca la presencia de tallos de diferente forma y tamaño, raíces carnosas, flores llamativas y cápsulas llenas de millones de pequeñas semillas.

El tallo de una orquídea es terete, es decir, cilíndrico y engrosado. Una de las variantes de tallos característicos de las orquídeas epífitas son los pseudobulbos. Estos son tallos fotosintéticos, que tienen una forma engrosada ovoide y que tienen la función de almacenar agua, carbohidratos y nutrientes (Freuler, 2008). Dependiendo de la especie de orquídeas, las hojas pueden brotar desde la base del tallo, desde la zona apical de la planta o a lo largo de todo el tallo. En su mayoría, las hojas carecen de un peciolo, por lo que directamente la hoja se une al tallo, con una vaina envolvente (Freuler, 2008).

Las raíces son carnosas o tuberosas y están recubiertas por una capa celular conocida como velamen que protege a la epidermis, absorbe la humedad e impide el desecamiento. Debajo del velamen se encuentra una capa de células llamada córtex, que es una zona en la que se alojan los hongos simbióticos micorrízicos (Porembski & Barthlott, 1988).

Las flores de las orquídeas en su mayoría son hermafroditas, es decir que tienen órganos reproductivos masculinos y femeninos. Se caracterizan por ser zigomorfas, en otras palabras, presentan un único plano de simetría bilateral. Además son trímeras, puesto que tienen tres sépalos y tres pétalos, uno de los cuales tiene un tamaño, color o textura

distintivo y diferente a los demás pétalos y es conocido como labelo. Asimismo, consta de una columna o ginostemo, estructura que fusiona estambres y pistilos. Esta estructura incluye un rostelo, que está encargado de separar el estigma de las anteras, que inhibe la autopolinización en algunas especies y en otras especies facilita a los polinizadores a adherir el polen. Los granos de polen se encuentran unidos formando una agrupación que lleva el nombre de polinio. Los polinios se ocultan en una cavidad detrás de la capucha de la antera (Freuler, 2008).

Las cápsulas de las orquídeas cumplen el rol de frutos. Estas estructuras pueden almacenar millones de diminutas semillas, que pueden medir en largo de 0.05 mm hasta un máximo de 6 mm. Por su pequeño tamaño, las semillas carecen de endospermo, por lo que para su germinación es indispensable que se asocien a hongos micorrízicos. Las semillas se liberan cuando la cápsula se seca y se abre, y son dispersadas principalmente por el viento (Arditti & Ghani, 2000).

Hasta el día de hoy el mecanismo de formación de las semillas desde la polinización no está completamente claro. Existen pocos casos descritos en los que la doble fecundación en las orquídeas no ocurre (Batygina & Bragina, 2003). Mientras que en la mayoría de los casos descritos si se produce una doble fecundación, pero el desarrollo del endospermo no es completo o se produce una degeneración del mismo (Vinogradova & Andronova, 2002; Yasugi, 1983). Se ha descrito que el grado de desarrollo del endospermo así como su degeneración difiere según la especie (Batygina & Bragina, 2003). Algunos autores describen que la reducción del endospermo depende directamente de la reducción del tamaño del embrión (Teryokhin & Kamelina, 1969). Otros autores sugieren que la pérdida del endospermo apareció como una ventaja adaptativa para poder ocupar hábitats que han

quedado libres en zonas perturbadas; puesto que las semillas de pequeño tamaño pueden dispersarse con mayor facilidad y son más adaptables. Esta idea está vinculada con su capacidad de asociarse con micorrizas, que obvió su necesidad de producir endospermo (Benzing, 1981).

1.1.3. Tipos de reproducción

Las orquídeas pueden reproducirse tanto de forma sexual como asexual. La reproducción sexual se da por medio de semillas, lo que facilita el incremento de la variabilidad genética (Menchaca & Moreno, 2011). Sin embargo, para una reproducción sexual exitosa es necesario que se produzca una asociación entre la semilla con un hongo micorrízico; puesto que las semillas de las orquídeas carecen de endospermo, las micorrizas cumplen la función de suplir la acción del endospermo (Semithn & Retad, 1997; Arditti & Ghani, 2000). Las micorrizas son hongos basidiomicetos de los filos *Basidiomycota* y *Ascomycota*, que tienen la capacidad de penetrar el embrión de una semilla de orquídea y proporcionar los suficientes nutrientes, proteínas importantes en la señalización celular, organización celular, transporte, defensa y aumentar el área de captación de agua (Dearnaley *et al.*, 2017). No obstante, ya que la unión de un hongo micorrízico con una semilla de orquídea tiene un nivel de especificidad alto, es decir comúnmente una especie de orquídea se puede asociar solamente con una especie de micorriza en específico y el encuentro de la micorriza específica con una diminuta semilla de orquídea puede resultar complicado (Shefferson, Weiss, Kull, & Taylor, 2005).

Estudios sugieren que esta alta especialización de los hongos micorrízicos a orquídeas es resultado de la evolución por el abundante número de las semillas diminutas a un amplio rango de ambientes. Considerando que se necesita un alto número de semillas

para su dispersión en hábitats especializados y que su carencia de endospermo, se desarrolló un mecanismo que permita una germinación y desarrollo a partir de los nutrientes accesibles en la zona y posibles compuestos limitantes para el desarrollo. Tomando en cuenta que el metabolismo de cada especie de hongo micorrízico es distinto, ciertas especies se pueden adaptar con mayor facilidad a ciertos ambientes que a otros. Siendo que cada una de las especies logró conquistar un lugar específico en el ambiente, aprovechando los recursos que de este ambiente, se dio una coevolución y especialización de orquídeas y hongos micorrízicos (Benzing & Atwood, 1984; Rasmussen & Rasmussen, 2009)

Por otro lado, cada especie de micorriza se desarrolla únicamente dentro de un rango específico ambiental, es decir necesita de condiciones específicas ambientales de temperatura, humedad; cambios en estos factores ambientales específicos pueden causar susceptibilidad de los mismos (Rasmussen & Rasmussen, 2009).

Al analizar la reproducción sexual de las orquídeas, un aspecto esencial es la polinización de las flores, que es mediada por insectos, aves o el viento (Arditti & Karin, 2000). Las formas vistosas de sus flores y sus agradables aromas son dos ejemplos de adaptaciones que las orquídeas han desarrollado para atraer a los polinizadores. Las flores de las orquídeas también presentan una simetría dorsiventral, que obliga al polinizador a adoptar una posición específica para tomar polinios. Además cuentan con un labelo, que produce néctar y sirve como posadero para insectos (Menchaca & Moreno, 2011).

Por otro lado, la reproducción asexual o vegetativa es aquella en la que no está involucrada la fecundación, y de la cual se forma una planta hija con características idénticas a la planta madre. Esto puede darse por multiplicación por *Keikis* (Menchaca & Moreno, 2011). La reproducción por *Keikis* consiste en la formación de un nuevo brote con

raíces, que nace de la planta madre desde la vara floral en la etapa floral. De forma general, la reproducción vegetativa en orquídeas es más rápida que la reproducción sexual, sin embargo, no contribuye al incremento de la variabilidad genética de las mismas. (Rojas *et al.*, 2004).

1.1.4. Limitaciones fisiológicas de germinación de orquídeas

Las orquídeas presentan limitaciones relacionadas a su proceso de germinación. Pese a que cada cápsula de orquídea contiene generalmente entre 2-3 millones de semillas, en condiciones naturales únicamente germinan el 2 o 3% (Luan *et al.*, 2006). Incluso, según Menchaca y Moreno, de forma natural por cada millón de semillas producidas, solamente germinan de 10 a 15 semillas, y de éstas solo 1-2 semillas llegan a convertirse en plantas adultas después de un periodo de 3 años (Menchaca & Moreno, 2011). Estos bajos porcentajes de germinación de las orquídeas en la naturaleza se deben a la carencia de endospermo en sus semillas y la necesidad de formar relaciones específicas simbióticas con hongos micorrízicos (Hadley, 1997).

1.1.5. Adaptaciones a distintos hábitats

Según el hábitat donde se desarrollan las orquídeas se pueden clasificar como: epífitas, terrestres o litófitas. El grupo de las orquídeas epífitas corresponde a aquellas orquídeas que se desarrollan sobre la superficie de otras plantas, obtienen humedad y nutrientes del ambiente y lluvia. Generalmente las orquídeas epífitas tienen hojas gruesas y suculentas, con estomas pequeños, con paredes celulares y cutículas gruesas. Estas adaptaciones permiten que su transpiración sea limitada y la retención de agua (de condensación o de lluvia) en sus órganos sea alta. En su mayoría sus tallos son engrosados y forman pseudobulbos que contienen tanto nutrientes como agua. Por otro lado, las orquídeas

terrestres son aquellas que crecen en tierra, a nivel fisiológico las orquídeas terrestres se diferencian de las orquídeas terrestres es que sus estomas son de mayor tamaño, y en su mayoría no presentan pseudobulbos. Por último, las orquídeas litófitas son aquellas orquídeas que crecen sobre rocas, se caracterizan por tener raíces muy duras, que permiten tomar nutrientes de forma directa desde los suelos de piedra. Debido a que existen tantas adaptaciones para las orquídeas a muchos tipos de sustratos, estas se han podido adaptar a una amplia variedad de ambientes, desde bosques tropicales hasta pastizales (Menchaca & Moreno, 2011).

1.1.6. Importancia de las orquídeas a nivel ecológico

Todas las especies de orquídeas cumplen funciones ecosistémicas importantes. Tomando en cuenta que una función ecosistémica hace referencia a la presencia de un organismo vivo que tiene interacción esencial con otros organismos y que su actividad permite el equilibrio a nivel ecológico. Es por eso que en estudios ecológicos las orquídeas han sido usadas como indicadores ecosistémicos. Puesto que los resultados del estudio de las tasas de polinización, las relaciones simbióticas tanto con micorrizas y el número de nuevos individuos en periodos específicos de tiempo se pueden relacionar con los cambios en condiciones ambientales y ecológicas (Newman *et al.*, 2007).

Una de sus funciones ecológicas está relacionada con el mantenimiento de condiciones del hábitat en el que se desarrollan, como la regulación hídrica asociada al crecimiento de orquídeas epífitas en la zona alta de los bosques. Las orquídeas epífitas junto con otras especies epífitas vegetales forman una barrera en el dosel del bosque, que detiene la neblina y las nubes bajas, resultando en un aumento de la precipitación local de forma constante y disminuye el deslizamiento rápido de agua en el bosque (Pypker *et al.*,

2006). Por lo que estas especies ayudan a disminuir la erosión, almacenar y filtrar agua de forma lenta y continua en el suelo (Stuntz *et al.*, 2002).

Una segunda función ecológica de las orquídeas está relacionada a su interacción con organismos eucariotas. Se ha reportado que la relación con hongos micorrízico es importante, puesto que estos son esenciales en el ciclo de nutrientes a nivel ecosistémico (Ospina, 1996). Por otro lado, la interacción animales-orquídeas, provee varios beneficios a los animales, quienes reciben refugio y alimento. Algunos animales que se ven beneficiados por esta relación son las abejas, avispas, hormigas y mariposas; así como también, las aves, principalmente los colibrís y también mamíferos como los murciélagos (Ospina, 1996).

1.1.7. Estado de conservación de orquídeas

A pesar de ser una familia extensa, hasta la fecha hay más de 1300 especies de orquídeas en la Lista Roja Global (IUCN, 2018), de las cuales alrededor del 60% pertenecen a una categoría crítica de amenaza (Fay, 2018). Las orquídeas dentro de estas listas han sido catalogadas como vulnerables, en peligro o incluso en estado crítico de peligro de extinción, debido a varios factores (Luan *et al.*, 2006). El primer factor que amenaza a las orquídeas es la destrucción de su hábitat. Esto se ha dado como resultado de la pérdida y fragmentación de áreas naturales, con fines de expansión agrícola y ganadera, petrolera, minería o incluso por incendios forestales. Considerando las altas tasas de endemismo, la pérdida de cobertura vegetal, elimina la posibilidad de supervivencia de ciertas poblaciones de orquídeas (Gómez *et al.*, 2016).

El segundo factor que afecta a las orquídeas es el cambio en la temperatura y humedad del ambiente, consecuencia del calentamiento global (Sletvold *et al.*, 2013). Las especies epífitas son especialmente susceptibles, ya que son dependientes a factores

ambientales y recursos atmosféricos al obtener agua y nutrientes desde la lluvia o vapor de agua (Nadkarni, 2010). De igual forma, los hongos micorrízicos son muy susceptibles a cambios climáticos, y considerando que es esencial la formación de relaciones simbióticas con las micorrizas, puede haber afectación en las orquídeas cuando existen limitaciones en el crecimiento de estos hongos (Rasmussen & Rasmussen, 2008).

El tercer factor que afecta a las orquídeas es la sobrecolección de individuos, suscitado por el interés comercial por la belleza y exuberancia de las flores de orquídeas. Las orquídeas son muy valoradas en el mercado de la horticultura. La venta de orquídeas empezó en el siglo 19, en el cual se empezaron a transportar en gran medida orquídeas desde los trópicos hacia Europa. Actualmente se continúa realizando una recolección no sostenible de esta familia de plantas desde su hábitat natural, que ha provocado una disminución de las poblaciones de algunas especies de orquídeas, que ha acelerado su paso a un estado de vulnerabilidad (Fay, 2018; Keel, 2007).

1.2. Orquídeas en el Ecuador

1.2.1. Diversidad

Puesto que Ecuador tiene alrededor del 11% de las especies de orquídeas a nivel mundial, ha sido declarado como “País de las orquídeas”. La familia Orchidaceae es la familia más diversa de plantas vasculares dentro del país, debido a que aproximadamente el 24% de toda la flora nativa ecuatoriana corresponde a orquídeas (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2014). Este 24% de flora nativa corresponde a orquídeas que crecen en todos los pisos altitudinales, desde los 0 hasta los 4500 msnm, que acoge a alrededor de 4 032 especies de orquídeas. Entre los géneros con mayor número de especies en el país se encuentran: *Pleurothallis*, *Epidendrum* y *Masdevallia* (Endara *et al.*, 2010).

Dentro de las 4032 especies que se encuentran en el Ecuador, 1710 de estas son especies endémicas (Endara *et al.*, 2010). Siendo que el mayor número de orquídeas endémicas se encuentra en microhábitats en los sistemas montañosos (1500 - 3000 msnm) (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2014).

1.2.2. Conservación

A pesar de la amplia diversidad de orquídeas en el Ecuador, según CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre) todas las orquídeas ecuatorianas se encuentran agrupadas dentro del apéndice I y su mayoría en el apéndice II. El apéndice I corresponde a especies que están en estado crítico de peligro de extinción y el apéndice II agrupa a aquellas especies que no están en peligro de extinción, pero si en vulnerabilidad (CITES, 2017). La conservación de muchas de las especies dentro del país es complicada, puesto que únicamente un 13% de las orquídeas están dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, que monitorea y protege directamente estas especies. Además, existen gestores públicos y privados como por ejemplo Jardines Botánicos tienen programas de conservación, que van desde la educación ambiental, iniciativas de turismo en la naturaleza, como empresas autorizadas que reproducen y comercializan especies de orquídeas (Ministerio de Turismo, 2013).

1.3. *Epidendrum jamiesonis*

Epidendrum jamiesonis, también descrita como *Epidendrum quitensium* y *Epidendrum evectum*, y conocida popularmente como *Maiwa*, es una orquídea epífita, nativa de la zona Andina, que se desarrolla en un rango altitudinal entre los 2000 a los 3500 msnm. En Ecuador, *Epidendrum jamiesonis* se encuentra distribuida en las provincias de Carchi, Cotopaxi, Imbabura y Pichincha (Reichenbach, 1856; Lojtnant, 1977; Jorgensen & Ulloa,

1994). Se caracteriza por crecer hasta 1 metro de altura, tener hojas suculentas y flores lilas y llamativas (Figura 1). De forma general esta especie ha sido usada como planta medicinal. La infusión de su flor es empleada para tratar problemas del corazón, mientras que la infusión de sus hojas es destinada al tratamiento de la inflamación (Jardín Botánico de Quito, 2019).

Su clasificación es la siguiente: reino: Plantae; filo: Tracheophyta; clase: Liliopsida; familia: Orchidaceae; género: Epidendrum; Especie: *jamiesonis*.

En el 2014, *Epidendrum jamiesonis* fue declarada orquídea emblemática de la capital del Ecuador, Quito, por su capacidad de adaptación al clima cambiante de Quito, sus múltiples usos y su belleza (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2014).

1.4. *Pleurothallis pulchella*

Pleurothallis pulchella es una especie cuya clasificación no es clara, porque su pequeño tamaño dificulta su caracterización morfológica y aún no existen estudios moleculares filogenéticos de este género. Es por eso que también es descrita bajo los siguientes nombres científicos según su morfología: *Stelis pulchella*, *Pleurothallis bogotensis*, *Pleurothallis sphenochila*, *Pleurothallis naraiensis*, *Humboltia naraniensis*, *Kuntze*, *Humboltia pulchella*, *Humboltia sphenochila*, *Pleurothallis ecuadorensis*, *Pleurothallis pteroglossa* y *Pleurothallis lloensis* (Dodson, 1988; Luer, 1998). Es una especie nativa de los Andes y crece entre los 2000-3500 msnm. Se encuentra distribuida principalmente en las provincias de Azuay, Carchi, Imbabura, Loja, Pichincha y Zamora. Esta especie se caracteriza por ser terrestre y tener tallos de hasta 20 cm de alto. Presenta una o varias inflorescencias, con flores de un tamaño de 4-6 mm de largo de color amarillo (Figura 1) (IUCN T. , 1996).

Su clasificación es la siguiente: reino: Plantae; filo: Tracheophyta; clase: Liliopsida; familia: Orchidaceae; género: *Pleurothallis* y especie: *pulchella*

1.5. Germinación y cultivo *in vitro* de orquídeas

Una alternativa para sobrellevar las limitaciones de germinación y crecimiento de orquídeas es el uso de las técnicas de cultivo *in vitro*. El cultivo *in vitro* puede ser usado para la conservación de germoplasma ya que permite la germinación de semillas bajo condiciones controladas, asépticas y con o sin hongos micorrízicos. Así también, el cultivo *in vitro* permite el estudio del desarrollo, la conservación y el mantenimiento de la variabilidad genética de orquídeas (Mayo *et al.*, 2010).

Existen dos formas de germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. La primera forma está relacionada con una germinación simbiótica, en la que las semillas son sembradas junto con hongos micorrízicos específicos para la especie en estudio. Cuando el hongo empieza a crecer, este llega a colonizar la semilla, establece una relación simbiótica, en la que el hongo brinda los nutrientes requeridos para la germinación y desarrollo. A pesar de que esta germinación puede resultar muy beneficiosa, es necesario un paso inicial de aislamiento de las micorrizas específicas para la especie que se desea cultivar (Rasmussen & Rasmussen, 2009).

La segunda forma de germinación *in vitro* es el cultivo asimbiótico. El cultivo asimbiótico de orquídeas inició en 1922, cuando Lewis Knudson encontró una formulación adecuada de nutrientes en un medio de cultivo, que permitió la germinación de semillas sin la necesidad de micorrizas (Knudson, 1946). Es decir el medio de cultivo suple la acción del hongo micorrízico brindando los nutrientes necesarios para la germinación y el

desarrollo. Es importante considerar que cada especie de orquídea presenta requerimiento distintos para germinar y desarrollarse (McKendrick, 2000).

1.5.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden contener una combinación de nutrientes, reguladores de crecimiento y otros componentes, que proporciona las condiciones necesarias para el desarrollo vegetal en condiciones *in vitro*. Los componentes que incluyen los medios de cultivo son: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, elementos gelidificantes y componentes inertes. Las sales inorgánicas incluyen al nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio y hierro (Radice, 2010). En el grupo de componentes orgánicos se incluyen vitaminas, hormonas, azúcares y aminoácidos. Los componentes gelidificantes, son componentes inactivos que generan una matriz que brinda soporte para los tejidos que serán cultivados *in vitro*. Por último, se pueden agregar otros componentes inertes como lo son el carbón activado, que tiene la función de adsorber compuestos no deseados (Abdelnour & Escalant, 1994).

1.5.2. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento o fitohormonas son sustancias químicas que producen las plantas y tienen una función estimulante, inhibitoria o regulatoria en la comunicación intracelular en las plantas (Abdelnour & Escalant, 1994). Estos reguladores de crecimiento pueden ser agregados al medio de cultivo, con la finalidad de inducir un proceso fisiológico específico en la planta. En el caso de las giberelinas, las cuales son producidas en su mayoría de forma natural, producen un estímulo en la división celular, germinación y formación de yemas; sin embargo, si sus concentraciones son altas puede

traer efecto de supresión de morfogénesis en las plantas (Smith, 2006; Taiz & Zeiger, 1998).

1.6. Aclimatación

Las plantas que crecen bajo condiciones controladas *in vitro*, presentan ciertas modificaciones en su fisiología. Las plántulas que se desarrollan en condiciones *in vitro* no tienen estomas totalmente funcionales, por lo que la pérdida de agua por transpiración no puede ser controlada. Así como su capacidad fotosintéticas es reducida, puesto que durante su crecimiento *in vitro* la planta toma energía directamente del medio de cultivo, es decir se desarrollaron de forma heterótrofa. Mientras que para pasar a condiciones *ex vitro* deben ser autotróficas, es decir deben ser capaces de sintetizar sustancias esenciales para el desarrollo mediante fotosíntesis (Pierik, 1997). Además, las plantas *in vitro* carecen de una cutícula cubierta por cera que controla la pérdida de humedad. Por estas razones, la transferencia de un planta obtenida *in vitro* a condiciones *ex vitro* puede provocar estrés y e incluso llevar a su muerte. Por lo que es necesario aplicar un técnica eficiente aclimatación y un sustrato adecuado para permitir la supervivencia y el desarrollo correcto de los estomas, la cutícula y su capacidad fotosintética (Seeman, 1993).

Ya que los estomas de plántulas obtenidas de un proceso de desarrollo *in vitro* presentan limitantes, las plántulas pasadas a condiciones *ex vitro* deben pasar por un progresivo cambio de humedad relativa, que puede ser controlado con una cubierta de plástico.

1.6.1. Sustratos

Para escoger el sustrato ideal se debe considerar el hábito de la planta y las características físicas del sustrato de: porosidad total, capacidad de retención de agua y

densidad aparente. La porosidad representa el total de la porción no sólida del volumen del sustrato. La capacidad de retención de agua es el volumen de agua que se retiene después del riego y del drenaje. Mientras que la densidad aparente es el peso seco del sustrato en relación al volumen total que ocupa (Cruz *et al.*, 2013). Dependiendo del hábito de la especie se debe escoger el sustrato a usarse para la fase de aclimatación. Se ha reportado que en el caso de especies epífitas, se necesita sustratos con alta porosidad y alta capacidad de retención de agua. En el caso de las especies terrestres, se conoce que necesitan sustratos con mayor densidad (Pire & Pereira, 2003).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Introducir semillas de *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella* a condiciones *in vitro* con la finalidad de inducir una germinación asimbiótica y describir el desarrollo *in vitro* de estas especies.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar los efectos del medio de cultivo, y la presencia de GA₃ y carbón activado sobre el desarrollo inicial de *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella*, evaluado a través de las distintas etapas de germinación de ambas especies.
- Investigar los efectos del medio de cultivo, y la presencia de GA₃ y carbón activado sobre la etapa de elongación de *Epidendrum jamiesonis*.
- Determinar diferencias en la viabilidad y tasa de desarrollo de *Epidendrum jamiesonis* al usar semillas frescas y semillas secas en los distintos medios de cultivos.

- Identificar el mejor sustrato y tiempo adecuado para para la aclimatación de plántulas en condiciones de invernadero.

3. Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Colegio de Ciencias Biológicas y ambientales (COCIBA) en la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Las cápsulas de orquídeas estudiadas fueron recolectadas en el Bosque Nublado del Pululahua, bajo la autorización de investigación científica N° 013-2018-IC-FLO-DNB/MA otorgada por el Ministerio del Ambiente del Ecuador.

4. Justificación

El Ecuador, considerado como un *hotspot* para la diversidad de orquídeas, acoge a algunas especies catalogadas como vulnerables, en peligro o en peligro crítico de extinción según CITES (CITES, 2017). En la actualidad existen un alto número de amenazas para estas especies vegetales, de las cuales la mayoría se asocian a actividades antropogénicas como la destrucción de hábitats, el manejo inadecuado de recursos, la contaminación ambiental y la sobre-recolección de individuos (Luan *et al.*, 2006). Estas amenazas externas son exacerbadas por limitaciones fisiológicas de las orquídeas que limitan sus tasas de germinación (Hadley, 1997). Una alternativa para obtener una germinación eficiente que permite sobrellevar estas limitaciones y facilita la conservación *ex situ* de estas especies es la germinación *in vitro*. Puesto que muchas de las especies de orquídeas nativas de Ecuador, han sido poco estudiadas, es importante conocer y establecer protocolos eficientes de germinación de orquídeas *in vitro* de especies nativas y endémicas, tanto epífitas como terrestres o litófitas. La germinación *in vitro* permite producir de forma masiva plantas

libres de patógenos, en espacios pequeños y en menor tiempo, lo cual resulta en una alternativa para la conservación o incluso el establecimiento de bancos de germoplasma. Por otra parte, el establecimiento de protocolos de germinación *in vitro* de semillas provee también una plataforma para el estudio de procesos fisiológicos del desarrollo de especies vegetales de orquídeas, lo cual permite entender a profundidad procesos específicos de interés, para poder aplicarlos en la producción, estudio u obtención de compuestos de interés.

Esta investigación tiene como finalidad establecer protocolos de germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas de dos especies: *Epidendrum jamiesonis* (una especie de orquídea epífita nativa) y *Pleurothallis pulchella* (una especie de orquídea terrestre). Los resultados aquí reportados describen algunos de los requerimientos de las semillas de las orquídeas en estudio y las etapas de desarrollo a partir de semillas, pasando por protocormos hasta plántulas. Este estudio servirá de referencia para la propagación *in vitro* de otras especies de orquídeas de importancia para el país. Finalmente, se espera que la información que se obtenga de esta investigación sea divulgada en congresos y revistas científicas.

5. Materiales

5.1. Material vegetal fresco

- Cápsulas frescas de *Epidendrum jamiesonis*
- Cápsulas frescas de *Pleurothallis pulchella*
- Semillas previamente secadas en sílica gel de *Epidendrum jamiesonis*

5.2. Material vegetal seco

- Cápsulas frescas de *Epidendrum jamiesonis*
- Sílica gel LOBA Chemie

- Sobres de papel filtro
- Frascos herméticos de vidrio
- Tubos Falcon™ estériles

5.3. Material para desinfección

- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)
- Alcohol etílico al 70%
- Hipoclorito de sodio al 2.5%
- Hipoclorito de sodio al 0.39%
- Detergente Tween^R -20 Sigma - Aldrich
- Vasos de precipitación de 500 ml
- Cajas Petri de vidrio autoclavadas
- Agua destilada estéril
- Cernidor

5.4. Material para siembra

- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)
- Cajas de Petri de vidrio
- Pinzas
- Bisturí
- Cucharilla de laboratorio
- Medios de cultivo
 - ½ MS (Murashige y Skoog Modificado, concentración media) (Murashige & Skoog, F., 1962) sin hormonas y sin carbón activado
 - ½ MS con carbón activado (2000 mg L⁻¹)
 - ½ MS con hormona: ácido giberélico (GA₃) (0.2 mg L⁻¹)
 - ½ MS con hormona GA₃ (0.02 mg L⁻¹) y carbón activado (2000 mg L⁻¹)
 - KC (Knudson C) (Knudson, 1946) sin hormonas y sin carbón activado
 - KC con carbón activado (2000 mg L⁻¹)
 - KC con hormona GA₃ (0.2 mg L⁻¹)
 - KC con hormona GA₃ (0.2 mg L⁻¹) y carbón activado (2000 mg L⁻¹)

5.5. Toma de datos

- Estereomicroscopio

5.6. Subcultivo

- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)
- Plántulas de orquídeas germinadas *in vitro*
- Pinzas
- Medios de cultivo
 - ½ MS (Murashige y Skoog Modificado, concentración media) (Murashige & Skoog, F., 1962) sin hormonas y sin carbón activado
 - ½ MS con carbón activado (2000 mg L⁻¹)
 - ½ MS con hormona: ácido giberélico (GA₃) (0.2 mg L⁻¹)
 - ½ MS con hormona GA₃ (0.02 mg L⁻¹) y carbón activado (2000 mg L⁻¹)
 - KC (Knudson C) (Knudson, 1946) sin hormonas y sin carbón activado
 - KC con carbón activado (2000 mg L⁻¹)
 - KC con hormona: GA₃ (0.2 mg L⁻¹)
 - KC con hormona GA₃ (0.2 mg L⁻¹) y carbón activado (2000 mg L⁻¹)
- Cajas Petri estéril

5.7. Material para aclimatación

- Sustratos autoclavados
 - Musgo *Spaghnum* + piedra pómez (Sustrato comercial, Ecuagenera)
 - Cáscara de arroz + cuesco de palma africana
 - Aserrín + piedra pómez
- Vasos de plástico con orificios en la base

5.8. Programas para análisis de datos

- ImageJ (ImageJ, 2018)
- Minitab 17 Statistical Software (Minitab 17 Statistical Software, 2017)

6. Metodología

6.1. Recolección de material inicial y almacenamiento de material vegetal

En primer lugar, se identificó morfológicamente a las dos especies en estudio. Por un lado, para identificar a la especie *Epidendrum jamiesonis* se observó el tipo de inflorescencia, sus flores moradas y su hábito epífitico (Figura 1). Después identificar esta especie se recolectaron 2 cápsulas frescas y maduras (color verde oscuro y morado) de una misma planta en el mes de septiembre del 2017. Por otro lado, se identificó plantas de *Pleurothallis pulchella* con ayuda de expertos en orquídeas de la reserva geobotánica del Pululahua, en base a las características de la planta terrestre, con pequeño tamaño, una inflorescencia en forma de espiga y flores pequeñas de color amarillo. Se recolectaron alrededor de 50 cápsulas de esta especie en junio del 2018. La recolección fue realizada bajo la autorización de investigación científica N° 013-2018-IC-FLO-DNB/MA. Las cápsulas fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.

Para el ensayo con semillas frescas las cápsulas fueron guardadas a temperatura ambiente hasta su uso. Mientras que para el ensayo de semillas secas de la especie *Epidendrum jamiesonis*, una cápsulas de orquídea de *E. jamiesonis* colectadas fue cortada de forma longitudinal, las semillas se pasaron a sobres de papel filtro. Los sobres fueron secados durante 20 días en frascos herméticos con sílica en gel. Después de este tiempo, los sobres con semillas se guardaron en tubos Falcon™ estériles, guardados a su vez en envases de vidrio con sílica en gel durante dos meses hasta su uso.

6.2. Siembra de semillas de orquídeas a partir de cápsulas frescas

6.1.2. Desinfección

Las cápsulas selladas de las dos especies de estudio fueron desinfectadas superficialmente en una cámara de flujo laminar con una solución de etanol al 70 % por 5 minutos, seguido por un enjuague con agua destilada estéril. A continuación, se sumergió las cápsulas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% con 4 gotas de detergente Tween20 por 15 minutos. Por último se realizó 4 enjuagues con agua destilada estéril.

6.1.3. Introducción del material a condiciones *in vitro*

Las cápsulas desinfectadas fueron cortadas longitudinalmente en condiciones estériles con la ayuda de un bisturí. Las semillas fueron transferidas a ocho tratamientos que combinan dos medios de cultivo basales ($\frac{1}{2}$ MS y KC), solos o suplementados con carbón activado (2000 mg L^{-1}) y/o ácido giberélico (0.2 mg L^{-1}) (Tabla 1). En el caso de la *Epidendrum jamiesonis* se empleó únicamente una cápsula para realizar la siembra, con la finalidad de evitar sesgos. Para distribuir las semillas de forma equitativa en cada uno de los tratamientos de esta cápsula, se tomó una medida de semillas (en este estudio una medida corresponde al número de semillas que se pueden tomar con una cucharilla de laboratorio como medida referencial). Se estima que esta medida corresponde a alrededor de 200-250 semillas en cada caja Petri (esta estimación se realizó en base al número de semillas promedio que se observaron por campo de observación bajo el microscopio y el aproximado de campos que incluye cada caja Petri). Se realizó una siembra total de 5 cajas Petri por cada tratamiento. Mientras que en el caso de *Pleurothallis pulchella*, se sembró todas las semillas de una cápsula sobre cada una de las cajas Petri de cada tratamiento, con

la finalidad de randomizar el ensayo. Es decir que se utilizaron 40 cápsulas de *P. pulchella* para este ensayo.

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 20 g L^{-1} de sacarosa, y su pH fue ajustado acorde a su formulación ($\text{pH}_{\frac{1}{2}\text{MS}} = 5.8$; $\text{pH}_{\text{KC}} = 5.1$).

Las semillas sembradas en cajas Petri se mantuvieron en condiciones de cuarto de cultivo, a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad. Se realizó un seguimiento continuo de las semillas y se tomó datos cualitativos de las distintas fases de desarrollo de germinación (Tabla 2) (Seaton & Ramsay, 2009). Después del primer mes *in vitro* se realizó la toma de datos cualitativos y cuantitativos del desarrollo de las semillas bajo un estereomicroscopio. La tasa de germinación fue estimada a través de un conteo total de semillas germinadas en cinco campos al azar dentro de cada caja Petri y un conteo según la fase de desarrollo de las semillas. Se consideraron cinco fases de desarrollo para este fin, estas fases fueron adaptadas de *Cultivo de orquídeas por semillas*, de Seaton y Ramsay (2009) (Tabla 2).

6.2. Siembra de semillas secas de orquídeas

Este ensayo fue realizado unicamente con la especie *Epidendrum jamiesonis*.

6.2.1. Desinfección

Dentro de la cámara de flujo laminar, los sobres de papel filtro que contenían las semillas secas fueron desinfectados mediante inmersión en una solución de etanol al 70% por 30 segundos, seguido por una solución de hipoclorito de sodio al 0.36% con detergente Tween20 por 5 minutos. Los sobres fueron finalmente enjuagados cuatro veces con agua destilada estéril.

6.2.2. Introducción del material a condiciones *in vitro*

Los sobres desinfectados fueron cortados con un bisturí estéril. Las semillas fueron transferidas a cajas Petri con los ocho tratamientos que combinan dos medios de cultivo basales ($\frac{1}{2}$ MS y KC), solos o suplementados con carbón activado (2000 mg L^{-1}) y/o ácido giberélico (0.2 mg L^{-1}) (Tabla 1).

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 20 g L^{-1} de sacarosa, y su pH fue ajustado acorde a su formulación ($\text{pH}_{\frac{1}{2}\text{MS}} = 5.8$; $\text{pH}_{\text{KC}} = 5.1$).

Las semillas sembradas en cajas Petri se mantuvieron en condiciones de cuarto de cultivo, a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad. Se realizó un seguimiento continuo de las semillas y se tomó datos cualitativos de las distintas fases de desarrollo de germinación (Tabla 2) (Seaton & Ramsay, 2009) . Después del primer mes *in vitro* se realizó la toma de datos cualitativos y cuantitativos del desarrollo de las semillas bajo un estereomicroscopio. La tasa de germinación fue estimada a través de un conteo total de semillas germinadas en cinco campos al azar dentro de cada caja Petri y un conteo según la fase de desarrollo de las semillas. Se consideraron cinco fases de desarrollo para este fin (Tabla 2).

6.3. Ensayos de elongación y aclimatación de plántulas obtenidas de semillas frescas y secas

6.3.1. Subcultivos

Se realizaron subcultivos cada 3 meses con el objetivo de renovar el medio de cultivo de cada plántula. El subcultivo se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, en donde se transfirieron los protocormos y las plántulas obtenidas de la germinación de las

semillas a nuevos medios de cultivo en frascos de vidrio de 6 cm de diámetro y 9 cm de alto. Las plántulas subcultivadas fueron mantenidas en cuarto de cultivo bajo las condiciones previamente mencionadas ($23 \pm 1^\circ\text{C}$ y con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad).

Se obtuvo la tasa de elongación de las plántulas mediante el registro del crecimiento de las plántulas con fotos de los frascos de cultivo. Para obtener las medidas de elongación, se utilizó el software ImageJ que permitió realizar mediciones exactas de la longitud de las plántulas cada 15 días de cultivo durante 17 semanas. Se tomó datos de la distancia entre la base de la hoja más larga de cada plántula (alrededor del tallo) hasta la punta de la misma fue registrada.

6.3.2. Aclimatación

Una vez que las plántulas enraizaron, fueron extraídas del medio de cultivo y sus raíces fueron lavadas con agua potable para asegurar la eliminación de residuos del medio de cultivo. Las plántulas fueron transferidas a sustratos previamente autoclavados y colocados en vasos plásticos con huecos en la base. Los sustratos evaluados para esta etapa fueron:

- I. Musgo *Spaghnum* y piedra pómez
- II. Cáscara de arroz y cuesco de palma africana
- III. Aserrín y piedra pómez

Todos los vasos con plántulas sembradas fueron ordenados dentro de macetas más grandes (22 vasos en cada maceta), los cuales fueron cubiertos con film plástico transparente y sellados, con la finalidad de conservar la humedad. Se realizó orificios en el

plástico de recubrimiento cada siete días por un periodo de 21 días, después de este tiempo se retiró por completo el plástico. Las plantas y sus sustratos fueron regados cada tres días con agua potable usando un atomizador para cubrir en forma de lluvia todas las plántulas. Durante seis meses se tomó datos semanalmente tanto de supervivencia como de crecimiento de las plántulas en cada uno de los sustratos.

6.4. Análisis de datos

Los datos se recopilaron en tablas en MS Excel y se analizaron usando el software Minitab 17 (Minitab 17 Statistical Software, 2010).

Las variables de respuesta relacionadas con la germinación hasta la formación de plántulas que se analizaron fueron: la tasa de germinación a las 4 semanas de cultivo y la proporción de semillas que avanzaron hasta la fase de desarrollo 5 después de 12 semanas de cultivo. Estas variables de respuesta fueron analizadas para las semillas frescas y secas de *E. jamiesonis* y para las semillas frescas de *P. pulchella*. La siguiente variable de respuesta analizada fue la elongación de las plántulas de *E. jamiesonis*, específicamente del crecimiento de sus hojas (diferencia de tamaño de la primera y última medición).

El diseño experimental escogido fue un diseño factorial completo, al cual se le aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con la finalidad de evaluar 3 factores y sus respectivos niveles (tipo de medio de cultivo ($\frac{1}{2}$ MS o KC), presencia o ausencia de GA_3 y presencia o ausencia de carbón activado) así como la interacción de estos factores, con un 95% de confianza. A partir del ANOVA se obtuvo un modelo lineal, del cual se recuperó los coeficientes de cada factor, que permiten determinar la magnitud del efecto sobre cada una de las variables de respuesta. A partir de los coeficientes obtenidos, se realizaron gráficas que describen en proporción cual es la magnitud en la que un factor influye sobre

el promedio de una variable de respuesta. Además, se usó la prueba de comparación múltiple de Tukey para encontrar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos probados.

Para comparar los porcentajes de germinación, el desarrollo hasta fase 5 y el crecimiento de las plántulas obtenidas desde semillas frescas y semillas secas, se realizó una prueba pareada, considerando el origen de la semilla como un factor adicional de análisis.

Para la fase de aclimatación se realizó un ANOVA para identificar diferencias entre los tres sustratos probados para la tasa de supervivencia y para el crecimiento de las plántulas.

7. Resultados

7.1. Germinación

Se analizó el efecto de los factores medio de cultivo ($\frac{1}{2}$ MS o KC), presencia o ausencia de carbón activado (2000 mg L^{-1}) y presencia o ausencia de ácido giberélico (0.2 mg L^{-1}) sobre la tasa de germinación y el avance en el desarrollo hasta la formación de plántulas (fase 5). Las variables medidas fueron el porcentaje de germinación y el porcentaje de semillas que se desarrollaron hasta la quinta fase; ambas variables se evaluaron a las 4, 8 y 12 semanas desde el inicio del ensayo.

7.1.1. Germinación de *Epidendrum jamiesonis* a partir de semillas frescas

El primer caso de germinación se observó a los 9 días en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS con 0.2 mg L^{-1} GA₃. Después de 4 semanas de cultivo *in vitro* los porcentajes de germinación más altos corresponden a las semillas sembradas en los tratamientos: $\frac{1}{2}$ MS

con carbón activado (72.98 % de semillas germinadas), $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado y GA_3 (71.86 %), KC (70.97 %) y KC con carbón activado (72.94 %) y KC con carbón activado y GA_3 (73.29%); sin embargo, según la prueba de comparación múltiple entre tratamientos, Tukey, no existen diferencias significativas entre estos porcentajes de germinación ($p > 0.05$) (Tabla 3). Mientras que los tratamientos: $\frac{1}{2}$ MS (40.34%), $\frac{1}{2}$ MS con GA_3 (56.66%) y KC con GA_3 (61.66%) fueron menos eficientes para la etapa de germinación, mostrando diferencias significativas en relación con los tratamientos descritos inicialmente ($p < 0.05$) (Tabla 3).

Con un ANOVA del diseño factorial se determinó que el factor carbón activado es el que más contribuye a la germinación (con 31.1% de contribución) ($p < 0.05$). De igual forma el factor medio de cultivo contribuye de forma significativa a la germinación (con un 18%) ($p < 0.05$). Mientras que el aporte de factor GA_3 no es significativo ($p > 0.05$). Por otro lado, la interacción de tercer orden: medio de cultivo*carbón activado* GA_3 es significativa ($p < 0.05$). Así como las interacciones dobles, donde la presencia o ausencia de carbón activado con el medio de cultivo y el GA_3 en conjunto con el medio de cultivo aportan de forma significativa a la germinación ($p < 0.05$) (Figura 3.A).

En cada tratamiento evaluado se logró identificar individuos en distintas fases de desarrollo a las 4, 8 y 12 semanas de edad (Figura 4). Los resultados indican que el tratamiento de $\frac{1}{2}$ MS con 0.2 mg L^{-1} de GA_3 generó una mayor proporción de semillas que avanzaron hasta la fase de desarrollo 5, con un 39.76% del total de semillas germinadas que alcanzaron esta fase después de 12 semanas *in vitro* (Figura 5.A). A partir de un ANOVA se determinó que el medio de cultivo es el factor que contribuye en mayor proporción al avance en el desarrollo hasta fase (con un 35% de contribución) ($p < 0.05$), de

igual forma el carbón activado contribuye de forma significativa (21%), así como el GA₃ (con 14%) ($p < 0.05$). Por otro lado, la interacción de segundo orden entre el medio de cultivo y la presencia de GA₃ ($p < 0.05$), y la presencia carbón activado con la presencia de GA₃ ($p < 0.05$) tienen un efecto significativo sobre el desarrollo hasta fase 5 (Figura 5.A).

7. 1. 2. Germinación de *Epidendrum jamiesonis* a partir de semillas secas

El primer caso de germinación se observó a los 15 días en el medio de cultivo ½ MS con 0.2 mg L⁻¹ GA₃. Después de 4 semanas de cultivo *in vitro* los porcentajes de germinación más altos corresponden a las semillas sembradas en los tratamientos: ½ MS (63.05 %), ½ MS con carbón activado (66.31 %), ½ MS con GA₃ (73.98 %), ½ MS con 0.2 mg L⁻¹ GA₃ y con carbón activado (72.60 %) y KC con GA₃ (60.37 %); siendo que sus porcentajes de germinación no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p > 0.05$) (Tabla 3).

Mediante la prueba de ANOVA se logró determinar que el medio de cultivo es el factor que contribuye en mayor magnitud al porcentaje de germinación (con un 42% de contribución) ($p < 0.05$). De igual forma el factor individual GA₃ contribuye de forma significativa ($p < 0.05$), (con un 13%). Así mismo, se determinó que la interacción de segundo orden entre el medio de cultivo y la presencia o ausencia de GA₃, como la presencia o ausencia de carbón activado y GA₃ tienen un efecto significativo sobre la tasa de germinación ($p < 0.05$) (Figura 3.B).

En cada tratamiento probado se logró identificar individuos en distintas fases de desarrollo a las 4, 8 y 12 semanas de edad (Figura 4.B). Los resultados indican el tratamiento de ½ MS con GA₃ 0.2 mg L⁻¹ genera una mayor proporción de semillas que avanzaron hasta la fase de desarrollo 5, con un 33.72% del total de semillas que alcanzaron

esta fase después de 12 semanas *in vitro*. A partir de un ANOVA se determinó que el medio de cultivo contribuye en mayor medida al avance de desarrollo hasta fase 5 (con un 47% de contribución) ($p < 0.05$). Así como también los factores individuales de GA₃ y carbón activado contribuyen de forma significativa ($p < 0.05$) (con un 11% y 10% de contribución respectivamente). Por otra parte, existen dos interacciones dobles que aportan con una magnitud significativa al avance hasta fase 5 de desarrollo. Estas interacciones corresponde a los factores medio de cultivo y presencia de GA₃, y medio de cultivo presencia de carbón activado ($p < 0.05$) (Figura 5.B).

7. 1. 3. Comparación de germinación entre semillas frescas y secas

Mediante una prueba pareada, se evaluó las diferencias tanto en germinación como en desarrollo hasta fase 5, considerando el origen de las semillas (frescas y secas). Las semillas obtenidas de cápsulas frescas presentaron porcentaje total de germinación del 65.3% y las semillas secas presentaron un porcentaje total de 62.5% de germinación después de 4 semanas *in vitro*; no existen diferencias significativas en las tasas de germinación de semillas sembradas al estar frescas y semillas secadas previamente ($p > 0.05$) (Tabla 4). En el caso de la comparación en el avance en el desarrollo hasta fase 5 de semillas frescas y secas, tampoco se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$), con el 14.62% del total de semillas frescas germinadas y el 14.55% del total de semillas secas germinadas que llegaron a fase 5 en 12 semanas (Tabla 4).

7. 1. 4. Germinación de *Pleurothallis pulchella* a partir de semillas frescas

El primer caso de germinación se distinguió a los 21 días en el medio ½ MS con carbón activado. Los porcentajes más altos de germinación después de 4 semanas se evidenciaron en el tratamiento ½ MS con carbón activado (33.15% de semillas que

germinaron) (Tabla 5). Analizando los factores de forma individual, se determinó que los tres factores estudiados tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de germinación en esta especie ($p < 0.05$). El mayor aporte para la variable de respuesta germinación es el medio de cultivo (con 40% de contribución). Así como también los factores individuales carbón activado y GA_3 tienen un aporte significativo ($p < 0.05$) (con un 23% y 12% de contribución respectivamente). Por otro lado, la interacción de segundo orden entre el medio de cultivo y la presencia de GA_3 es significativa ($p < 0.05$) (Figura 3. C).

En cada tratamiento evaluado se logró identificar individuos en distintas fases de desarrollo a las 4, 8 y 12 semanas de edad (Figura 4.C). Los resultados indican que los tratamientos $\frac{1}{2}$ MS y el $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado generan una mayor proporción de semillas que avanzaron hasta la fase de desarrollo 5, con un 54.43% y 62.99% de desarrollo respectivamente después de 12 semanas *in vitro*. En cuanto al ANOVA del diseño factorial se puede observar el factor individual medio de cultivo brinda el aporte mayoritario al desarrollo hasta fase 5 (con un 47% de aporte) ($p < 0.05$). De igual forma, los factores individuales carbón activado y GA_3 presentan un aporte significativo a esta parte del desarrollo ($p < 0.05$) (con un 12% y 11% de contribución respectivamente). Además, existen dos interacciones significativas de segundo orden que aportan al avance hasta la fase de desarrollo 5, estas corresponden al medio de cultivo y la presencia o ausencia de GA_3 ; y el medio de cultivo en presencia o ausencia de carbón activado ($p < 0.05$) (Figura 5.C).

7. 1. 5. Comparación de la germinación de *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella* a partir de semillas obtenidas de cápsulas frescas

Se analizó si existen diferencias significativas en germinación y el desarrollo hasta fase 5 (independiente del tratamiento) de ambas especies, por medio de una prueba pareada.

Agrupando todos los tratamientos, se obtuvo que *E. jamiesonis* presenta un porcentaje de germinación total de 65.31% a los 4 semanas de su introducción *in vitro*; por otro lado, *P. pulchella* presenta únicamente un 16.41% de germinación en este periodo de tiempo, lo cual corresponde a una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 6).

Al contrario, en el caso de desarrollo hasta fase 5 se logra identificar un porcentaje más alto de desarrollo hasta fase 5 en *P. pulchella* con un 31.70% de semillas germinadas que alcanzan fase 5 dentro de las primeras 12 semanas *in vitro*, mientras que en el caso de *E. jamiesonis* únicamente un 14.62% de semillas germinadas alcanzan esta fase de desarrollo, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 6).

7. 2. Elongación

Para analizar la elongación de las plántulas, se realizó un ANOVA de los datos de crecimiento de la hoja, considerando como crecimiento total la diferencia en el largo de las hojas en la última y la primera medición.

7. 2. 1. Elongación de plántulas

La mayor tasa de elongación corresponde a las plántulas que crecieron en el tratamiento $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado, que muestran en promedio un crecimiento de 1.54 cm durante 17 semanas de un periodo de elongación. Este tratamiento presenta diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos ($p < 0.05$) (Tabla 7;

Figura 6). Mediante el ANOVA del diseño factorial se logró determinar que el factor individual de medio de cultivo aporta en mayor magnitud (con un 27.5% de contribución) a la elongación. Así como también el carbón activado presenta un aporte significativo a la elongación (con un 21% de contribución) ($p < 0.05$). De igual forma, la interacción doble

entre el medio de cultivo y presencia o ausencia de GA₃, como la interacción entre el carbón activado y el GA₃ es significativa ($p < 0.05$) (

Figura 7).

7. 3. Aclimatación

7. 3. 1. Supervivencia y crecimiento de plántulas aclimatadas, que pasaron por dos periodos distintos de elongación (32 y 55 semanas en periodo de elongación)

Para determinar la eficiencia del proceso de aclimatación se evaluó la supervivencia de las plántulas y el crecimiento de las mismas. Por medio de un ANOVA, se logró identificar que el sustrato influye significativamente a estas dos variables de respuesta (en ambos casos $p < 0.05$) (Tabla 8). El sustrato ideal para la aclimatación de *E. jamiesonis* es el sustrato comercial de musgo *Sphagnum* con piedra pómez. El 90.48% de plántulas que tuvieron un periodo de crecimiento de 32 semanas *in vitro* sobrevivieron en este sustrato comercial. Mientras que el 100% de las plántulas que tuvieron un periodo de crecimiento mayor *in vitro* (de 55 semanas) sobrevivieron (Tabla 8;

Figura 9). Al analizar el crecimiento de las plántulas durante 12 semanas de aclimatación en musgo y piedra pómez se logra identificar que este es el que permitió un mayor crecimiento en relación a los demás sustratos. Siendo que plántulas que pasaron 32 semanas *in vitro* previo a la aclimatación crecieron 0.56 cm; mientras que plántulas que pasaron 55 semanas *in vitro* crecieron 0.66 cm (Tabla 8;

Figura 9).

Al comparar por medio de una prueba pareada la supervivencia entre las plántulas, que pasaron por dos periodos de elongación distintos (32 y 55 semanas) no se observan diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$). En cuanto a crecimiento, si se

encontraron diferencias significativas que muestran que las plántulas que pasaron mayor tiempo de elongación *in vitro* presentan tasas mayores de crecimiento al ser aclimatadas ($p < 0.05$) (Tabla 8).

8. Discusión

La germinación asimbiótica y el cultivo *in vitro* de orquídeas presentan ventajas, empezando por que brindan la posibilidad de favorecer una germinación en una mayor proporción en comparación a la tasa de germinación que se da en condiciones naturales (Luan *et al.*, 2006). Es por eso que el cultivo *in vitro* puede ser una aproximación ideal para una producción masiva con fines de conservación, teniendo un alto potencial para la propagación y mantenimiento de la variabilidad genética (Mayo *et al.*, 2010). El éxito de la obtención de altas tasas de germinación y un eficiente desarrollo depende de un medio de cultivo y condiciones abióticas adecuadas. Sin embargo, poder describir los requerimientos nutricionales para cada especie de orquídea resulta complicado, por la inmensa diversidad de orquídeas y sus requerimientos nutricionales específicos. Por lo que el estudio del cultivo *in vitro* de ciertas especies puede ser usados como guías de los requerimientos nutricional de otras especies (Hicks & Lynn, 2007).

8. 1. Componentes de medios de cultivo

Durante los ensayos probados para la germinación asimbiótica y elongación la primera variable evaluada fue el medio de cultivo: $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog (MS) y Knudson C (KC) (Tabla 9). El medio MS es ampliamente usado en el cultivo de tejidos vegetales puesto que la mayoría de plantas reaccionan de forma favorable en este medio de cultivo (Pierik, 1997). En el caso de las orquídeas este medio de cultivo se suele modificar,

reduciendo su concentración de sales a la mitad, puesto que en varios estudios se describe altos porcentajes de germinación y desarrollo en medios de cultivos con baja concentración de sales (Mayo *et al.*, 2010). Por otro lado, el medio de cultivo Knudson C fue desarrollado inicialmente para la germinación *in vitro* de orquídeas del género *Cymbidium*, aunque su uso se ha ampliado para otras especies (Knudson, 1946).

Los dos medios de cultivo evaluados se asemejan en la presencia de algunos macroelementos: magnesio (Mg), nitrato (N), potasio (K); y microelementos: hierro (Fe) y manganeso (Mn). A pesar de las semejanzas en la composición de estos medios de cultivo, estos presentan varias diferencias. El medio de cultivo ½ MS contiene una mayor variedad de sales en relación al medio KC, así como mayores concentraciones de las mismas (Tabla 9). Esto conlleva a que ½ MS tenga un contenido iónico más alto (alrededor de 47 mg L⁻¹) que el medio KC (alrededor de 23.35 mg L⁻¹) (Pierik, 1997).

El segundo factor evaluado es el carbón activado, un producto de la carbonización de la madera a altas temperaturas en presencia de vapor, que pasa por un proceso de purificación y separación de impurezas. Se caracteriza por ser un complejo de carbón con alta porosidad y amplia área superficial en su interior que incluso puede llegar a tener 1500 m² g⁻¹ (Rey & Llopiz, 2007), que le da la característica de adsorber con facilidad sustancias tanto sólidas como gaseosas (Fridborg & Erikson, 1975). En el área de cultivo *in vitro*, el carbón activado es usado por varias razones: adsorbe compuestos tóxicos o no deseados, tales como productos de la oxidación del metabolismo vegetal, produce un oscurecimiento del medio de cultivo, que tiene efectos sobre la formación y el crecimiento de raíces, aunque también se ha determinado que puede adsorber compuestos orgánicos que pueden ser beneficiosos para el desarrollo vegetal, como reguladores de crecimiento (Pan & van Staden, 1998). La concentración de carbón activado escogida fue de 2000 mg L⁻¹, ya

que se ha demostrado que el carbón activado en esta concentración favorece la germinación y el desarrollo de orquídeas (Chen *et al.*, 1999).

El tercer factor evaluado es el ácido giberélico, un regulador de crecimiento del grupo de las giberelinas. Su función corresponde a la regulación de la germinación, porque estimula la producción de enzimas hidrolasas, que son las encargadas de romper la testa y estimular la división y elongación celular, produciendo inducción de la elongación (Srivastava, 2002). En condiciones naturales se ha determinado que los niveles de giberelinas en las semillas de orquídeas se ven controlados por las micorrizas presentes en las mismas, puesto que durante la germinación y el desarrollo inicial de las semillas son producidas en concentraciones altas por estos hongos (Pedroza *et al.*, 2005). A causa de la germinación y crecimiento lento de las orquídeas, las fitohormonas pueden ser agregadas al medio de cultivo para acelerar la germinación y el desarrollo (Hew & Clifford, 1993). Según estudios, concentraciones de ácido giberélico en un rango de 0.1 – 0.4 mg L⁻¹ producen resultados positivos en la germinación y desarrollo *in vitro* de orquídeas; sin embargo se debe analizar cada especie de orquídea por separado para obtener resultados ideales (Fonnesbech, 1972).

8. 2. Germinación

El primer elemento a ser analizado, es el primer caso de germinación que se distinguió en cada una de las especies, y el origen de las semillas utilizadas. En el caso de las semillas frescas de *Epidendrum jamiesonis* la germinación más rápida se dio a los 9 días, mientras las semillas secas de esta especie se dio a los 15 días. Esta diferencia en el tiempo de germinación puede deberse a que las semillas secas al pasar por un periodo de secado, pierden humedad y oxígeno. Esta pérdida de humedad y oxígeno conduce a que las

semillas entren en un estado de dormancia, que se traduce en un retardo en la germinación (Taiz & Zeiger, 1998). La germinación más rápida tanto en semillas frescas como secas de *E. jamiesonis* se identificó en el tratamiento $\frac{1}{2}$ MS con GA₃. Esto apunta a explicar que el GA₃ promueve la germinación en varios pasos del inicio de la germinación: la activación del crecimiento del embrión (Taiz & Zeiger, 1998) y la producción de hidrolasas (sobretudo alfa-amylasa) que favorecen el rompimiento de la testa (Srivastava, 2002; Taiz & Zeiger, 1998). Resultados similares en orquídeas del género *Cymbidium* muestran que en presencia de GA₃ se reducen los tiempos de inicio de germinación (Fonnesbech, 1972). Por otro lado, el primer caso de germinación de *Pleurothallis pulchella* se observó a los 21 días en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado. Este tratamiento, que contiene carbón activado, en el cual se observó el primer caso de germinación concuerda con reportes de orquídeas terrestres de género *Paphiopedilum* y *Phaleanopsis*, en los que se ha demostrado que la adición de carbón activado favorece al inicio del desarrollo de especies terrestre. puesto que estas producen una mayor concentración de compuestos secundarios, tales como compuestos fenólicos y carboxílico, en las primeras etapas de desarrollo en relación especies epífitas (Nadarajan *et al.*, 2011).

El siguiente análisis realizado evalúa el porcentaje de germinación a las 4 semanas después de su siembra *in vitro*. Se obtuvo que para *Epidendrum jamiesonis*, tanto para semillas frescas como para semillas secas existen varios medios de cultivo que permiten tasas de germinación altas, de alrededor de 73% para semillas frescas y 74% para semillas secas (Tabla 3). Lo que sugiere que no existen requerimientos en sales específicos para la germinación. Siendo que los mayores porcentajes de germinación de semillas frescas se identificó en medios de cultivo de KC en cada una de las variantes probadas (es decir con o sin carbón activado y con o sin GA₃) además de medios de cultivo $\frac{1}{2}$ MS con carbón

activado. En el caso de las semillas secas se dio en tratamientos que tienen en común el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS en cada una de las variantes probadas (con o sin carbón activado y con o sin GA₃), y solo el caso de KC con GA₃. Estos resultados pueden ser comparados con reportes de otras especies de orquídeas, como *Phragmapediu longifolium*, *Guarianthe bowringiana*, que al germinar *in vitro* no presentan una tendencia de germinar en mayor proporción en un medio de cultivo específico (Nadarajan *et al.*, 2011).

Mientras que al analizar la tasa de germinación de la especie terrestre *Pleurothallis pulchella* se evidencia que esta especie si presenta mayor tasa de germinación en un medio de cultivo específico, correspondiente al medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado. Estos resultados sugieren que la germinación de esta especie se ve favorecida por la presencia de carbón activado. Considerando que el carbón activado adsorbe sustancias inhibitorias que son exudadas por los tejidos vegetales durante el crecimiento como el etileno y los compuestos fenólicos (Hicks & Lynn, 2007) y que las especies terrestres producen mayor cantidad de metabolitos secundarios (como fenoles) que las especies epífitas (Nadarajan *et al.*, 2011), puede explicar el porqué de que una especie terrestre en condiciones *in vitro* se beneficia de la adición del carbón activado.

Al comparar las tasas de germinación entre la especie epífita y la terrestre en estudio, destaca que la especie terrestre presenta bajas tasas de germinación en comparación a la especie epífita. Una posible razón de estos resultados, puede ser el estado de maduración de la cápsula, ya que un desarrollo insuficiente de las semillas dentro de la cápsula puede ser un factor determinante en su viabilidad al sembrarse. Por esa razón existe una necesidad de identificar el tiempo óptimo de desarrollo de cápsulas para usar las semillas maduras y tener resultados favorables (Vasudevan & Staden, 2010). Existen indicadores generales para el estado de maduración que están relacionado con el cambio de

coloración y el marchitamiento del relicto floral. Sin embargo, para cada una de las especies pueden existir diferencias en la morfología de las cápsulas maduras (Mayo *et al.*, 2010). En el caso de *P. pulchella* se conoce muy poco esta especie. Mientras que para este la selección de cápsulas de *E. jamiesonis*, expertos en orquídeas ayudaron en la selección de cápsulas con madurez suficiente. Otro aspecto que pudo haber influido sobre la tasa de germinación de las semillas de *P. pulchella*, pueden ser los requerimientos nutricionales de esta especie. Es decir que una posible razón, es que los medios de cultivo probados podrían no ser los ideales para el desarrollo para esta especie terrestre.

Al realizar el ANOVA del diseño factorial, se encontró que sobre el porcentaje de germinación de semillas frescas de *E. jamiesonis* los tres factores individuales estudiados tienen un efecto significativo, así como también la interacción de estos factores influye significativamente sobre la germinación. Sin embargo, se logra identificar que el carbón activado es el factor que influye en mayor magnitud sobre esta variable de respuesta. En el caso de las semillas secas de *E. jamiesonis* los factores de medio de cultivo y GA₃ son significativos, así como las interacciones de segundo orden entre el GA₃ con el medio de cultivo y el GA₃ con el carbón activado. Mientras que en el caso de *P. pulchella* se logra identificar que los tres factores de forma individual son significativos al igual que la interacción de medio de cultivo y GA₃. Siendo que de forma individual el medio de cultivo es el factor que aporta en mayor magnitud a la germinación (Figura 3).

El siguiente elemento analizado es el avance en el desarrollo hasta la fase de 5 en un periodo de tiempo de 3 meses. En el caso de las semillas frescas como semillas secas de *E. jamiesonis* se identificó que el tratamiento ideal que favorece este desarrollo es ½ MS con GA₃, tratamiento con el cual se obtuvo alrededor de 39.76% de semillas que germinaron

lograron avanzar hasta fase 5. Estos resultados sugieren que el GA₃ está estimulando la elongación y la división celular, así como puede actuar aumentando la mitosis en la región subapical del meristema, además que aumenta la extensibilidad mecánica y la relajación de las paredes celulares (Taiz & Zeiger, 1998). Mientras que para la especie *P. pulchella* los mejores resultado se visualizaron en los tratamientos: ½ MS y ½ MS con carbón activado, que permitieron el avance a fase 5 de alrededor de 62% del total de semillas que germinaron. Estos resultados apuntan a que el medio de cultivo ½ MS por su concentración y variabilidad de sales favorece esta etapa de desarrollo, sin embargo la presencia o ausencia de carbón activado no presentaría una diferencia. Mientras que la presencia de GA₃ puede estar limitando esta etapa de desarrollo. Esto puede sugerir una relación con una concentración de esta fitohormona endógena. Puesto que se ha descrito que un contenido alto de este regulador de crecimiento puede resultar en un inhibidor de la germinación (Pierik, 1997), como muestras estudios en especies de orquídeas terrestres (Vejsadova, 2006).

Mediante el ANOVA se identificó que en el desarrollo hasta fase 5 tanto las semillas frescas y secas de *E. jamiesonis*, como de *P. pulchella*, los tres factores individuales son significativos, al igual que existen interacciones de órdenes superiores. En todos estos casos estudiados el medio de cultivo aporta en mayor magnitud al desarrollo hasta fase 5. Se evidencia que uno de los dos medios de cultivo probados es mejor; por lo que se apunta a que el medio de cultivo ½ MS permite un mayor avance en desarrollo hasta la formación de plántulas. Este medio de cultivo al contener una mayor concentración y variedad de sales puede beneficiar en mayor medida al desarrollo, cumpliendo la función de suplir la acción del hongo micorrízico (Arditti & Ernst, 1984).

Al comparar los resultados de porcentaje de germinación de los ensayos de semillas frescas y secas (independiente del tratamiento) de *E. jamiesonis*, se determinó que ni la tasa de germinación ni el desarrollo hasta fase 5 se ve afectada por el tratamiento de secado de las semillas (Tabla 4). No obstante, se debe considerar que el tiempo de almacenamiento de las semillas fue de únicamente un mes. Sin embargo, estos resultados concuerdan con reportes de almacenamiento de semillas secas de orquídeas terrestres de Australia por periodos largos. En estos reporte se describe que semillas almacenadas por 12 meses y después sembradas *in vitro* muestran poca disminución en la germinación (Batty *et al.*, 2001). Resultados como estos sugieren que la viabilidad de las semillas no se ve afectada por el proceso de secado. Considerando que la estructura de las semillas de orquídeas tanto de especies terrestres y epífitas es igual (embrión recubierto por una testa alrededor) (Arditti & Ghani, 2000); se puede sugerir que los resultados de este estudio con la especie *E. jamiesonis* especie epífita, concuerdan con los descritos por Batty en su estudio. Se ha determinado que la viabilidad de algunas semillas de orquídeas se mantiene cuando el contenido de humedad, la temperatura y el contenido de oxígeno de la atmósfera de almacenamiento se ve reducida (Batty *et al.*, 2001).

8. 3. Elongación

Al analizar crecimiento de las plántulas obtenidas tanto de semillas frescas como semillas secas, por medio de un ANOVA, se identificó que los factores medio de cultivo y carbón activado son significativos individualmente, así como las interacciones dobles y triples estos factores. Se observó que para las plántulas de las especies en estudio, el tratamiento ideal para elongación es: $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado y ácido giberélico (creciendo 1.54 cm en 17 semanas). Estos resultados sugieren que la presencia de carbón

activado puede tener un efecto positivo al adsorber sustancias tóxicas o inhibitorias, como compuestos fenólicos y carboxílicos procedentes de los tejidos vegetales (Fridborg *et al.*, 1978). Estos últimos pueden producirse en mayor cantidad durante la elongación de los estructuras vegetales; además que el carbón activado crea un ambiente oscuro que favorece el enraizamiento (Bhadra & Hossain, 2003). Resultados similares se describen en estudios en la especie epífita *Cymbidium aloifolium*, en el cual se determina que la presencia de carbón activado favorece a la elongación de las plántulas, que está relacionada con un crecimiento radicular (Hossain *et al.*, 2009). Por otro lado, el GA₃ favorece la elongación de tallos, puesto que estimula la división celular, así como la extensibilidad y relajación de las paredes celulares vegetales que favorecen la elongación celular (Taiz & Zeiger, 1998).

Al analizar el aporte de cada uno de estos factores a la elongación, resalta que el medio de cultivo aporta en mayor magnitud a la elongación. Dado que el medio de cultivo en el que se evidenció mayor elongación fue ½ MS, se sugiere que la concentración de sales y la variabilidad de sales presentes en el medio de cultivo juegan un rol sobre elongación de las plántulas.

8. 4. Aclimatación

Los sustratos probados fueron escogidos por su capacidad de mantener humedad y permitir aeración constante de las raíces. Específicamente la cáscara de arroz tiene una porosidad del 68% y una capacidad de retención de humedad de 16% (Pire & Pereira, 2003). Por otro lado, el musgo *Sphagnum* presenta una capacidad de retención de agua de alrededor del 98% (Waddington, 2011). Mientras en el caso del aserrín, se conoce que este en conjunto con otros materiales como turba y arena presenta una capacidad de retención de humedad del 62%, y una porosidad de aire del 11% (Cabrera, 1999). Siendo que estos

sustratos permiten retener altos porcentajes de humedad, es necesario incluir materiales que brinden porosidad. Uno de estos materiales es la piedra pómez, que es un silicato de origen volcánico que aporta con porosidad al sustrato, puesto que su densidad es muy baja (0.4 g cm^{-3}) (Rodríguez, 2009). Por otro lado, el cuesco de palma africana presenta una densidad baja (1.375 g/cm^3) con una porosidad del 2% (Medina, 2018).

Puesto que las raíces de las orquídeas epífitas son sensibles a presiones de agua altas, es esencial que la aclimatación se realice en un sustrato con las características antes mencionadas (Pire & Pereira, 2003). Es esencial que para lograr resultados positivos de aclimatación se usen plántulas cuyo sistema radicular esté bien desarrollado (Figura 8.A), y que el proceso de aclimatación sea paulatino.

La aclimatación de plántulas provenientes de procesos previos de elongación *in vitro* de 32 y 55 semanas, mostraron tasas equivalentes de supervivencia, con los mejores resultados obtenidos con el sustrato comercial de musgo *Sphagnum* y piedra pómez. Como fue descrito anteriormente, este sustrato se caracteriza por la mayor capacidad de retención de agua y la mayor porosidad, en relación a los otros sustratos probados. En otros estudios, donde se ha probado varios tipos de sustratos para la aclimatación de la especie epífita *Dendrobium primulinum*, se han descrito resultados similares, en los que el musgo formó parte del sustrato que mostró altos porcentajes de supervivencia de las plantas aclimatadas (Pant & Thapa, 2012). Independientemente de la edad de las plántulas que pasaron a la etapa de aclimatación, se evidencia que en el sustrato de musgo y piedra pómez se dio un crecimiento exponencial (Figura 9); esto puede funcionar como un indicador de que tan bien funciona la etapa de aclimatación.

Por otro lado, al analizar las tasas de crecimiento de las plántulas que pasaron por periodos distintos de elongación *in vitro*, se observa que las plántulas que pasaron por un

periodo mayor de elongación presentan una mayor tasa de crecimiento al aclimatarse. Esto sugiere que las plántulas que se han desarrollado más *in vitro*, un proceso que también incluye un mayor desarrollo radicular y de brotes, tienen mayor capacidad para adaptarse a condiciones *ex vitro* y así mayor tasa de crecimiento en condiciones de aclimatación.

9. Conclusión

- En este estudio, la introducción, germinación y desarrollo *in vitro* en condiciones asimbióticas de las orquídeas *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella* fueron exitosos. Adicionalmente, la aclimatación de *Epidendrum jamiesonis* presentó resultados positivos.
- En el ensayo de germinación con semillas frescas y secas de *E. jamiesonis* se lograron tasas altas de germinación (alrededor de 73%) en varios medios de cultivo (para semillas frescas: $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado; $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado y GA₃; KC; KC con carbón activado; KC con GA₃; y KC con carbón activado y GA₃), (para semillas secas: $\frac{1}{2}$ MS; $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado; $\frac{1}{2}$ MS con GA₃; $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado y GA₃; KC con GA₃), en el primer mes desde la siembra.) en el primer mes desde la siembra.
- El tratamiento de $\frac{1}{2}$ MS con GA₃ permite mayor porcentaje de semillas germinadas que avanzaron hasta fase 5 tanto de semillas frescas como secas de *E. jamiesonis* después de 12 semanas.
- Los resultados del ensayo de germinación y desarrollo hasta fase 5 de las semillas secas de *E. jamiesonis* concuerdan con los resultados obtenidos para las semillas frescas de la misma especie.
- En el ensayo de germinación con semillas frescas de *P. pulchella*, el tratamiento de $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado permite las mayores tasas de germinación, mientras que para el

desarrollo de las plántulas, tanto el medio ½ MS con carbón activado como el medio ½ MS permite el mayor avance hasta fase 5.

- El tratamiento que permite mayor elongación de plántulas de *E. jamiesonis* es ½ MS con carbón activado.
- El medio de cultivo es el factor que más afecta al desarrollo hasta fase 5 y la elongación de *E. jamiesonis* y *P. pulchella* a partir de ambos tipos de semillas.
- El ensayo de aclimatación muestra que el sustrato ideal para *E. jamiesonis* es el sustrato comercial de musgo *Sphagnum* con piedra pómez, que permite alta tasa de supervivencia y mayor crecimiento.
- Los resultados de este estudio aportan al desarrollo de estrategias eficientes de propagación *in vitro* de especie nativas importantes de la diversidad ecuatoriana.

10. Recomendaciones

Para futuros ensayos de germinación y cultivo *in vitro* de orquídeas se recomienda analizar los resultados con relación al estado de maduración de las cápsulas. Siendo que el uso de semillas poco maduras (es decir semillas que aún se encuentran dentro de cápsulas cerradas) permitirá bajos porcentajes de germinación. Por lo que, es importante la identificación de un tiempo óptimo de desarrollo de las cápsulas, con la finalidad de tener un alto número de semillas que estén maduras, que puedan germinar y desarrollarse hasta plántulas (Vasudevan & Staden, 2010). Considerando que cada una de las especies presenta características morfológicas distintas en sus frutos es importante realizar un estudio previo para determinar el estado de maduración de los mismos.

También, para el estudio y comparación de respuestas de germinación de semillas

secas y elongación de las mismas se recomienda secar y almacenar las semillas por distintos periodos de tiempo para evaluar el cambio de su viabilidad según el tiempo de almacenamiento.

Simultáneamente, previo a los ensayos de introducción del material a condiciones *in vitro* se puede aplicar la prueba de tetrazolio, que permite identificar la viabilidad de las semillas, para tener un estimado de la proporción de semillas que se conoce que no podrán germinar.

Por último, cabe recalcar en este estudio únicamente se empleó una planta de estudio para la especie *Epidendrum jamiesonis*, por lo que para futuros estudios se podría ampliar el estudio utilizando cápsulas de distinto origen, es decir de distintas plantas, para lo cual se recomendaría aplicar un diseño factorial con bloqueo. Este tipo de análisis permitirá comprender el efecto de los factores sobre la variable de respuesta, minimizando el efecto de la variabilidad cuando al asociar con elementos discreto (es decir la planta de la que se obtuvo), según las plantas de origen que se recolectaron .

11. Bibliografía

- Abdelnour, A., & Escalant, J. (1994). Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. *Laboratorio de Tejidos de CATIE*, 1-29.
- Arditti, J., & Ernst, R. (1984). Physiology of germination orchid seeds. *Reviews and perspectives Cornell University Press*.
- Arditti, J., & Ghani, A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *The New Phytologist*, 367-421.
- Arditti, J., & Ghani, A. (2000). *Tansley review, 110- Numerical and physical properties of orchids seeds and their biological implications. New Phytologist 145: 367-421.*
- Arditti, J., & Karin, A. (2000). *Numerical and physical properties of orchids seeds and their biological implications. Review New Phytol. 145, 367-421.*
- Batty, A., Dixon, K., Brundrett, M., & Sivasithamparam, K. (2001). Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids. *An International Journal for the Publication of Original Research in Plant Science* , 49, 619-628.
- Batygina, T., & Bragina, E. &. (2003). The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45(2), 21-34.
- Benzing, D. (1981). Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? *Selbyana* 5: 241–242.
- Benzing, D., & Atwood, J. (1984). Orchidaceae: ancestral habitats and current status in forest canopies. *Systematic Botany* 9: 155 –165.

- Bhadra, S., & Hossain, M. (2003). In vitro germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an Endangered orchid species. *Plant Tissue Cult.*, 13(2), 165-171.
- Bijaya, P. (2013). Medicinal orchids and their uses: tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 448-467.
- Cabrera, R. (1999). Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5(1), 5-11.
- Cardelus, C., Colwell, R., & Watkins, J. (2006). Vascular epiphyte distribution patterns: explaining the mid-elevation richness peak. *Journal of Ecology* 94: 144-156.
- CITES, C. s. (2017). *Apéndice I, II y III*. Ginebra, Suiza: Maison internationale de l'environnement.
- Coello, C., Miceli, C., Dendooven, L., & Gutierrez, F. (2010). Plant growth regulators optimization for in vitro cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgin. *Gayana Bot.*, 19-26.
- Cruz, E., Can, A., Sandoval, M., Bugarín, R., Robles, A., & Juárez, P. (2013). Sustratos en la horticultura. *Revista Bio Ciencias*, 2(2).
- Chen, L., Pan, R., & Chen, R. (1999). *Effects of media, growth regulators and dividing on the growth of Cymbidium sinense protocorms cultured in vitro*. (Vol. 7(1)). *Journal of Tropical and Subtropical Botany*.
- Dearnaley, J., Silvia, P., & Selosse, M. (2017). *Structure and development of orchids mycorrhizas in Molecular mycorrhizal symbiosis. First Edition*. . John Wiley and sons, Inc. .

- do Valle Rego-Oliveira, L., & de Faria, R. (2005). In vitro propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 27 (1), 1-4.
- Dodson, C. (1988). A list of orchid species reported for Ecuador. *Orquídeas de la costa del Ecuador. Asociación Ecuatoriana de Orquideología.*, 115-129.
- Dressler, R. (1993). Phylogeny and classification of the orchid family. *Dioscorides Press*.
- Endara, L., Williams, N., & León, S. (2010). Explorando los patrones de endemismo de las orquídeas ecuatorianas: implicaciones para su consevración. *Congreso Latinoamericano de Botánica*, 110-130.
- Fay, M. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century?. *Botanical studies*, 59(1), 16.
- Fonnesbech, M. (1972). Growth Hormones and Propagation of Cymbidium in vitro. *Physiologia Plantarum*, 310-316.
- Freuler, M. (2008). *Orquídeas*. Buenos Aires, Argentina: Albatros.
- Fridborg, G., & Erikson, T. (1975). *Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures*. *Physiol. Plant*.
- Fridborg, G., & Eriksson, T. (1975). Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. *Physiol. Plant*, 306-308.
- Fridborg, G., Pedersen, M., & Landstrom, L. (1978). The effects of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant*, 104-106.
- Gómez, M., Moreno, L., Andrade, G., & Rueda, C. (2016). Biodiversidad 2016. *Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia*, 33-40.

- Guitierrez, R. (2010). Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *J. Med. Plants Res.* 4: 592–638.
- Hadley, G. (1997). Orchid mycorrhiza: Orchid biology, reviewz and perspectives. *Cornell University Press*, 424.
- Hew, C., & Clifford, P. (1993). *Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry* (Vol. 13(3)). Plant growth regulation.
- Hicks, A., & Lynn, K. (2007). Orchid Seed Germination Media. A Compendium of Formulations. *The Orchid Seedbank Project, Chandler*.
- Hossain, M. (2008). *Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of Epidendrum ibaguense Kunth. (Orchidaceae)* (Vol. 7 (20)). Bangladesh.: African Journal of Biotechnology.
- Hossain, M., Sharma, M., & Pathak , P. (2009). Cost effective protocol for in vitro mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.– a medicinally important orchid. *Eng Life Science*, 6, 444-453.
- ImageJ. (2018). *Scientific Image Analysis*.
- Islma, M., & Ichihashi, S. (1999). Effects os sucrose, maltose ans sorbitol on callus growth and plantlet regeneration in *Phaleaonopsis*; *coritaenopsis* and *Neofinetia*. *Japan soc Horti Sci*, 1124-1131.
- IUCN, T. (1996). *Orchids*. Gland Switzerland: IUCN. Obtenido de List of Pleurothallis species.
- IUCN. (2018). *The IUCN red list of threatened species*. Obtenido de Recuperado el 1 de marzo del 2019 desde: <https://www.iucnredlist.org/search?query=orchids&searchType=species>

- Jardín Botánico de Quito. (2019). *Plantas nativas de la hoya de Quito*. Recuperado el 18 de 02 de 2019, de Epidendrum jamiesonis: <http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php/epoca/xix-hall-jameson-hartweg/42-epidendrum-jamiesonis>
- Jorgensen, P., & Ulloa, C. (1994). Seed plants of the high Andes of Ecuador - a checklist . *AAU Reports*, 34, 330-343.
- Kauth, P., Vendrame, W., & Kane, M. (s.f.). In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*.
- Keel, B. (2007). Assisted migration as a conservation strategy for rapid climate change: investigating extended photoperiod and mucobiont distribution for *Habenaria repens* Nuttall (Orchidaceae) as a case study. *PhD thesis, Antioch University, New England*.
- Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 14, 214-217.
- Lakshman, C. (2015). *Commercial Orchids*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.
- Lee, Y. (2011). In vitro culture and germination of terrestrial Asian orchid seeds. *Plant embryo culture: methods and protocols*, 53-62.
- Lojtnant, B. (1977). Notes on the genus *Epidendrum* (Orchidaceae) in Ecuador. *Botaniska Notiser*, 130, 321-328.
- Luan, V., Thien, N., Khiem, D., & Nhut, D. (2006). In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. *Ho Chin City*, 175-177.
- Luer, C. (1998). Icones Pleurothallidarum-XVI. Systematics of *Pleurothallis* subgenera *Crocodeilanthe*, *Rhynchopera*, *Talpinaria*. Addenda to *Lepanthes* of Ecuador, *Masdevallis*, *Piletysteles*, *Pleurothallis*, *Restrepia*, and *Scaphosepalum*

- (Orchidaceae). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 65, 100-122.
- Mabberley, D. (1997). *The plant-book. 2nd edn.* Cambridge: Cambridge University Press.
- Martínez, G. (1995). *Elementos de Fisiología Vegetal.* España: Mundi Prensa.
- Mayo, A., Cazares, J., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). *Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco.* alberto Mayo Mosqueda.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas.* Ceiba Foundation for Tropical conservation.
- Medina, G. (2018). *Caracterización física, mecánica y térmica de residuos biomásicos de cuesco de palma africana y cáscara de coco.* *Revista Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.* .
- Menchaca, M., & Moreno, M. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas.* Ciudad de México: Comisión Nacional Forestal.
- Ministerio de Turismo del Ecuador. (2014). *La Maywa de Quito es la orquídea emblemática de la capital ecuatoriana.*
- Ministerio de Turismo, E. (2013). Informe técnico para proyecto de decreto ejecutivo "Ecuador País de las Orquídeas".
- Minitab 17 Statistical Software. (2010). Computer Software. State College, PA: Minitab Inc.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-481.

- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T., & Seaton, P. &. (2011). Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 204-212.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T., & Seaton, P. &. (2011). Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 204-212.
- Nadkarni, N. (2010). Potential effects of global climate change on epiphytes in a tropical montane cloud forest: an experimental study from Monteverde, Costa Rica. . *Tropical Montane Cloude Forest: science for conservation and managment* Cambridge, 557-565.
- Newman, B., Ladd, P., Batty, A., & Dixon, K. (2007). Ecology of orchids in urban bushland reserves- can orchids be used as indicator of vegetation conditions? *Lankesteriana*, 7, 313-315.
- Ospina, M. (1996). Orchids and ecology in Colombia: to the rescue of paradise. *Santafé de Bogotá, Colombia: Panamericana Formas e Impresos*.
- Pan, M., & van Staden, J. (1998). *The use of charcoal in in vitro culture - A review* (Vol. 26). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Pant, B., & Thapa, D. (2012). In vitro mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture .
- Pedroza, J., Fernandez, C., & Suarez, A. (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comporettia falcata* seeds under in vitro conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 838-843.
- Pierik, R. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer science and business media.

- Pire, R., & Pereira, A. (2003). Propiedades físicas de componentes de sustratos de uso común en la horticultura del Estado Lara. *Propuesta metodológica Bioagro*, 15, 55-63.
- Porembski, S., & Barthlott, W. (1988). Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany*, 8, 117-137.
- Pridgeon, A., Cribb, P., Chase, M., & Rasmussen, F. (2009). *Genera Orchidacearum*. volumen 5. Oxford University Press, Oxford.
- Pypker, T., Unsworth, M., & Bond, B. (2006). The role of epiphytes in rainfall interception by forest in the Pacific Northwest. . *Canadian Journal of Forest Research*, 36, 809-818.
- Radice, S. (2010). Morfogénesis in vitro. *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*, 27-30.
- Rasmussen, H., & Rasmussen, F. (2008). Orchids mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118, 334-345.
- Rasmussen, H., & Rasmussen, F. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos Journal*, 118, 334-345.
- Reichenbach, H. (1856). Stipulae orchidaceae Reichenbachianae. "Folia" Lindleyana intraaxillares. *Bonplandia*, 4, 321-330.
- Rey, C., & Llópiz, J. &. (2007). Estudio comparativo del carbón activado M1 de producción nacional para su uso como antídoto. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 38(3).
- Rodríguez, G. P. (2009). Efecto de la Temperatura y Tiempo de Cocción en la Porosidad de Mezclas a Base de Arcillas de Caolines. *Revista Colombiana de Física*, 41(1), 27-32.

- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2004). Propagación asexual de plantas. *Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas*.
- Ruiz, C., Moreno, J, Salgado, M., & Olivera, A. (2016). *Orquídeas. Rescate por germinación in vitro*. Ciudad de México: UAC.
- S., S., & D., R. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. London, UK: Academic Press.
- Saleem, U. 2. (2007). Investigating the medicinal properties of orchids. *Columbia Sci. Rev.* 4: 22–23.
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2009). *Cultivo de orquídeas por semillas*. Richmond, Surrey, UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Seeman, A. (1993). *Utilización de técnicas de micro propagación*. Chile: Avances en producción y sanidad vegetal: cultivos no tradicionales.
- Semithn, S., & Retad, D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. London, UK: Academic Press.
- Sharrock, S. (2007). Botanic gardens and their role in the national plant conservation strategies. . *Conservation of plant diversity in Japanese botanic gardens*, 2-8.
- Shefferson, R., Weiss, M., Kull, T., & Taylor, D. (2005). High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular ecology*, 14(2), 613-626.
- Shin, Y., Banque, A., Elghamedi, S., Lee, E., & Peak, K. (2011). Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pre-treatments on in vitro germination and protocorm formation of *Calanthe* hybrids. *Australian Journal of Crop Science*, 528-588.
- Sletvold, N., Dahlgren, J., Øien, D., Moen, A., & Ehrlén, J. (2013). Climate warming alters effects of management on population viability of threatened species: results from a

- 30-year experimental study on a rare orchid. *Global Change Biology*, 19(9), 2729-2738.
- Smith, R. (2006). Regulator Factors. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*, 33-36.
- Srivastava, L. (2002). *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. California: Associated Press.
- Stuntz, S., Simon, U., & Zotz, G. (2002). Rainforest air-conditioning: the moderating influence of epiphytes on the microclimate in tropical tree crowns. *International Journal of Biometeorology*, 46, 53-59.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology*. United States: Sinauer.
- Teryokhin, E., & Kamelina, O. (1969). Endosperm of Orchidaceae (to the question on reduction). *Botanicheskii Zhurnal SSSR* 54: 657–666.
- Thakur, U., & Dongarwar, N. (2013). A new report of 'in vitro' flowering and multiple shooting in a wild epiphytic orchid 'Oberonia recurva' Lindl. from asymbiotically germinated seedlings. *Plant Knowledge Journal*.
- Vasudevan, R., & Staden, J. (2010). In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Sci Horti* , 496-504.
- Vejsadova, H. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(1), 109-113.
- Villegas, F., Posada, J., Jaramillo, J., & Echeverri, P. (2014). *Manual de cultivo de orquídeas*. Medellín, Colombia: Sociedad Colombiana de Orquideología.

- Vinogradova, V., & Andronova, E. (2002). Development of orchid seeds and seedlings. In: Kull T, Arditti J, eds. *Orchid biology: reviews and perspectives*, Vol. 8. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 167–234.
- Waddington, J. L. (2011). Sphagnum moss moisture retention following the re-vegetation of degraded peatlands. *Ecohydrology*, 4(3), 359-366.
- Wang, C., Sun, J., Luo, Y., Xue, W., Diao, H., Dong, L., . . . Zhang, J. (2006). A polysaccharide isolated from the medicinal herb *Bletilla striata* induces endothelial cells proliferation and vascular endothelial growth factor expression in vitro. *Biotechnol. Lett.* 28: 539–543.
- Wu, B., He, S., & Pan, Y. (2006). New dihydrodibenzoxepins from *Bulbophyllum kwangtungense*. *Planta Medica* 72: 1244–1247.
- Yasugi, S. (1983). Ovule and embryo development in *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 70: 555–560.
- Zotz, G. (1999). Vegetative propagation in an epiphytic orchid occurrence and ecological relevance. *Ecotropica*, 5(1), 65-68.

12. Tablas

Tabla 1. Tratamientos probados para las etapas de germinación y elongación de las especies de estudio

Tratamiento	Descripción
A	Murashige y Skoog Modificado (concentración media)
B	Murashige y Skoog Modificado (concentración media) con carbón activado (2000 mg L ⁻¹)
C	Murashige y Skoog Modificado (concentración media) con ácido giberélico (0.02 mg L ⁻¹)
D	Murashige y Skoog Modificado (concentración media) con ácido giberélico (0.02 mg L ⁻¹) y carbón activado (2000 mg L ⁻¹)
E	KC (Knudson C) sin hormonas y sin carbón activado
F	KC con carbón activado (2000 mg L ⁻¹)
G	KC con ácido giberélico (0.02 mg L ⁻¹)
H	KC con ácido giberélico (0.02 mg L ⁻¹) y carbón activado (2000 mg L ⁻¹)

La composición del medio Murashige and Skoog corresponde a la descrita por Murashige & Skoog (1962). Mientras que la composición del medio Knudson C corresponde a la descrita por Knudson (1946).

Tabla 2. Fases de desarrollo inicial de especies de orquídeas

Fase	Descripción
0	Semillas con embrión no germinado
1	Embrión con tamaño mayor y con coloración verde
2	Testa de la semilla se empieza a romper
3	Se forman protocormos con rizoides
4	Protocormo con brote inicial
5	Elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior

Las fases de desarrollo inicial fueron adaptadas de *Cultivo de orquídeas por semillas*, de Seaton y Ramsay (2009)

Tabla 3. Porcentaje de germinación y porcentaje de semillas que se desarrollaron hasta fase 5, de semillas frescas y secas de *Epidendrum jamiesonis* en 8 tratamientos probados.

<i>Epidendrum jamiesonis</i>				
Tratamiento	Porcentaje de germinación (4 semanas desde la siembra)		Porcentaje de avance hasta hasta fase de desarrollo 5 (12 semanas desde la siembra)	
	Semillas frescas	Semillas secas	Semillas frescas	Semillas secas
A	40.34 ^c	63.05 ^{a b c}	19.84 ^{b c}	22.35 ^b
B	72.98 ^a	66.31 ^{a b}	12.60 ^{b c d}	12.16 ^c
C	56.60 ^b	73.98 ^a	39.76 ^a	33.72 ^a
D	71.86 ^a	72.60 ^a	21.81 ^b	25.11 ^b
E	70.97 ^a	55.42 ^{b c}	8.06 ^{d e}	1.90 ^{d e}
F	72.94 ^a	56.11 ^{b c}	3.34 ^{d e}	9.12 ^{c d}
G	61.66 ^{a b}	60.37 ^{a b c}	11.55 ^{c d}	7.80 ^{c d e}
H	73.29 ^a	51.75 ^c	0.0 ^e	0.0 ^e

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey.

Tabla 4. Porcentaje de germinación total y porcentaje de desarrollo hasta fase 5 (independiente del tratamiento probado) de semillas frescas y semillas secas de *Epidendrum jamiesonis* y resultados de la prueba t pareada

Tipo de semillas	Porcentaje de germinación	Porcentaje de desarrollo hasta fase 5
Obtenidas de cápsula fresca	64.8	14.62
Semillas secas	62.5	14.55
Valor P	0.180	0.969

Tabla 5. Porcentaje de germinación y desarrollo hasta fase 5 de semillas obtenidas de cápsulas frescas de *Pleurothallis pulchella* in vitro sobre los 8 tratamiento

<i>Pleurothallis pulchella</i>		
Tratamiento	Porcentaje de germinación (4 semanas desde la siembra)	Porcentaje de avance hasta hasta fase de desarrollo 5 (12 semanas desde la siembra)
A	21.39 ^{bc}	56.43 ^a
B	33.15 ^a	62.99 ^a
C	15.46 ^{cd}	39.50 ^b
D	22.73 ^b	42.11 ^b
E	5.29 ^e	24.26 ^c
F	14.06 ^{cd}	0.80 ^d
G	7.74 ^{de}	24.81 ^c
H	11.50 ^{de}	2.67 ^d

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey.

Tabla 6. Porcentaje de germinación total de semillas obtenidas de cápsulas frescas de *Epidendrum jamiesonis* y de *Pleurothallis pulchella* y resultados del análisis de varianza

Tipo de semillas	Porcentaje de germinación (4 semanas desde la siembra)	Porcentaje de avance hasta hasta fase de desarrollo 5 (12 semanas desde la siembra)
<i>Epidendrum jamiesonis</i>	65.31	14.62
<i>Pleurothallis pulchella</i>	16.41	31.70
Valor p	0.000	0.000

Tabla 7. Elongación de plántulas obtenidas de semillas frescas y semillas secas de *Epidendrum jamiesonis* durante 17 semanas *in vitro* en 8 tratamientos probados.

Tratamiento	Crecimiento (cm) de plántulas obtenidas de semillas frescas
A	0.7515 ^{c d}
B	1.0639 ^b
C	1.0290 ^b
D	1.5379 ^a
E	0.8369 ^c
F	0.9900 ^b
G	0.6986 ^d
H	0.0000 ^e

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey.

Tabla 8. Resultados de supervivencia y crecimiento de plántulas aclimatadas durante tres meses, que pasaron por un periodo previo de elongación de 32 y 55 semanas *in vitro*.

Tipo de sustrato	Porcentaje de supervivencia		Crecimiento (cm)	
	Plántulas que pasaron por periodo de elongación de 32 semanas <i>in vitro</i>	Plántulas que pasaron por periodo de elongación de 55 semanas <i>in vitro</i>	Plántulas que pasaron por periodo de elongación de 32 semanas <i>in vitro</i>	Plántulas que pasaron por periodo de elongación de 55 semanas <i>in vitro</i>
Musgo <i>Sphagnum</i> con piedra pómez	90.48 %	100%	0.5649 ^a	0.6600 ^a
Cáscara de arroz con cuesco de palma africana	21.67%	55%	0.2333 ^b	0.4286 ^b
Aserrín con piedra pómez	15%	2.88%	0.2154 ^b	0.3727 ^b
Total	42.38%	52.63%	Valor p = 0.000	

Tabla 9. Composición de medios de cultivo empleados en los ensayos realizados con *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella*

Compuestos (mg L⁻¹)	½ Murashige and Skoog (½ MS)	Knudson C (KC)
NH₄NO₃	825	500
KNO₃	950	
CaCl₂ · 2H₂O	166.1	
MgSO₄	185	122.15
KH₂PO₄	85	250
(NH₄)₂SO₄		500
Ca(NO₃)₂		241.3
H₃BO₃	3.1	
MnSO₄ · H₂O	11.15	5.68
ZnNO₂ · 7H₂O	4.3	
Na₂MoO₄	0.125	
CuSO₄ · 5H₂O	0.0125	
CoCl₂ · 6H₂O	0.0125	
KCl	0.415	250
FeSO₄ · 7H₂O	13.93	25
Na₂EDTA · 2H₂O	18.635	

(Knudson, 1946) (Murashige & Skoog, F., 1962)

13. Figuras

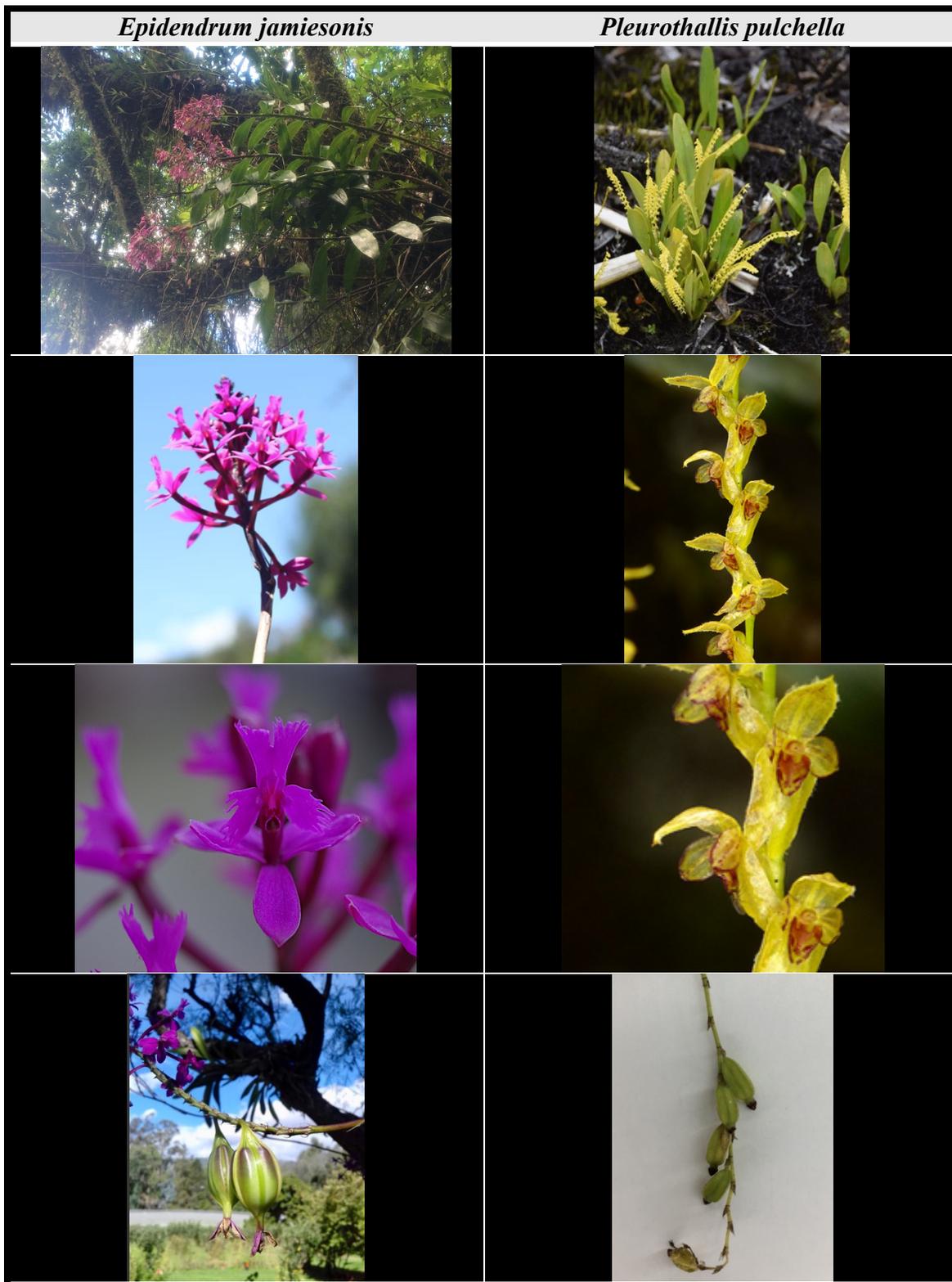


Figura 1. Fotografías de las especies de estudio *Epidendrum jamiesonis* y *Pleurothallis pulchella*

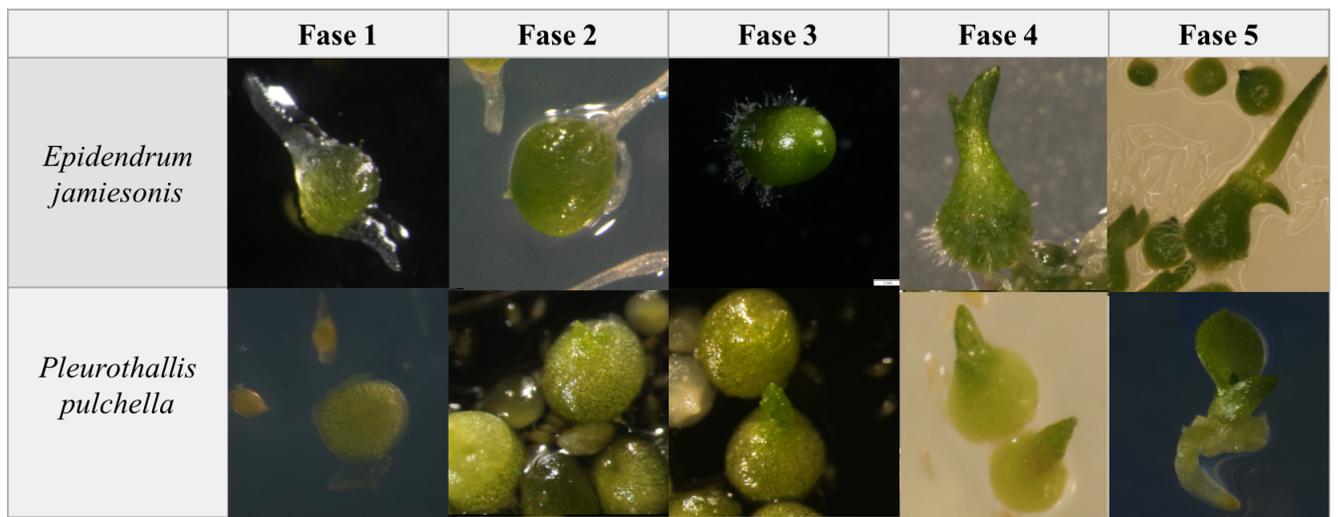


Figura 2. Fotografías del desarrollo de las semillas por las distintas 5 fases de desarrollo iniciales de las dos especies de estudio, tomadas bajo el estereomicroscopio con un aumento de 1.6X.

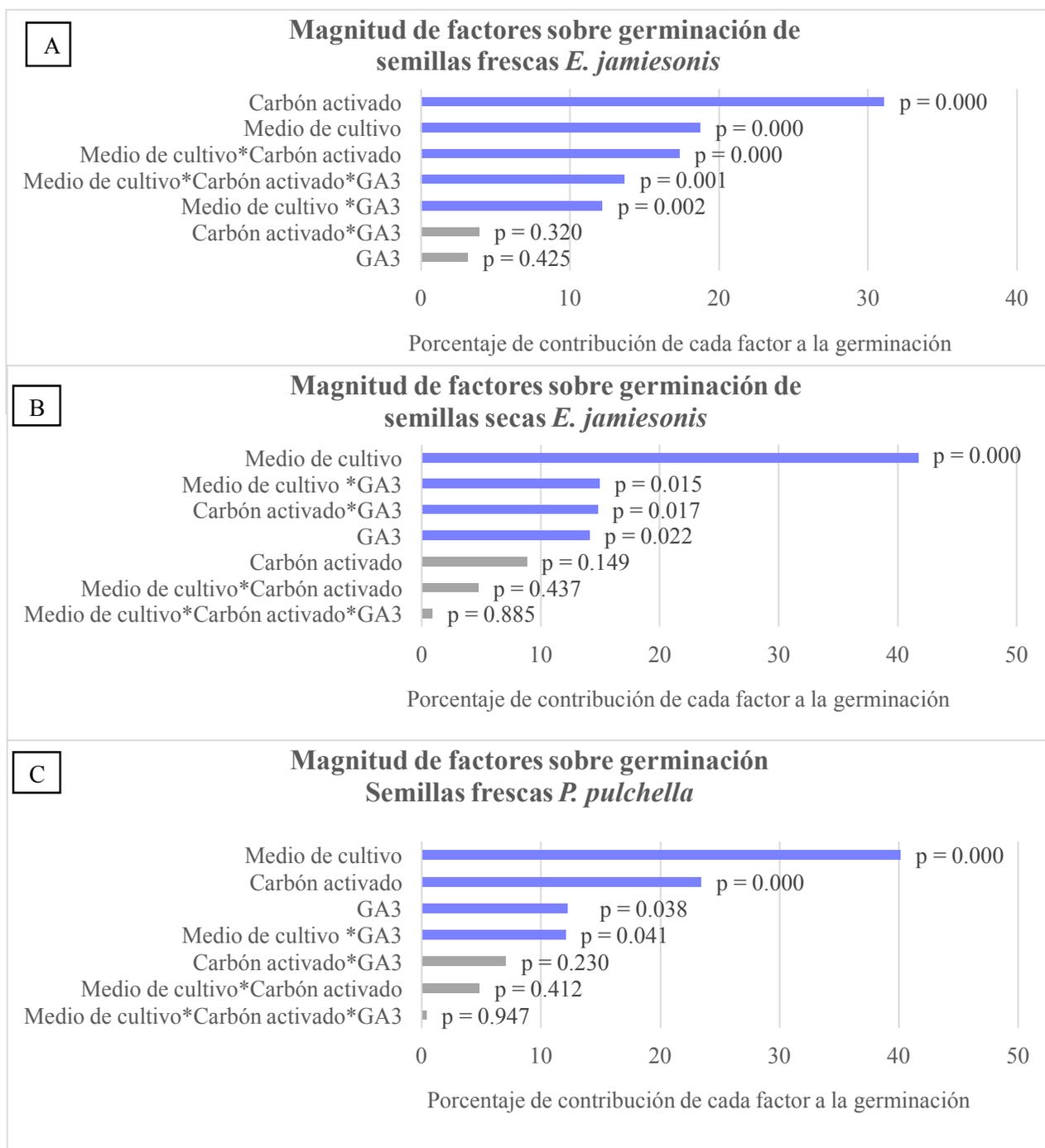


Figura 3. Magnitud de cada factor probado y sus interacciones sobre el porcentaje de semillas germinadas después de 4 semanas. **A.** Ensayo de semillas frescas de *E. jamiesonis*. **B.** Ensayo de semillas secas de *E. jamiesonis*. **C.** Ensayo de semillas de *P. pulchella*. A la derecha de cada barra se identifican los valores p, resultado del ANOVA del diseño factorial para la comparación de porcentaje de germinación. Las barras de color azul representan a los factores o interacciones significativas, mientras que las grises representan a los factores o interacciones no significativas. Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%.

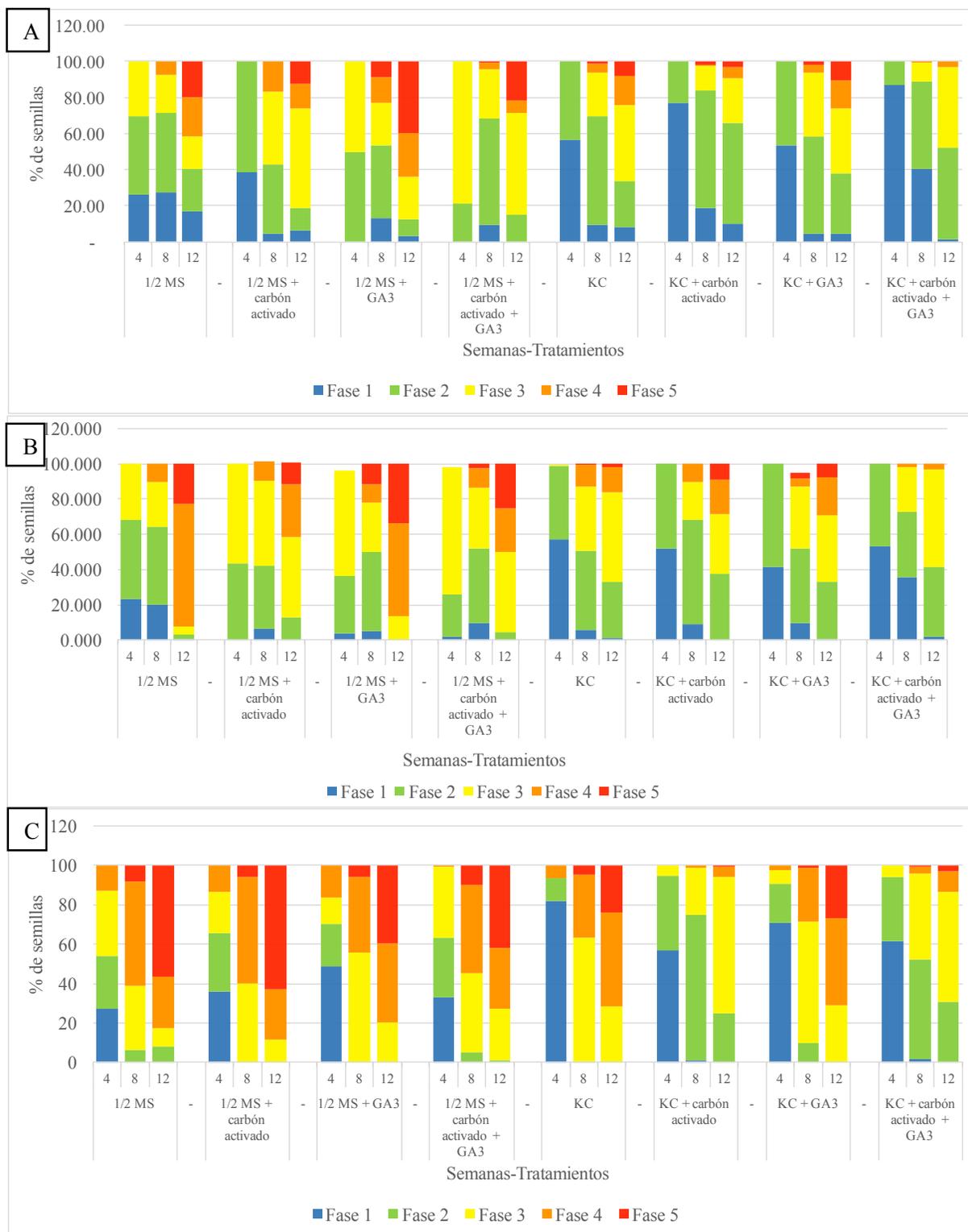


Figura 4. Desarrollo de las semillas por las distintas fases de desarrollo a las 4, 8 y 12 semanas. **A)** Semillas frescas de *E. jamiesonis*. **B)** Semillas secas de *E. jamiesonis* **C)** Semillas frescas de *P. pulchella*.

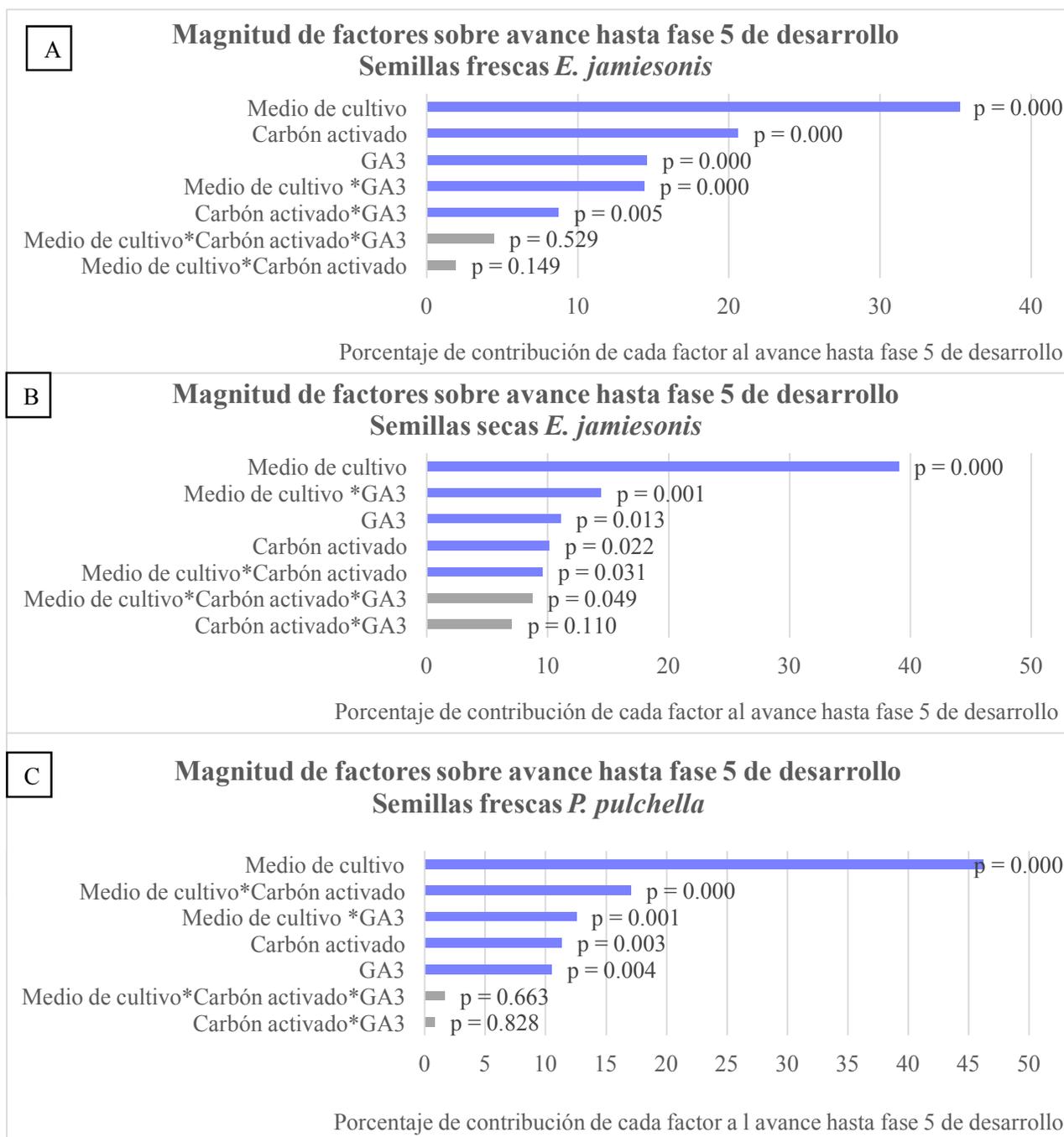


Figura 5. Magnitud de cada factor probado y sus interacciones sobre el porcentaje de semillas germinadas que avanzaron hasta fase 5 de desarrollo después de 13 semanas. **A.** Ensayo de semillas frescas de *E. jamiesonis* **B.** Ensayo de semillas secas de *E. jamiesonis*. **C.** Ensayo de semillas de *P. pulchella*. A la derecha de cada barra se identifican los valores p, resultado del ANOVA del diseño factorial para la comparación de porcentaje de germinación. Las barras de color azul representan a los factores o interacciones significativas, mientras que las grises representan a los factores o interacciones no significativas. Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%.

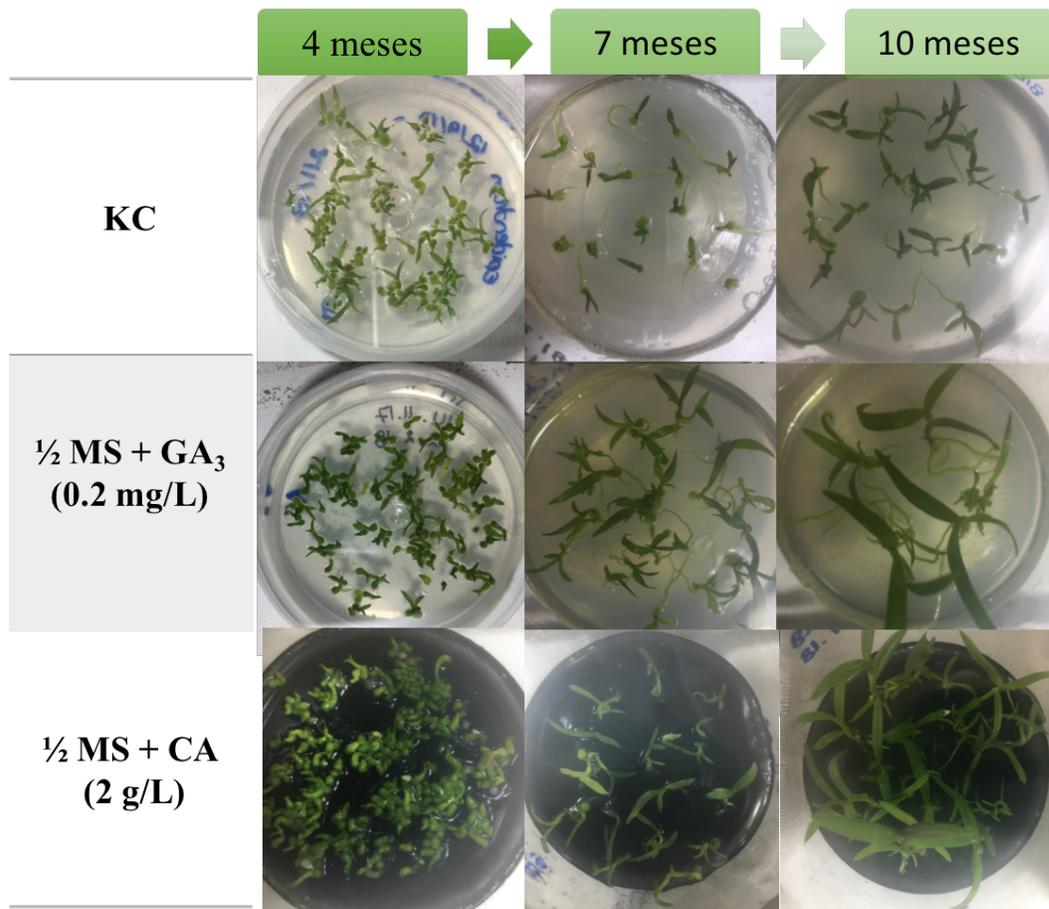


Figura 6. Fotografías representativas de la elongación de plántulas en los distintos periodos de tiempo, en los cuales se lograron identificar diferencias significativas en el crecimiento. Puesto que el medio KC, mostro poco crecimiento; mientras que $\frac{1}{2}$ MS con carbón activado presentó el mayor crecimiento.

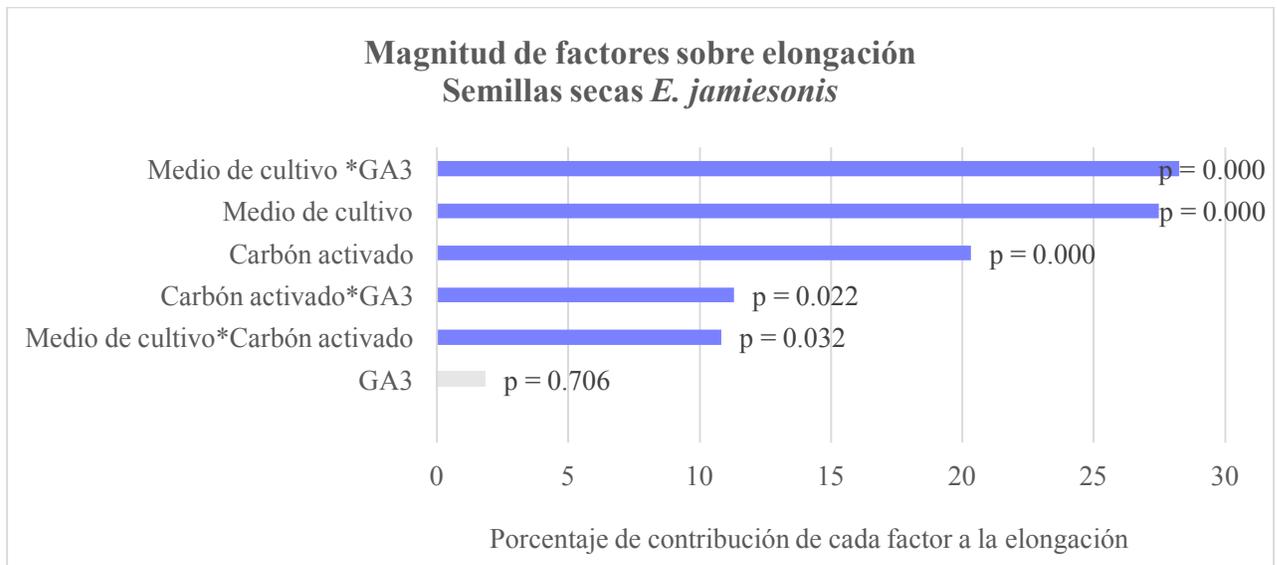


Figura 7. Magnitud de cada factor probado y sus interacciones sobre el crecimiento de plántulas de *E. jamiesonis* después de 13 semanas en etapa de elongación. A la derecha de cada barra se identifican los valores p, resultado del ANOVA del diseño factorial para la comparación de porcentaje de germinación. Las barras de color morado representan a los factores o interacciones significativas, mientras que las grises representan a los factores o interacciones no significativas. Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%.

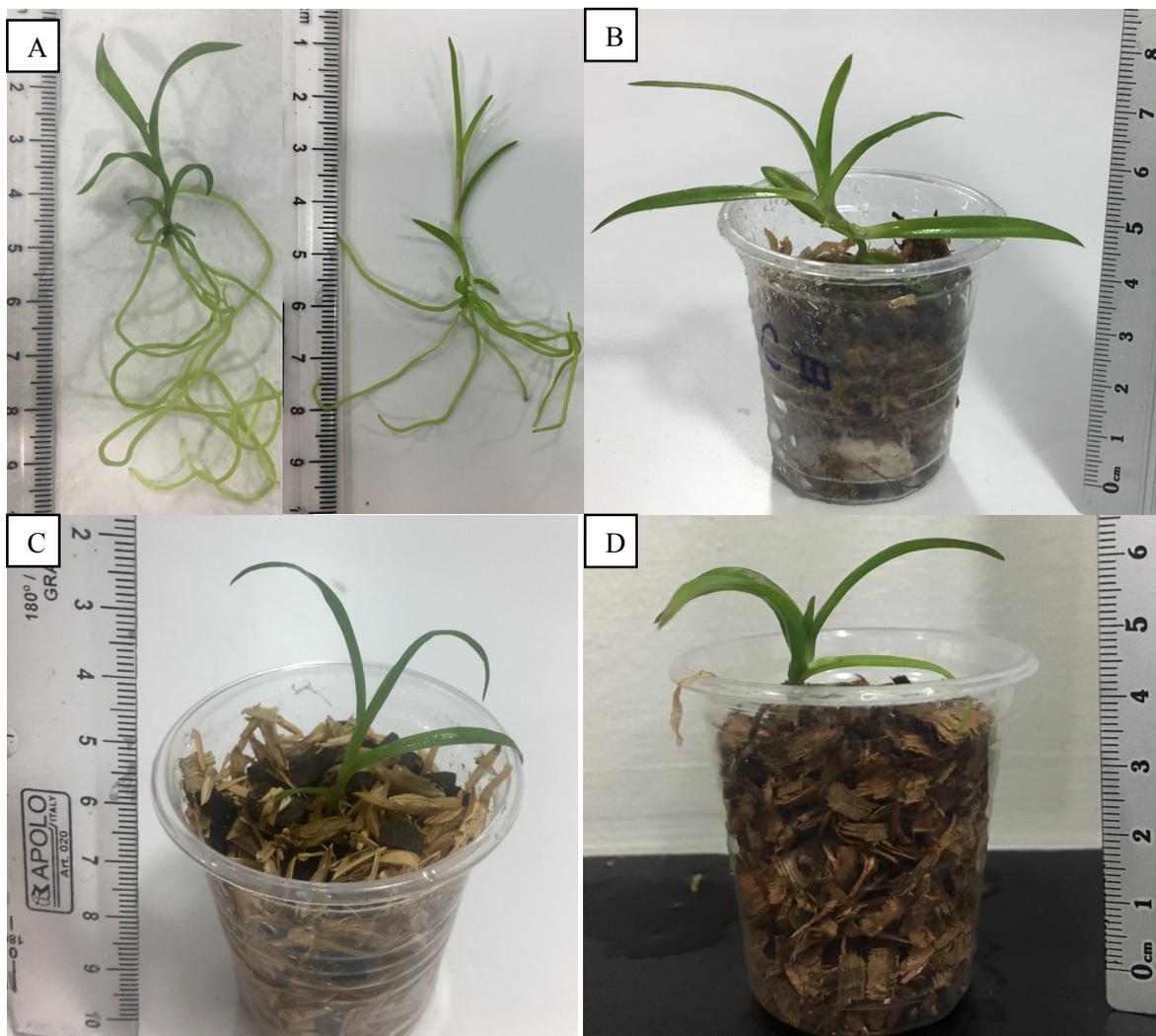


Figura 8. Fotografías representativas de aclimatación **A)** Plántulas obtenidas *in vitro* que pasarán a aclimatación. **B)** Plántulas en aclimatación en sustrato de musgo *Sphagnum* y piedra pómez. **C)** Plántulas en aclimatación en sustrato de cáscara de arroz y cuesco de palma africana. **D)** Plántulas en aclimatación en sustrato de aserrín y piedra pómez.

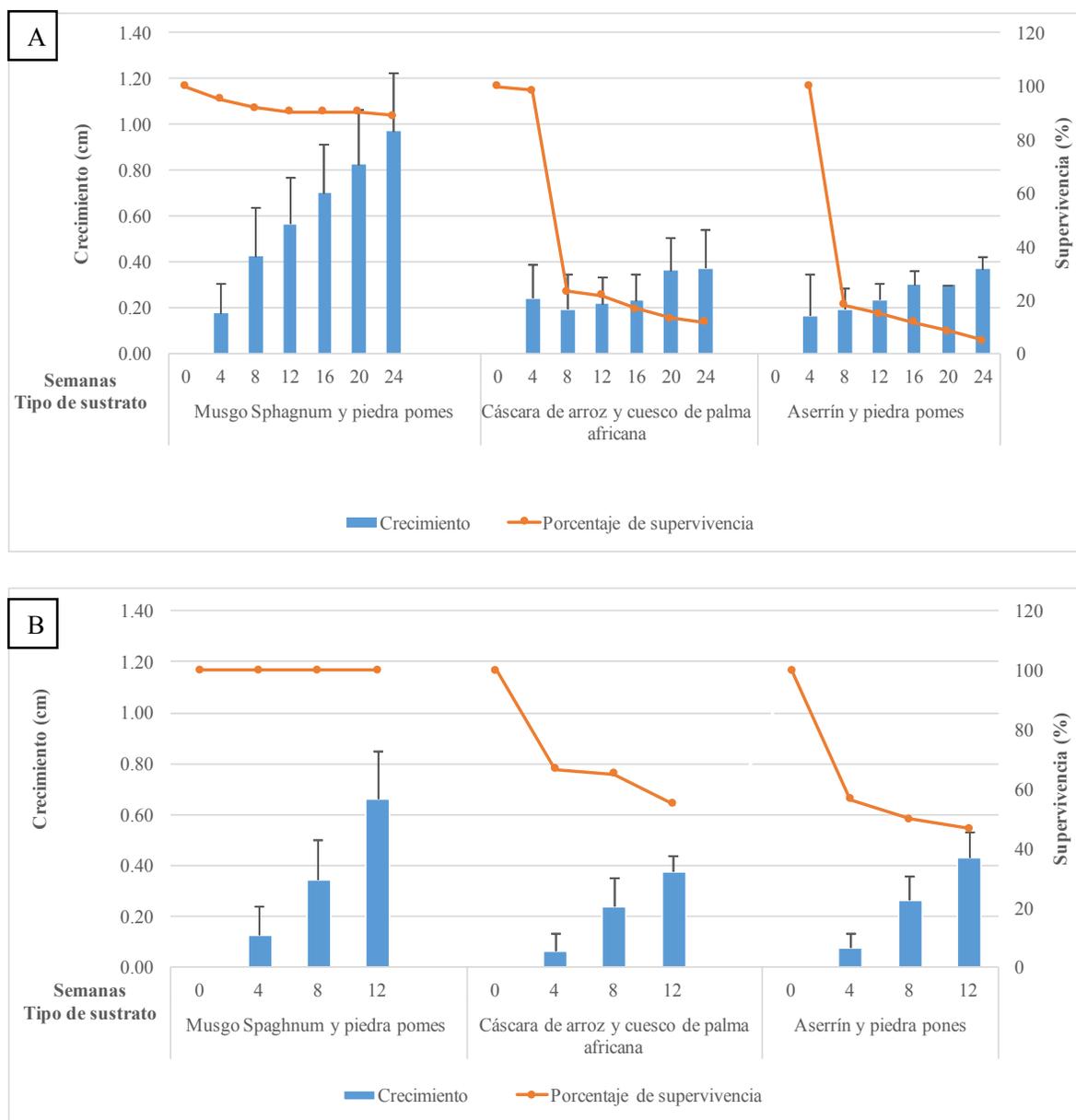


Figura 9. Porcentaje de supervivencia y crecimiento de plántulas de *E. jamiesonis* en aclimatación. El crecimiento de las plántulas hace referencia a la diferencia de tamaño de las plántulas desde el inicio de la aclimatación y el tamaño en cada semana. **A)** Plántulas que crecieron durante 42 semanas de *in vitro*. Resultados del ensayo de aclimatación después 24 semanas de aclimatación. **B)** Plántulas que crecieron durante 67 semanas en *in vitro*. Resultados del ensayo de aclimatación después 12 semanas de aclimatación.