

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA E INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**TEMA:
DEFINICIÓN DE PROTOCOLOS PARA EL USO DE FITOHORMONAS EN EL
CRECIMIENTO DE ORQUÍDEAS A NIVEL *IN VITRO***

**AUTORES:
CRISTINA BELÉN AUCAPIÑA CRIOLLO
PAÚL ALEXANDER LÓPEZ PEÑA**

**TUTOR:
MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

Quito, abril del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Cristina Belén Aucapiña Criollo con documento de identificación N° 1726442666 y Paúl Alexander López Peña con documento de identificación N° 1719768978, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel *in vitro*”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 07 de abril del 2016



Cristina Belén Aucapiña Criollo
CI. 1726442666



Paúl Alexander López Peña
CI. 1719768978

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el Trabajo experimental, “Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel *in vitro*”, realizado por Cristina Belén Aucapiña Criollo y Paúl Alexander López Peña, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, 07 de abril del 2016

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end, positioned above a dashed horizontal line.

Marco Fernando Cerna Cevallos

CI. 0501872071

Dedicatoria

A mis padres, hermano y demás familiares, por ser pilares fundamentales en mi vida y un ejemplo de unidad, responsabilidad y honestidad. A cada uno de mis amigos por las experiencias compartidas y recuerdos inolvidables.

Cristina

A mis padres, quienes me han brindado amor y sabiduría en todo momento de mi vida, a mi hermano por su apoyo incondicional y por ser un ejemplo tanto en el ámbito personal como profesional. Y mis amigos por las experiencias vividas a lo largo de la carrera universitaria.

Paúl

Agradecimientos

Un especial agradecimiento a la Señora Sara Gutiérrez y Don Alfredo Trujillo por su invaluable trabajo en el “Jardín Botánico y vivero comercial Orquídeas de Sarina”.

A cada uno de nuestros maestros, por impartir sus conocimientos y experiencia, en especial al PhD Marco Cerna y MSc. Jans Beltrán.

A la Universidad Politécnica Salesiana que abre sus puertas a jóvenes mentes deseosas de conocimiento e investigación.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.....	5
Marco conceptual	5
1.1 Las orquídeas	5
1.1.1 Ecología de las orquídeas	6
1.1.2 Descripción botánica y morfológica de la Familia Orchidaceae	6
1.1.3 Clasificación taxonómica	8
1.2 Género <i>Epidendrum</i>	8
1.2.1 Distribución y Hábitat	9
1.2.2 <i>Epidendrum jamiesonis</i>	9
1.2.3 <i>Epidendrum schistochilum</i>	10
1.3 Género <i>Oncidium</i>	11
1.3.1 Distribución y Hábitat	11
1.3.2 <i>Oncidium ornithorhynchum</i>	12
1.4 Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas.....	13
1.5 Viabilidad de semillas de orquídea	14
1.6 Medios de cultivo para orquídeas	14
1.7 Fitohormonas	16
1.7.1 Giberelinas.....	16
1.7.2 Auxinas.....	17
1.7.3 Citoquininas.....	18
1.7.4 Relación Auxina-Citoquinina.....	20
Capítulo 2.....	21
Materiales y métodos	21
2.1 Localización	21
2.2 Ensayo para la calibración de concentraciones de fitohormonas.....	21
2.3 Establecimiento del uso de giberelinas en la dinámica de germinación de semillas de orquídea a nivel <i>in vitro</i>	25
2.4 Definición de la concentración ideal de auxina y citoquinina en protocormos y establecimiento del punto de equilibrio auxina-citoquinina	28
Capítulo 3.....	32
Resultados y Discusión.....	32
3.1 Ensayo para la calibración de concentraciones de fitohormonas.....	32

3.2 Establecimiento del uso de giberelinas en la dinámica de germinación de semillas de orquídea a nivel <i>in vitro</i>	38
3.3 Definición de la concentración ideal de auxina y citoquinina	43
3.4 Determinación del punto de equilibrio auxina-citoquinina.....	49
Conclusiones	58
Referencias.....	59

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las Orquídeas.	8
Tabla 2. Composición del medio M&S, Knudson C modificado y medio de Mantenimiento para Orquídeas.	15
Tabla 3. Tratamientos con ácido giberélico.	22
Tabla 4. Tratamientos con ácido indol butírico.	23
Tabla 5. Tratamientos con kinetina.	24
Tabla 6. Tratamientos para la determinación del punto de equilibrio auxina-citoquinina en protocormos.	30
Tabla 7. Prueba de Duncan al 5% en tomate riñón para porcentajes de germinación.	32
Tabla 8. Prueba de Duncan al 5% en tomate riñón para longitud de raíz.	34
Tabla 9. Prueba de Duncan al 5%, en tomate riñón para longitud de las plántulas.	35
Tabla 10. Porcentaje de viabilidad de semillas de las especies de orquídea <i>Epidendrum jamiesonis</i> , <i>Epidendrum schistochilum</i> y <i>Oncidium ornithorhynchum</i>	38
Tabla 11. Prueba de Duncan al 5% en la interacción de tratamientos en las especies <i>E. schistochilum</i> , <i>E. jamiesonis</i> y <i>O. Ornithorhynchum</i> para la variable germinación de semillas.	40
Tabla 12. Prueba de Duncan al 5% para los tratamientos en <i>E. schistochilum</i> y <i>E. jamiesonis</i> , en la variable número de brotes.	44
Tabla 13. Prueba de Duncan al 5% para los tratamientos, en <i>E. schistochilum</i> y <i>E. jamiesonis</i> , en la variable longitud de brotes.	45
Tabla 14. Prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos auxina-citoquinina en las especies <i>E. schistochilum</i> y <i>E. jamiesonis</i> , para la variable longitud de raíz.	50
Tabla 15. Prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos auxina-citoquinina con la especie <i>E. schistochilum</i> y <i>E. jamiesonis</i> para la variable longitud de brotes.	51
Tabla 16. Prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos auxina-citoquinina en las especies <i>E. schistochilum</i> y <i>E. jamiesonis</i> para la variable número de brotes.	53

Índice de figuras

Figura 1. Partes de la flor de una orquídea.....	7
Figura 2. Especie representativa del género <i>Epidendrum</i>	9
Figura 3. Floración de <i>Epidendrum jamiesonis</i>	10
Figura 4. Floración de <i>Epidendrum schistochilum</i>	11
Figura 5. Especie representativa del género <i>Oncidium</i>	12
Figura 6. Floración de <i>Oncidium ornithorhynchum</i>	12
Figura 7. Molécula de ácido giberélico.....	17
Figura 8. Molécula ácido indol butírico.....	18
Figura 9. Molécula de kinetina.....	19
Figura 10. Efecto de GA ₃ en la germinación de semillas de tomate riñón	33
Figura 11. Efecto de IBA en crecimiento en longitud de raíz de tomate riñón.....	34
Figura 12. Efecto de Kin en crecimiento en longitud de plántulas de tomate riñón	36
Figura 13. Germinación <i>in vitro</i> de las especies <i>E. jamiesonis</i> , <i>E. schistochilum</i> y <i>O. ornithorhynchum</i>	40
Figura 14. Dinámica en el porcentaje de germinación de especies <i>E. jamiesonis</i> , <i>E. schistochilum</i> y <i>O. ornithorhynchum</i> mediante la adición de GA ₃	41
Figura 15. Efecto de kinetina en <i>E. schistochilum</i> y <i>E. jamiesonis</i>	46
Figura 16. Efecto de combinación de hormonas IBA x Kin en <i>E. schistochilum</i>	54
Figura 17. Efecto de combinación de hormonas IBA x Kin en <i>E. jamiesonis</i>	54

Índice de anexos

Anexo 1. Patente de manejo de vida silvestre “Jardín Botánico y vivero comercial Orquídeas de Sarina”	73
Anexo 2. Ensayo de calibración de hormonas en tomate riñón.	74
Anexo 3. ANOVA en tomate riñón para el porcentaje de germinación.	75
Anexo 4. ANOVA en tomate riñón para la longitud de la raíz.	75
Anexo 5. ANOVA en tomate riñón para longitud de plántulas.	75
Anexo 6. Viabilidad de semillas de Orquídea.	76
Anexo 7. ANOVA para la variable germinación de semillas en las especies <i>E. jamiesonis</i> <i>E. schistochilum</i> y <i>O. Ornithorhynchum</i>	77
Anexo 8. Germinación de semillas de orquídea, por especie, tratamiento ideal y testigo.	77
Anexo 9. ANOVA en la especie <i>E. schistochilum</i> , <i>E. jamiesonis</i> para la variable longitud de raíz por efecto de IBA.	78
Anexo 10. ANOVA en la especie <i>E. schistochilum</i> , <i>E. jamiesonis</i> para la variable número de brotes por efecto de Kin.	78
Anexo 11. ANOVA en la especie <i>E. schistochilum</i> , <i>E. jamiesonis</i> para la variable longitud de brotes por efecto de Kin.	78
Anexo 12. ANOVA en la especie <i>E. schistochilum</i> , <i>E. jamiesonis</i> para la variable longitud de raíz por efecto de combinación de hormonas.	79
Anexo 13. ANOVA en la especie <i>E. schistochilum</i> , <i>E. jamiesonis</i> , para la variable longitud de brotes por efecto de combinación de hormonas.	79
Anexo 14. ANOVA en la especie <i>E. schistochilum</i> , <i>E. jamiesonis</i> para la variable número de brotes por efecto de combinación de hormonas.	79

Resumen

En esta investigación se estableció los protocolos para el uso de ácido giberélico (GA₃), ácido indol butírico (IBA) y kinetina (Kin) mediante el cultivo *in vitro* de *Epidendrum jamiesonis*, *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium ornithorhynchum*, orquídeas nativas del Ecuador. En primera instancia se calibraron concentraciones ideales de referencia mediante bioensayos en *Solanum lycopersicum*. Luego se estableció la dinámica en el porcentaje de germinación de semillas mediante la adición de giberelinas en orquídeas, se sembraron semillas en medio Knudson C Modificado Plus y se agregó 130 µL de cada solución de hormonas, determinándose una concentración ideal de 0,1 mg/L para *Epidendrum* y 0,2 mg/L para *Oncidium*. Además se analizó el efecto de IBA, Kin y la combinación IBA x Kin en el desarrollo de protocormos de las especies *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum* sembrados en el medio “Orchid Maintenance Medium” adicionando 130 µL de solución de hormona. En el caso de Kin se estableció una concentración ideal de 0,01 mg/L para longitud de brotes y 0,4 mg/L para número de brotes. Asimismo se determinó que el punto de equilibrio auxina-citoquinina en la especie *E. schistochilum* es 7,5 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin, mientras que *E. jamiesonis* presenta mejores resultados a 3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin. No obstante, se definió que existe un mejor desarrollo en cuanto al número de brotes, crecimiento radicular y foliar en la combinación de hormonas que al aplicarlas individualmente.

Palabras clave: Ácido giberélico, IBA, kinetina, orquídeas, protocolos.

Abstract

In this research protocols for the use of gibberellic acid (GA₃), butyric indole acid (IBA) and kinetin (Kin) were established through *in vitro* culture of *Epidendrum jamiesonis*, *Epidendrum schistochilum* and *Oncidium ornithorhynchum*, native orchids of Ecuador. Firstly, ideal reference concentrations were calibrated by bioassay using *Solanum lycopersicum*. To establish a dynamic in the percentage of germination by adding gibberellins, orchid seeds were sown in the Knudson C Modified Medium Plus and 130 µL of each hormone solution were added, determining the ideal concentration of 0,1 mg/L for *Epidendrum* and 0,2 mg/L for *Oncidium*. In addition, the effect of IBA, Kin and the combination IBA x Kin was analyzed in protocorms of the species *Epidendrum jamiesonis* and *Epidendrum schistochilum*. These were planted in the Orchid Maintenance Medium and 130µL of hormone solution was added. Regarding the kinetin, an ideal concentration of 0,01 mg/L for shoot length and 0,4 mg/L for number of shoot were established. It was also determined that the point of auxin-cytokinin balance in *Epidendrum schistochilum* is 7,5 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin, but in *Epidendrum jamiesonis* is 3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin. However, a better development in the number of shoot, root and leaf growth was observed when applying the combination of hormones solution than individually.

Keywords: Gibberellic acid, IBA, kinetin, orchids, protocols.

Introducción

La familia Orchidaceae presenta variedades casi infinitas de colores, formas y perfumes. Se han descrito alrededor de 27801 especies, 899 géneros tanto terrestres como epífitos y miles de híbridos (The Plant List, 2013). Se considera una especie cosmopolita, pues se encuentra en casi todos los rincones del planeta (Marija, 2003). Salazar (2004), menciona que con respecto a la taxonomía se destaca por ser una de las familias más complicadas, en la naturaleza se puede observar flores desde cinco milímetros hasta treinta centímetros y muchas inflorescencias llegan a medir hasta dos metros de largo, las formas y colores de estas especies cautivan a cualquiera haciéndolas a su vez vulnerables.

En el año 2013, Ecuador fue declarado “País de las Orquídeas”, mediante un decreto ejecutivo del Presidente de la República, pues el país cuenta con el mayor número de especies reportadas a nivel mundial (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2013). Según Endara, Williams y León-Yáñez (2010), Ecuador cuenta con 4032 especies de orquídeas constituyendo el 20% de la riqueza florística del país; a su vez, señalan que 1710 especies son endémicas. No obstante, se denota una pérdida de biodiversidad importante, debido principalmente a una marcada destrucción de su hábitat y tráfico de especies por su alto valor comercial (Iturralde, 2015). Además de la contaminación ambiental y deforestación que se han sumado a los problemas de lento crecimiento y baja tasa de germinación en condiciones naturales (Mayo, Cazares, De la Cruz, & Flores, 2010), ya que se requieren asociaciones simbióticas principalmente con micorrizas para lograr una germinación eficiente en el medio natural (Yam & Arditti, 2009). Estos aspectos han dado como resultado que de 1710 especies de orquídeas ecuatorianas, el 2% se encuentran En Peligro

Crítico, 11% En Peligro y la gran mayoría se consideran Vulnerables (Endara & Jost, 2010).

En este contexto, el cultivo *in vitro* constituye una herramienta valiosa para la propagación masiva de orquídeas, produce altos niveles de multiplicación en periodos de tiempo cortos, además de obtener plantas libres de patógenos (Placencia, 2010). Por lo tanto, esta técnica se considera una alternativa para la reproducción a gran escala de estas especies ya sea con fines comerciales o conservacionistas, solventando las complicaciones de germinación y desarrollo en ambientes naturales.

Debido al proceso lento con que germinan las semillas de orquídeas, varias fitohormonas como auxinas, giberelinas, citoquininas, han sido añadidos en el cultivo *in vitro* para acelerar la germinación y desarrollo de la plántula (Hew & Clifford , 1993). Las fitohormonas actúan como mensajeros químicos interviniendo en la regulación celular en los procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas (Pérez, 2004, pág. 74). Una misma hormona puede participar en diferentes procesos, así como varias hormonas pueden intervenir en un mismo efecto y dependiendo de su concentración generar una respuesta estimuladora o inhibitoria (Cruz, Melgarejo, & Romero, 2010, págs. 39-40). Hooley (1994), indica que las giberelinas estimulan el crecimiento del embrión y germinación de semillas a través de la producción de hidrolasas que provocan la ruptura de la estructura alrededor del embrión. Mercier (2004), añade que las auxinas y citoquininas, de acuerdo a su interacción y disponibilidad, participan en la formación de raíces, brotes y callos. Pierik (1997, pág. 69) y Salisbury y Ross (2000, pág. 572), se refieren al ácido indol butírico (IBA), como una de las auxinas más utilizadas, principalmente para la formación de raíces debido a que no causa efectos fitotóxicos, además no inhibe el crecimiento

caulinar. Las citoquininas tipo adenina, como la kinetina y la 6-benciladenina, favorecen a la iniciación o crecimiento de yemas adventicias y axilares, inhiben la formación de raíces, inducen al crecimiento de callos y maduración de embriones somáticos (Pérez, 2004, pág. 79).

Por consiguiente, la investigación de protocolos para el uso de fitohormonas en orquídeas a nivel *in vitro*, posee una enorme importancia tanto a nivel comercial como conservacionista, pues mediante las técnicas de cultivo de tejidos se proyecta la obtención de plántulas a gran escala y con el uso de fitohormonas se pretende optimizar el proceso, incrementando la tasa de germinación, mediante el uso de giberelinas y el desarrollo de la plántula con la adición tanto de auxinas como de citoquininas. Las especies *Epidendrum jamiesonis*, *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium ornithorhynchum* poseen un particular interés en el desarrollo de esta investigación, debido a su exuberante belleza, importancia económica y grado de endemismo; así por ejemplo *Epidendrum jamiesonis* fue declarada la orquídea emblemática de la ciudad de Quito en el año 2014 (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2014), *Epidendrum schistochilum* es considerada una planta nativa andina y amazónica del Ecuador (Jørgensen & León-Yáñez, 1999, pág. 666) y *Oncidium ornithorhynchum* posee una inflorescencia piramidal que cautiva (Jiménez & Hádsater, 2010).

El objetivo principal de este estudio fue determinar la concentración ideal de las fitohormonas en el cultivo *in vitro* de las especies de orquídea mencionadas, para lo cual se parte de un ensayo para la calibración de concentraciones de las hormonas en semillas de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*), pues esta especie presenta disponibilidad de semillas certificadas, que garantizan la homogeneidad de resultados, además posee

tiempos de germinación cortos, que permiten definir concentraciones referenciales para su posterior aplicación en orquídeas y por ende establecer resultados en el uso de giberelinas en la dinámica de la germinación de semillas, con el fin de obtener una tasa de germinación elevada a una concentración determinada y por consiguiente un número de individuos o protocormos representativos, que puedan ser utilizados en la definición de la concentración ideal de auxinas, para la formación de raíces y citoquininas para el desarrollo de yemas foliares; además de determinar el punto de equilibrio en la concentración de auxinas-citoquininas, permitiendo tanto el crecimiento en longitud radicular como foliar.

En concordancia con la curva de crecimiento referencial y los estudios citados se proponen las siguientes hipótesis alternativas:

El uso de una de las concentraciones de ácido giberélico de la curva de referencia, promueve un incremento significativo en la tasa de germinación de semillas de orquídea de las especies estudiadas.

El empleo de una de las concentraciones de la combinación auxina-citoquinina de la curva de referencia, favorece un incremento significativo en la longitud de las raíces y formación de yemas foliares.

Marco conceptual

Capítulo 1

1.1 Las orquídeas

La familia Orchidaceae presenta variedades casi infinitas de colores, formas y perfumes, se han descrito alrededor de 27801 especies, 899 géneros tanto terrestres como epífitos y miles de híbridos (The Plant List, 2013). En la naturaleza se pueden encontrar plantas tan pequeñas que cabrían en un dedal a plantas de hasta 12 metros de altura (Ecuagenera, 2009, pág. 1).

En el Ecuador las orquídeas son consideradas como la familia más diversa de plantas vasculares, pues por cada cinco especies de plantas vasculares una es orquídea (Pitman, Valencia, & León-Yáñez, 2000). Debido al gran número de especies existentes y a su capacidad adaptativa, éstas han colonizado cualquier rincón del planeta, desde Alaska al norte hasta Tierra del Fuego al sur, únicamente en zonas desérticas extremas como los polos, no se las puede apreciar de forma natural (Tobar, 2009, pág. 4). En los trópicos de ambos hemisferios predominan las especies epífitas, en zonas templadas con menor número de especies se pueden observar especies terrestres (Ecuagenera, 2009, págs. 11-12).

Según Endara, Williams y León-Yáñez (2010), en el Ecuador existen aproximadamente 4032 especies de orquídeas constituyendo el 20% de la riqueza florística del país; a su vez, señalan que 1710 especies son endémicas. Endara y León-Yáñez (2006), mencionan que los géneros con más número de especies endémicas en el país, son: *Lepanthes*, *Pleurothallis*, *Stelis*, *Epidendrum* y *Masdevallia*.

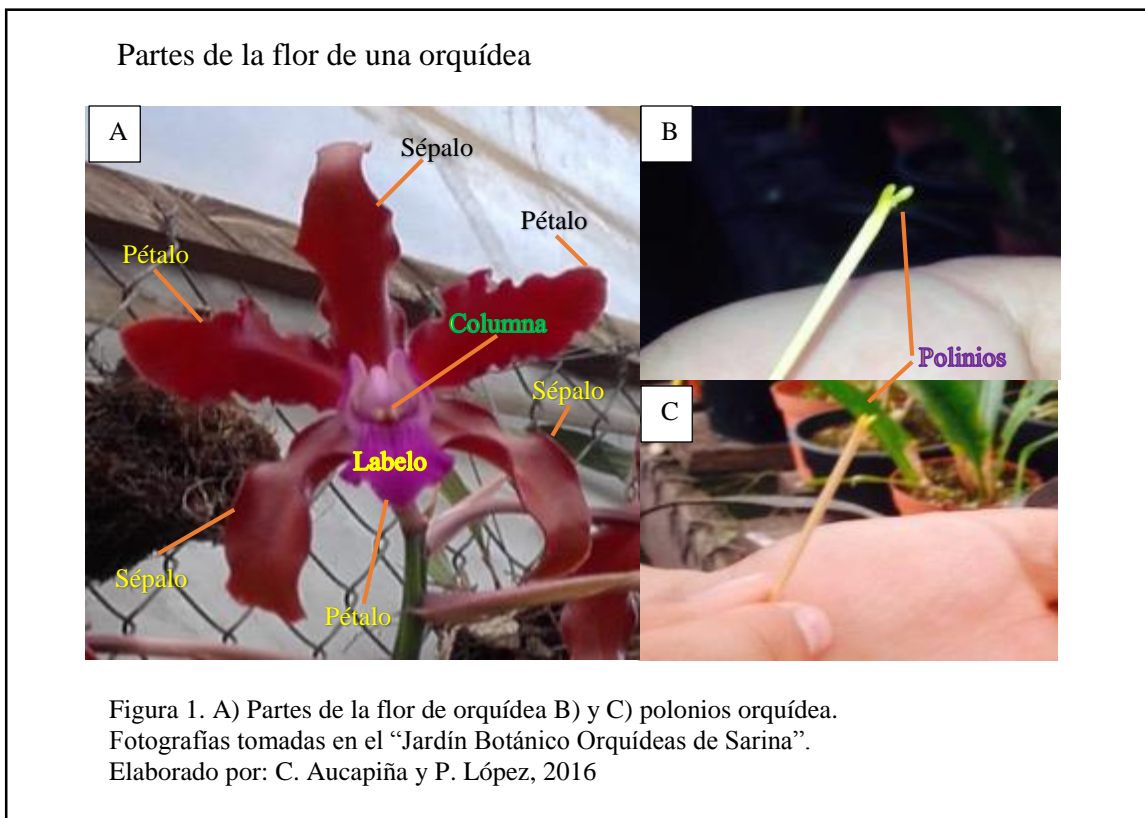
1.1.1 Ecología de las orquídeas

La mayoría de orquídeas son epífitas, se encuentran en mayor abundancia y diversidad en bosques nubosos y húmedos, en menor cantidad en bosques secos, estacionales y hábitats montanos (Dressler, 1993, págs. 24-27). La ventaja del hábito epífita es la resistencia a la desecación gracias a estructuras especializadas, como el velamen en la raíz, que absorbe agua y los pseudobulbos que la almacenan, esto permite el desarrollo de las orquídeas en zonas con pocos nutrientes, luz limitada y drenaje de agua limitado (Abdelnour & Muñoz, 1999). En la naturaleza, la mayoría de orquídeas no pueden germinar sin un hongo simbiótico, el cual le permite digerir la materia orgánica y los hidratos de carbono para alimentar al embrión, debido principalmente a que la semilla es muy pequeña y a su vez carece de endospermo, lo que imposibilita el almacenamiento de nutrientes, generalmente en la naturaleza un género de orquídeas es específico para un género de hongos (Dressler, 1993, págs. 24-27).

1.1.2 Descripción botánica y morfológica de la Familia Orchidaceae

Las orquídeas son plantas herbáceas, epífitas, litófitas, terrestres, en ocasiones trepadoras y a veces saprófitas (Lecoufle, 2006). Sus raíces le permiten realizar fotosíntesis a través del velamen. El tallo puede ser de tres tipos principales: cilíndricos, pseudobulbos o cormos (Menchaca & Moreno, 2011). Los pseudobulbos almacenan agua y es de donde emergen las hojas. Sus hojas según su disposición pueden ser verticiladas, opuestas, alternas, dísticas y de acuerdo a su forma son ovaladas o lanceoladas, su base es abrazadora y su vaina es en la mayoría de las veces cerrada (Caneva, 1994). Las flores de las orquídeas (figura 1), generalmente son hermafroditas o bisexuales presentan simetría bilateral, constan de tres pétalos y tres sépalos. El pétalo de la parte media está modificado

y recibe el nombre de labio o labelo (Dressler, 1982, pág. 22). Posee un desarrollo peculiar, adoptando formas y aspectos variados, su función es la de atracción a los insectos polinizadores (Menchaca, 2011, pág. 10). El gineceo y androceo se encuentran ubicados en una estructura llamada columna, que contiene el polen en su parte alta, agrupado en dos masas denominadas polinios (Asociación por la Naturaleza Extremeña, 2006). Las flores a su vez pueden formar inflorescencias que normalmente son racemosas con flores axilares, generalmente la floración parte de la base hacia arriba (Dressler, 1982, pág. 22). El fruto de la orquídea es nombrado como cápsula, dividido en tres en su interior, pueden ser largos, redondos u ovalados. Las semillas de orquídeas se encuentran por millones en la parte interior del fruto, pueden tener forma filiforme o fusiforme, su tamaño va desde micras hasta los 5 milímetros. Poseen una cubierta y embrión pero carecen de endospermo y su dispersión es a través del viento (Menchaca, 2011, pág. 14).



1.1.3 Clasificación taxonómica

Cronquist (1981) clasifica a las orquídeas (tabla 1), de la siguiente manera:

Tabla 1.

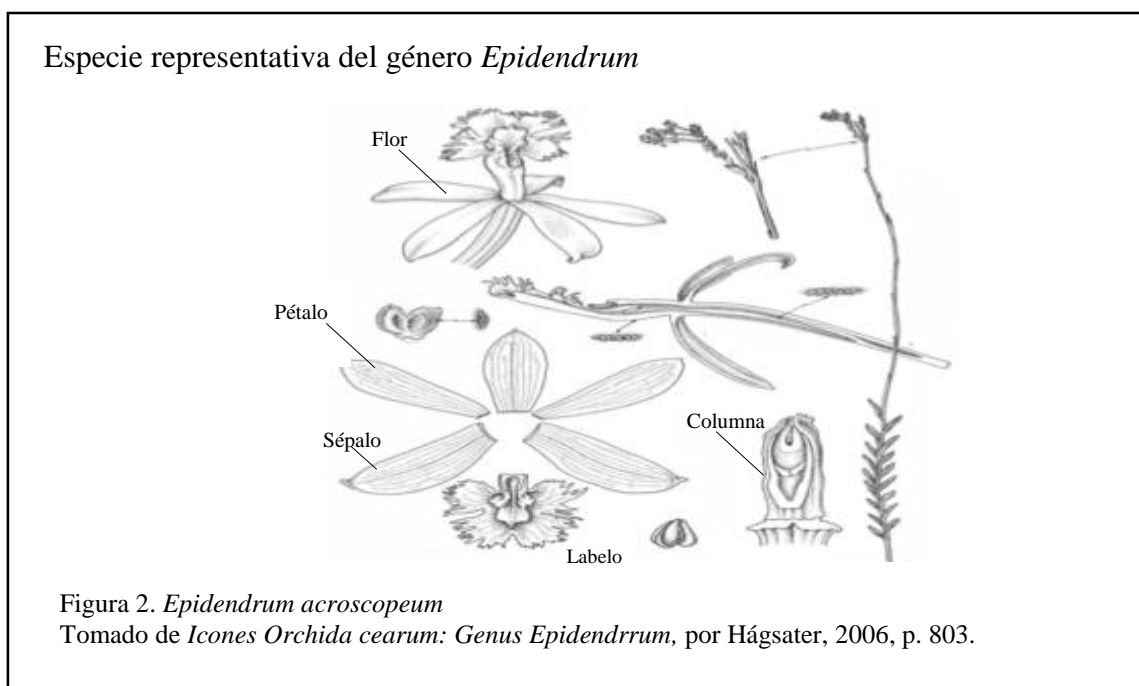
Clasificación taxonómica de las Orquídeas.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Orchidales o Aspargales
Familia:	Orchidaceae
Subfamilias:	Apostasioidae Cypripedioideae Epidendroideae Orchidoideae Vanilloideae

Nota: Adaptado de Angiosperm Phylogeny, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, (2013).

1.2 Género *Epidendrum*

El género *Epidendrum* (figura 2), está constituido por plantas herbáceas epífitas o litófitas, tallos por lo común tipo caña, simples o ramificados, en pocas ocasiones forman pseudobulbos; hojas dísticas distribuidas a lo largo del tallo o agrupadas cerca del ápice con inflorescencia terminal, racemosa, corimbosa o paniculada; flores pequeñas a grandes de diversos colores; pétalos generalmente más angostos que los sépalos los cuales se encuentran libres, labelo adnado a la parte ventral de la columna; fruto generalmente en forma de cápsula elipsoide, con o sin pedicelo, generalmente áptera (García, Sanchez, Jiménez, & Solano, 2003).



1.2.1 Distribución y Hábitat

Epidendrum es uno de los géneros más diversos de orquídeas en la zona tropical del continente Americano, cuenta con alrededor de 1500 especies que se han adaptado a los diferentes pisos climáticos desde el nivel del mar hasta los 3500 metros de altura (García, Sanchez, Jiménez, & Solano, 2003). Según Hágsater (2006), en Ecuador se registran 205 especies de este género con carácter endémico, de naturaleza diversa y variada en cuanto a preferencias de hábitat, sistemas reproductivos y tipos de polinización.

1.2.2 *Epidendrum jamiesonis*

Se localiza en Ecuador y Colombia a una altitud entre los 2000 y 3500 msnm, fue descubierta por William Jameson en la provincia de Pichincha en la ciudad de Quito. Posee un grado de adaptación que le permite crecer, tanto en un medio terrestre como

epífita, se caracteriza por sus tallos quebradizos y por la tonalidad púrpura de sus flores (figura 3) (Tobar, 2009, pág. 112).

En diciembre del 2014, esta especie fue declarada la orquídea emblemática de la ciudad de Quito, capital del Ecuador, mediante la Resolución N° 784 del Consejo Metropolitano de Quito, que hace hincapié a varios artículos de la Constitución y reconoce el respeto a la existencia y preservación de especies naturales con valor ambiental, científico, cultural y paisajístico (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2014).

Floración de *Epidendrum jamiesonis*



Figura 3. *Epidendrum jamiesonis*. Fotografía tomada en el “Jardín Botánico Orquídeas de Sarina”, por C. Aucapiña y P. López, 2016.

1.2.3 *Epidendrum schistochilum*

Planta epífita monopodial, de tallo verde que puede medir hasta 2 metros de longitud, hojas discoloras cartáceas; inflorescencia umbeliforme; flores no resupinadas con sépalos, pétalos y labelo de color blanco (figura 4), la columna presenta una tonalidad verde amarillenta (Valencia, 2013). Se encuentra principalmente en las provincias de Bolívar y Sucumbíos, es considerada una planta nativa andina y amazónica del Ecuador, su

crecimiento se mantiene a una temperatura de cálido a frío y la floración se produce generalmente en primavera (Jørgensen & León-Yáñez, 1999, pág. 666).

Floración de *Epidendrum schistochilum*



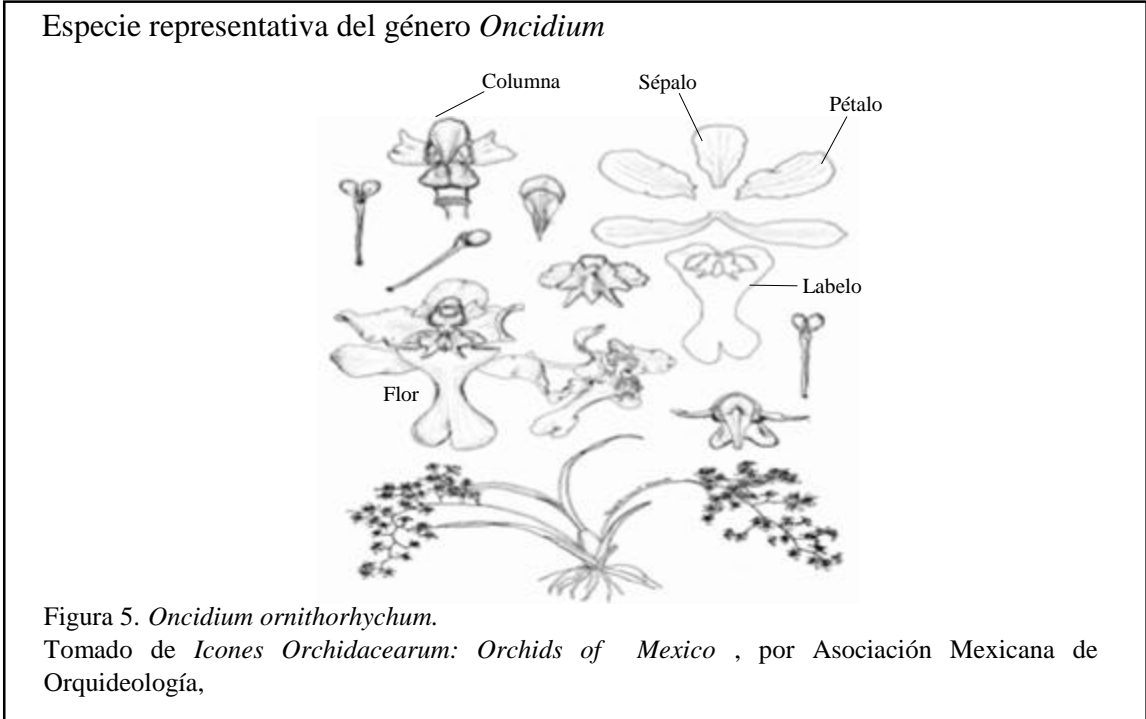
Figura 4. Floración Fotografía tomada en vía a Pillaro, Provincia de Tungurahua, por: C. Aucapiña y P. López, 2016.

1.3 Género *Oncidium*

Las especies del género *Oncidium* (figura 5) presenta tallos delgados, engrosados y largos o pseudobulbos, que pueden ser mono o bifoliados, con flores solitarias o inflorescencias tanto simples como compuestas; el labelo forma un ángulo recto con la columna que por lo común es bastante extendido, presenta un callo de diferentes formas en su base y un par de elaboradas alas a los lados del estigma (Tobar, 2009, pág. 203).

1.3.1 Distribución y Hábitat

El género *Oncidium* comprende alrededor de 440 especies, de las cuales 127 son endémicas, se distribuye en toda América tropical y el Caribe, desde el nivel del mar hasta los 4000 metros, crece tanto en zonas secas como en zonas húmedas, generalmente epífitas, aunque algunas especies son terrestres o litófitas (Tobar, 2009, pág. 203).



1.3.2 *Oncidium ornithorhynchum*

Son plantas epífitas propias de los páramos que crecen de los 2850 a los 3340 metros de altitud, se caracterizan por la inflorescencia erecta en forma de pirámide, con alrededor de 90 a 100 flores; los sépalos espatulados, columna reflexa con las alas erectas, angostamente cuneadas, con el ápice bilobado (Jiménez & Hádsater, 2010). En la figura 6 se puede observar la flor de esta especie.



1.4 Cultivo *in vitro* de orquídeas

Según Roca y Mroginski (1991), el cultivo *in vitro* de tejidos comprende una diversidad de técnicas, mediante las cuales un explante (protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio químico de composición definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Las técnicas de propagación *in vitro* han sido ampliamente utilizadas para la conservación de las especies de orquídeas amenazadas o en peligro de extinción (Arditti & Krikorian, 1996), pues mediante la utilización de diversas técnicas se pueden obtener un gran número de plantas libres de patógenos (Souza, Costa, Santos-Serejo, Junghans, & Souza, 2006). Desde el desarrollo del método para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas ideada por Knudson (1946), las técnicas de cultivo de tejidos se han utilizado para la propagación a gran escala de un gran número de especies de orquídeas y sus híbridos (Rao, 1977); (Arditti & Ernst, 1993, pág. 19). Desde entonces se han estudiado una serie de protocolos con diferentes medios de cultivo, sales y reguladores de crecimiento, utilizando toda la planta como fuente de explante (Arditti, 1977).

Araujo y otros (2006), Nogueira y otros (2005), mencionan que la micropropagación *in vitro* de semillas de orquídea se presenta como una opción eficiente para la propagación de estas especies, debido a que prácticamente todas las semillas de la cápsula se utilizan y a partir de estas se consigue una regeneración de plantas adultas.

La germinación *in vitro* de orquídeas inicia con la absorción de agua a través de la testa, lo que provoca la hinchazón del embrión y la tonalidad verde que toma la semilla (Mitra, Prasad, & Choudhury, 1976). Seguido por la división celular que estimula la ruptura de la testa y da lugar a la formación de una estructura esférica llamada protocormo, el cual

da origen a una protuberancia conocida como primordio foliar en su parte superior, mientras que en su base se forman rizoides que son características propias de la familia Orchidaceae. Estas estructuras a su vez se desarrollaran en hojas fotosintéticas y raíces respectivamente, dando lugar a la formación de una planta completa (Rodríguez, 2013).

1.5 Viabilidad de semillas de orquídea

Según Arditti y Ernst (1993, pág. 19), la evaluación de la viabilidad de las semillas de orquídea es importante para determinar su grado de conservación y así definir muestras óptimas para el cultivo *in vitro*, considerando el tamaño microscópico de algunas especies y el desarrollo de un embrión inmaduro sin endospermo. La prueba de tetrazolio es ampliamente utilizada para determinar la viabilidad de semillas, mediante la coloración rojo a naranja que presenta el embrión considerado viable (Pritchard & Prendergast, 1990). No obstante, Hosomi, Custódio, Seaton, Marks y Machado (2012); mencionan que un pretratamiento con solución de sacarosa al 10% aumenta la precisión de la prueba de viabilidad.

1.6 Medios de cultivo para orquídeas

Un medio de cultivo estándar habitualmente posee sales minerales, una fuente de carbono, reguladores de crecimiento, algunas vitaminas, aminoácidos y un agente gelificante (Smith, 2000, págs. 31-32). Existen varias formulaciones, que utilizan ingredientes básicos y otras que son específicas para determinada especie de orquídea, todas funcionan; pero es recomendable definir un medio de cultivo estándar y realizar modificaciones de acuerdo a las respuestas obtenidas *in vitro* y a la especie estudiada (Menchaca, 2011, pág. 45). Un medio relativamente sencillo es adecuado para la germinación, tal es el caso del

medio Knudson Modificado C o Murashige y Skoog, luego de la germinación es conveniente transferir los protocormos a un medio modificado o más concentrado, como por ejemplo un medio de Mantenimiento (Seaton & Ramsay, 2009). En la tabla 2 se observa la composición de los medios de cultivo mencionados.

Tabla 2.

Composición del medio M&S, Knudson C modificado y medio de Mantenimiento para Orquídeas.

Componentes (mg/L)	Murashige and Skoog basal salt mixture (MS)	Knudson C Modified	Orchid Maintenance Medium
(NH ₄)NO ₃	1 650,0		825
(NH ₄) ₂ SO ₄		500	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		694,4	
H ₃ BO ₃	6,2	0,056	3,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332,2		166
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025		0,0125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0624	0,0125
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,26		37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	25	27,85
MgSO ₄ ·7H ₂ O	180,6	122,25	90,35
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	5,682	8,45
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25		0,125
KI	0,83		0,415
KNO ₃	1 900,0		950
KH ₂ PO ₄	170	250	85
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,331	5,3
Orgánicos (mg/L)			
Carbón Activado		2 000	2 000
Agar			8 000
MES (ácido libre)			1 000
Mioinositol			100
Ácido Nicotínico			1
Peptona de carne			2 000
Clorhidrato de piridoxina			1
Sucrosa		20 000	20 000
Clorhidrato de tiamina			10
pH	3,9	4,7	5,3

Nota: Phyto Technology Laboratories, <http://phytotechlab.com/>, (2015).

1.7 Fitohormonas

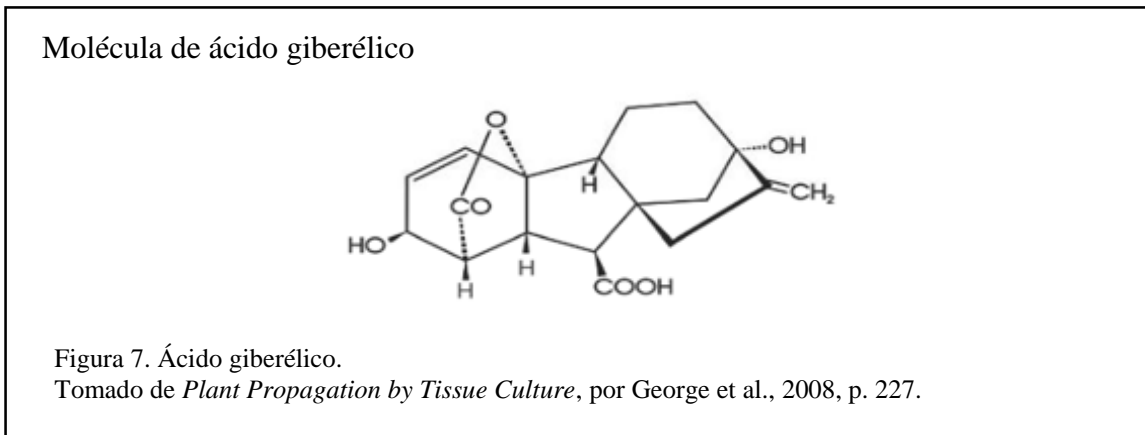
Las fitohormonas u hormonas vegetales actúan como mensajeros químicos interviniendo en la regulación celular en los procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas (Pérez, 2004, pág. 74). Ejecutan su acción de manera pleiotrópica, es decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos y dependiendo de su concentración puede generar una respuesta estimuladora o inhibitoria, además pueden intervenir en un mismo efecto y su respuesta ocurre en un tiempo determinado (Cruz, Melgarejo, & Romero, 2010, págs. 39-40). El tipo y concentración de los reguladores del crecimiento varía de acuerdo con el objetivo del cultivo celular (Smith, 2000, pág. 32).

1.7.1 Giberelinas

Las giberelinas son compuestos que influyen en una gran variedad de procesos del desarrollo de las plantas superiores (Taiz & Zeiger, 2006, pág. 884). Se conocen más de 100 moléculas, algunas son producidas por hongos (George, Hall, & De Klerk, 2008, pág. 227). Como se observa en la figura 7 todas las giberelinas derivan del esqueleto ent-giberelano, son ácidas y se las denominan con las siglas GA (ácido giberélico), tienen de 19 o 20 átomos de carbono, agrupados en cuatro o cinco anillos (Salisbury & Ross, 2000, pág. 586).

Según George et al., (2008, pág. 227), las giberelinas son conocidas por su capacidad de estimular la hiperelongación de tallos, la movilización de las reservas de endospermo durante el crecimiento temprano de embriones, así como la expansión de la hoja, la maduración del polen, floración y desarrollo del fruto. Hooley (1994), indica que las giberelinas estimulan el crecimiento del embrión y germinación de semillas a través de la producción de hidrolasas que provocan la ruptura de la estructura alrededor del

embrión. A nivel *in vitro* se utilizan en general para inducir el alargamiento de entrenudos y el crecimiento de los meristemas o brotes, romper la latencia de los embriones o semillas aisladas. Normalmente inhiben la formación de brotes adventicios, al igual que la formación de raíces adventicias (Pierik, 1997, pág. 71).



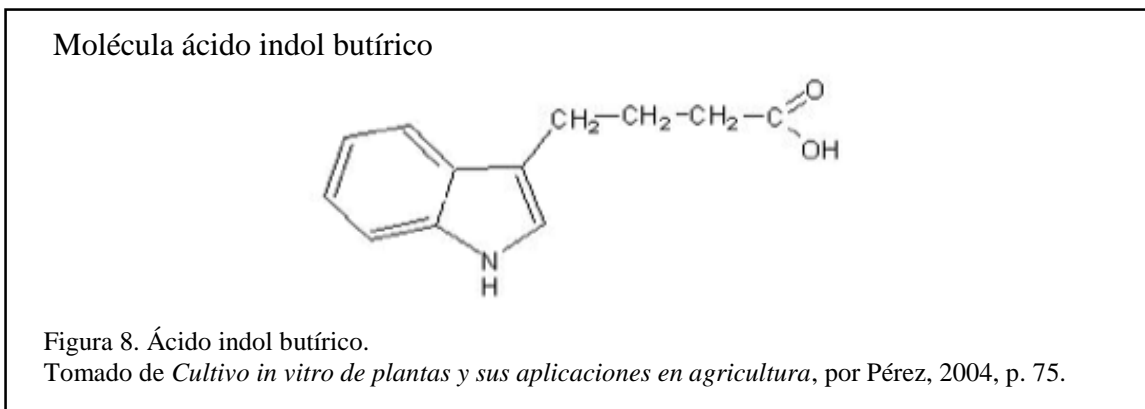
1.7.2 Auxinas

El término auxina proviene del griego *auxein* que significa aumentar, fue descubierta por Fritz Went en 1926, como el compuesto causante de la curvatura hacia la luz de los coleóptilos en la avena (Salisbury & Ross, 2000, pág. 571). Es la hormona vegetal por excelencia; fue la primera en ser descubierta y se encuentra sintetizada en las regiones meristemáticas y otros órganos en crecimiento activo como ápices, coleóptilos, puntas de las raíces, las semillas germinadas y las yemas apicales (Hopkins & Hüner, 2008).

Según Bhojwani y Dantu (2013), las auxinas están involucradas con muchos procesos de desarrollo de las plantas, incluyendo elongación del tallo y entrenudos, tropismos, dominancia apical, la abscisión y enraizamiento. Además, estas controlan las reacciones de fototropismo y gravitropismo. Las auxinas sintéticas como el ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (NAA) se han utilizado para promover el crecimiento y desarrollo

de la raíz, favorecer la floración uniforme, prevenir la caída prematura de frutos y como herbicidas (Weaver, 1972).

En el cultivo de tejidos se utilizan generalmente el ácido indol acético (IAA), el ácido indol butírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA), ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D), para la obtención de diversas respuestas como la inducción y cultivo de callos, formación de embriones somáticos, inducción a división celular, controlar la organogénesis, inducción y mantenimiento de células vegetales en suspensión, entre otros (Pérez, 2004, pág. 76). Las auxinas son termoestables a 110-120°C durante un máximo de 1 hora; sin embargo IAA es destruido por un pH bajo, luz y por exposición a óxidos y peróxidos, las auxinas sintéticas son más estables que las naturales (Smith, 2000, pág. 35). En la figura 8 se visualiza la molécula de ácido indol butírico.



1.7.3 Citoquininas

Según George y colaboradores (2008, pág. 205), la kinetina fue la primera citoquinina en descubrirse, aislada en el laboratorio del profesor Skoog en la Universidad de Wisconsin, después de experimentos para promover el continuo crecimiento del callo en las secciones de tallo de tabaco en medios de cultivo. En 1976 se propuso el nombre de quinina para

compuestos que inducían la división celular (Miller, Skoog, Okomura, von Saltza, & Strong, 1956). Sin embargo este nombre fue sustituido por el de citoquinina, que ahora es aceptado para describir compuestos con actividad de división celular (citocinesis) en las plantas (Skoog, Strong, & Miller, 1965).

Estas hormonas ayudan a regular diversas respuestas en las plantas en combinación con otras fitohormonas, como la germinación de semillas, formación de yemas, la liberación de brotes de la dominancia apical, expansión hojas y cotiledones, el desarrollo reproductivo, fotosíntesis y la senescencia (Brzobohaty, Moore, & Palme , 1994).

Las citoquininas tipo adenina, como la kinetina [N- (2-furilmetil) -3H-purin-6-amina] (figura 9) y la 6-benciladenina, son utilizadas para producir trasplantes en el cultivo de tejidos (Rademacher, 2015), pues favorecen a la iniciación o crecimiento de yemas adventicias y axilares, inhiben la formación de raíces, además inducen al crecimiento de callos y también a la maduración de embriones somáticos (Pérez, 2004, págs. 79-80).

Según Smith (2000, pág. 36), la kinetina y zeatina son termoestables, no se ha detectado degradación del compuesto después de 1 hora a 120°C, mientras que la 6-benciladenina es estable durante 20 minutos a 100°C.

Molécula de kinetina

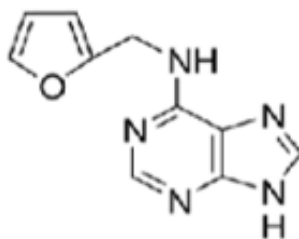


Figura 9. Kinetina.

Tomado de *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction*, por Davies, 2010, p. 95.

1.7.4 Relación Auxina-Citoquinina

Skoog y Miller (1957), encontraron que la formación de brotes puede ser inducida a partir de callos de tabaco, utilizando en el medio de crecimiento niveles relativamente bajos de auxina y un alto nivel de citoquinina. De acuerdo con George y colaboradores (2008, pág. 219), a partir de este descubrimiento, se ha encontrado que la interacción entre las concentraciones de citoquinina y auxina controla muchos aspectos de la diferenciación celular y la organogénesis en cultivos de tejidos.

Según Taiz y Zeiger (2006), “las relaciones altas de auxina-citoquinina estimula la formación de raíces, valores bajos de esta relación dan lugar a la formación de tallos. A niveles intermedios el tejido crece como un callo indiferenciado” (pág. 967).

George y otros (2008, pág. 219) mencionan que el equilibrio entre la auxina y citoquinina se usa más a menudo para la formación de brotes y raíces adventicias; además la concentración necesaria de cada tipo de regulador difiere mucho según el tipo de planta que se cultiva, las condiciones del cultivo y los compuestos utilizados, haciendo estas interacciones muy complejas y llegando a la conclusión de que posiblemente existan más de una combinación de estas sustancias para producir resultados óptimos.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Localización

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana, Quito; las muestras de material vegetal de las especies *Epidendrum jamiesonis*, *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium ornithorhynchum*, las cuales se codificaron con E15, E2 y O1 respectivamente, fueron recolectadas en el Jardín Botánico y vivero comercial “Orquídeas de Sarina” ubicado en la parroquia de El Quinche, Cantón Quito, bajo la patente N° 006-2015-FLO-DPAP-MA (anexo 1).

El tiempo empleado para el desarrollo de esta investigación fue siete meses, dos de ellos se emplearon en la obtención de la muestra vegetal y la calibración de concentraciones de hormonas en semillas de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*), dicha especie fue escogida para la calibración de la concentración de las fitohormonas, debido a la disponibilidad de semillas certificadas, velocidad de germinación, homogeneidad en los resultados y referencia de protocolos en experiencias similares. El establecimiento del uso de giberelinas en orquídeas a nivel *in vitro* tomó un periodo de dos meses y para la determinación de concentraciones ideales de auxina y citoquinina y el punto de equilibrio auxina-citoquinina se emplearon 3 meses.

2.2 Ensayo para la calibración de concentraciones de fitohormonas

Con el objetivo de establecer una curva de crecimiento referencial que posteriormente sea probada en la germinación y desarrollo *in vitro* de orquídeas, se procedió a la calibración de concentraciones de giberelina, auxina y citoquinina usando productos comerciales y

semillas de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) de la empresa ALASKA con el 99,99% de germinación (anexo 2).

2.2.1. Calibración de concentraciones de ácido giberélico

Con el fin de establecer la concentración ideal a la que las semillas presentan su máximo porcentaje de germinación, se preparó una solución madre de 20 mg/L a partir del producto comercial New Gibb 10SP, que posee como elemento principal ácido giberélico (GA₃) al 10%. Se pesó 0,2 g del principio activo en 1 mL de alcohol al 96% y se aforó a 1 litro con agua destilada. A partir de esta solución madre de concentración 20 mg/L se prepararon los tratamientos que se muestran en la tabla 3, que fueron aplicados en semillas de tomate riñón ALASKA, para lo cual se colocaron 10 semillas de tomate en envases plásticos de polietileno con discos de papel absorbente, se colocó 5 mL de cada concentración de hormona y un testigo con 5 mL de agua y se dejó en incubación a 25°C por 3 días en oscuridad. Se realizaron tres repeticiones para cada concentración.

Tabla 3.
Tratamientos con ácido giberélico.

N°	Tratamientos	
	Concentración GA ₃ (mg/L)	
1 (testigo)	G0	0
2	G1	0,001
3	G2	0,005
4	G3	0,05
5	G4	0,1
6	G5	0,2
7	G6	0,4

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 7 tratamientos y 3 repeticiones de cada unidad experimental. Considerándose como unidad experimental a un envase

plástico de polietileno con 10 semillas de tomate riñón ALASKA con un porcentaje de germinación del 99,99%.

2.2.2 Calibración de concentraciones de Auxina

Con el objetivo de determinar la concentración de auxina en que se produce la mayor longitud de la raíz, se preparó una solución madre de 20 mg/L, para lo cual se pesó 0,02 g de IBA 98%, se diluyó en 1 mL de alcohol al 96% y se aforó con agua destilada a un volumen de 1 litro, a partir de esta solución se prepararon los tratamientos que se observan en la tabla 4. Se colocó 5 mL de cada concentración en una muestra de 10 semillas contenidas en envases plásticos de polietileno con discos de papel absorbente y un testigo con 5 mL de agua destilada. El ensayo se realizó por triplicado y el reporte se efectuó luego de 8 días, tiempo en que las muestras permanecieron en oscuridad a 25°C.

Tabla 4.
Tratamientos con ácido indol butírico.

N°	Tratamientos	
	Concentración IBA (mg/L)	
1 (testigo)	A0	0
2	A1	1,5
3	A2	3
4	A3	5
5	A4	7,5
6	A5	10

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 6 tratamientos y 3 repeticiones de cada unidad experimental. Considerándose como unidad experimental a un envase plástico de polietileno con 10 semillas de tomate riñón ALASKA con un porcentaje de germinación del 99,99%.

2.2.3 Calibración de concentración de Citoquinina

Con el objetivo de determinar la concentración ideal a la cual se observa mayor crecimiento en longitud de las plántulas de tomate riñón ALASKA, se empleó el producto comercial CYTOKIN cuyo principio activo es kinetina basado en actividad biológica del 0,01%. Se preparó una solución madre de concentración 5 mg/L para lo cual se midió 50 mL del producto comercial y se aforó a 1 litro de agua destilada, a partir de esta solución se prepararon los tratamientos que se visualizan en la tabla 5. Luego se añadió 5 mL de cada solución en una muestra de 10 semillas germinadas en envases plásticos de polietileno con discos de toallas de papel y un testigo con 5 mL de agua destilada. El ensayo se realizó por triplicado y el reporte fue a los 8 días, tiempo en que las muestras permanecieron en oscuridad a 25°C.

Tabla 5.
Tratamientos con kinetina.

N°	Tratamientos	
	Concentración Kin (mg/L)	
1 (testigo)	C0	0
2	C1	0,0025
3	C2	0,01
4	C3	0,1
5	C4	0,4
6	C5	1,5

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 6 tratamientos y 3 repeticiones de cada unidad experimental. Considerándose como unidad experimental a un envase plástico de polietileno con 10 semillas de tomate riñón ALASKA con un porcentaje de germinación del 99,99%.

2.2.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia de Duncan al 5% para las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

2.2.5 Variables y métodos de evaluación

Se detallan las variables dependientes con sus respectivas variables independientes

- Concentración de ácido giberélico: Porcentaje de germinación
- Concentración de IBA: Longitud de la raíz
- Concentración de kinetina: Longitud de la plántula

El método de evaluación utilizado en giberelina consistió en el conteo de semillas viables vs. no viables y determinación del porcentaje de germinación mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación (G)} = \frac{\text{\# semillas germinadas}}{\text{\# total de semillas}} \times 100$$

Tomado de *Natureza on line* por V. Leite y S. Helbling, 2007, p 59.

En el caso de IBA y kinetina se realizó la determinación de resultados a los 8 días de observación, midiendo la longitud de la raíz y de la plántula con la utilización de una regla graduada en centímetros.

2.3 Establecimiento del uso de giberelinas en la dinámica de germinación de semillas de orquídea a nivel *in vitro*

Para establecer un cultivo *in vitro* se deben tomar en cuenta ciertos parámetros que garantizarán el éxito del cultivo; en el caso de orquídeas es necesario determinar el grado de conservación de las semillas y por ende su viabilidad, además de establecer los medios de cultivo idóneos para el ensayo y asegurar la inocuidad, tanto del explante como del

medio ambiente donde se va a trabajar. Por consiguiente, en esta etapa se optó por la siguiente metodología.

2.3.1 Obtención de la muestra y análisis de viabilidad

Se tomaron cápsulas cerradas de las especies *Epidendrum jamiesonis* (E15), *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Oncidium ornithorhynchum* (O1), del Jardín Botánico “Orquídeas de Sarina”. El material vegetal fue colocado en bolsas de papel y llevado al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana, para el análisis de viabilidad.

Se utilizó la prueba de tetrazolio descrito por Hosomi y colaboradores (2012), para lo cual se pesó de 3 a 5 mg de semillas y se colocó en microtubos de 1,5 mL a los cuales se añadieron 1,5 mL de solución de sucrosa al 10% y se dejó en reposo a 25°C por 24 horas. Pasado ese lapso de tiempo y mediante la utilización de una micropipeta se desechó la solución de sucrosa y se agregó 1 mL de solución de tetrazolio al 1%, las muestras se colocaron en incubación a 40°C por 24 horas. Para la observación de las semillas al microscopio se reemplazó la solución de tetrazolio por agua destilada y para determinar el porcentaje de germinación se realizó un conteo de semillas viables vs. no viables.

2.3.2 Preparación del medio de cultivo

Para la siembra de semillas de las especies *Epidendrum jamiesonis* (E15), *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Oncidium ornithorhynchum* (O1), se utilizó el medio Knudson C Modificado Plus y para el desarrollo de los protocormos de las dos especies de *Epidendrum* se optó por el medio Orchid Maintenance Medium. La composición de los medios de cultivo se detalla en la tabla 2. Se dispensó 10 mL de medio de cultivo en tubos

de ensayo previo a la esterilización. Se selló con tapas de papel aluminio que fueron envueltas con film plástico y se autoclavó a 121 °C y 1,5 atm durante 15 minutos. El medio de cultivo Knudson C Modificado Plus se dejó solidificar inclinando los tubos de ensayo a 60° con el fin de ampliar la superficie de contacto de siembra.

2.3.3 Protocolo de desinfección

Para la desinfección de la cámara de flujo laminar se utilizó Sablón que actúa como desinfectante, luego se limpió con alcohol al 70% y se dejó en radiación UV por 15 minutos. Todo material que se introdujo en la cámara de flujo fue previamente rociado con alcohol al 70% para asegurar la asepsia; además, se colocaron todos los materiales dentro de la cámara, se dejó en radiación UV por 10 minutos y se activó el flujo de aire por 5 minutos. Menchaca (2011, pág. 41), propone el método del sobre cerrado para la desinfección de semillas, para este proceso se colocaron las semillas en sobres de papel filtro y se los sumergió en una solución de cloro al 3% + 1 gota de tween 20, por un tiempo de 6 minutos, luego se realizaron tres lavados por 5 minutos con agua estéril.

2.3.4 Aplicación de ácido giberélico en semillas de orquídea a nivel *in vitro*

Luego de realizado el protocolo de desinfección del explante, se procedió a la siembra de semillas en tubos de ensayo con medio Knudson C Modificado Plus. En esta investigación, se optó por colocar 130 µL de cada concentración de ácido giberélico (tabla 3), previamente esterilizadas por autoclavado en cada tubo de ensayo, con el fin de que la semilla absorba el agua con la hormona de manera directa. Se realizó tres repeticiones por cada concentración, más el testigo con 130µL de agua destilada estéril. Las muestras

permanecieron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una intensidad luminosa de 2000 lux durante 14 horas al día (Cerna & Tafur, 2009).

2.3.5 Diseño Experimental

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 3×7 , es decir 3 especies y 7 tratamientos con 3 repeticiones de cada unidad experimental. En esta etapa se estima como unidad experimental a un tubo de ensayo con 10 mL de medio Knudson C Modificado Plus con semillas de orquídea de las especies establecidas.

2.3.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, en los datos originales se realizó una transformación mediante la metodología [raíz cuadrada + 1 ($\sqrt{x+1}$)], con el objetivo de tener una distribución normal y reducir el coeficiente de variación. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia de Duncan al 5% para las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas. Para la variable especies se utilizó la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5%.

2.3.7 Variables y métodos de evaluación

- Variables independientes: Concentración de ácido giberélico y especies de orquídea
- Variable dependiente: Porcentaje de germinación

El reporte de resultados se realizó a los 30 días, para lo cual se colocaron los tubos de ensayo bajo un estéreo microscopio que permitió la contabilización de semillas germinadas. Para realizar la evaluación del porcentaje de germinación se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación (G)} = \frac{\text{\# semillas germinadas}}{\text{\# total de semillas}} \times 100$$

2.4 Definición de la concentración ideal de auxina y citoquinina en protocormos y establecimiento del punto de equilibrio auxina-citoquinina

Con el objetivo de establecer las concentraciones ideales tanto de auxina como de citoquinina en el cultivo *in vitro* de orquídeas, se prepararon las concentraciones que se observan en las tablas 4 y 5 a partir de soluciones madre de 20 mg/L para auxina y 5 mg/L para citoquinina, que fueron esterilizadas a 121 °C y 1,5 atm durante 15 minutos. Se trabajó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas tomándose protocormos de las especies *Epidendrum jamiesonis* (E15) y *Epidendrum schistochilum* (E2), de una edad promedio entre 30 y 45 días después de su siembra, se distribuyeron equitativamente nueve explantes en tres tubos de ensayo con el medio Orchid Maintenance Medium y se colocó 130 µL de las soluciones tanto de auxina y citoquinina esterilizadas.

Para la determinación del punto de equilibrio auxina-citoquinina se tomó como referencia las curvas de crecimiento en el ensayo de tomate riñón (tablas 4 y 5) y se establecieron 14 combinaciones como se observa en la tabla 6.

Nota: En este ensayo se evaluaron únicamente las especies *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum* puesto que presentaron similitud en cuando al desarrollo de los protocormos, se descartó la especie *Oncidium ornithorhynchum* pues a pesar que se logró visualizar el porcentaje de germinación bajo el estereomicroscopio, los protocormos no lograron desarrollarse al exponerse a las fitohormonas y se obtuvieron tasas de mortalidad del 100%.

Tabla 6.

Tratamientos para la determinación del punto de equilibrio auxina-citoquinina en protocormos.

Nº	Tratamientos	
	Concentración IBA x Kin (mg/L)	
1 (testigo)	A0C0	0 x 0
2	A5C1	10 x 0,0025
3	A4C2	7,5 x 0,01
4	A3C3	5 x 0,1
5	A2C4	3 x 0,4
6	A1C5	1,5 x 1,5
7	A5C3	10 x 0,1
8	A4C3	7,5 x 0,1
9	A2C3	3 x 0,1
10	A1C3	1,5 x 0,1
11	A3C1	5 x 0,0025
12	A3C2	5 x 0,01
13	A3C4	5 x 0,4
14	A3C5	5 x 1,5

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

2.4.1 Diseño experimental

Para la determinación de las concentraciones ideales de auxina y citoquinina se aplicó un DCA con arreglo factorial 2 x 6 (2 especies y 6 tratamientos) tanto para auxina como para citoquinina y un DCA con arreglo factorial 2 x 14 (2 especies y 14 tratamientos) para determinar el punto de equilibrio auxina-citoquinina. Se consideró como unidad experimental a cada protocormo, de 3 milímetros de diámetro, sin rizoides ni primordios foliares, obtenidos en el ensayo anterior. Se realizaron 9 repeticiones, considerándose como repetición a cada protocormo analizado de las especies *Epidendrum jamiesonis* (E15) y *Epidendrum schistochilum* (E2).

2.4.2 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, en los datos originales se realizó una transformación mediante la metodología [raíz cuadrada + 1 ($\sqrt{x+1}$)], con el objetivo de tener una distribución normal y reducir el coeficiente de variación. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia de Duncan al 5% para las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas. Para la variable especies se utilizó la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5%.

2.4.3 Variables y métodos de evaluación

Se presentan las variables independientes con sus respectivas variables dependientes de la siguiente manera:

- Especies de orquídeas: efecto en la longitud de raíz, longitud de brotes y número de brotes por acción de hormonas.
- Concentración de IBA: Longitud de la raíz.
- Concentración de kinetina: Longitud de brotes, número de brotes.
- Concentración de combinación de hormonas auxina-citoquinina:
Longitud de la raíz y de brotes, número de brotes.

El método de evaluación empleado se basa en la observación de las variables y el reporte de resultados se realizó a los 60 días de establecido el ensayo. Para medir las variables longitud de raíz y de brotes se utilizó una regla graduada en centímetros.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1 Ensayo para la calibración de concentraciones de fitohormonas

En el ensayo de calibración de hormonas se logró encontrar las concentraciones estimulantes e inhibitorias de ácido giberélico, IBA y kinetina.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA), para el porcentaje de germinación (anexo 3) por acción de ácido giberélico, se determinó que existen diferencias estadísticas altamente significativas al nivel de 5% entre las concentraciones establecidas, con un coeficiente de variación de 5,46%.

Según la prueba de Duncan al 5% (tabla 7) en tomate riñón, para el porcentaje de germinación se establecieron tres rangos de significancia. El primer rango está constituido por la concentración G4 (0,1 mg/L) que presenta el mayor porcentaje de germinación con un 96,67%, en comparación con las concentraciones que presentan el menor porcentaje de germinación G0 (0 mg/L), G1 (0,001 mg/L) y G6 (0,4 mg/L) que se encuentran en el último rango.

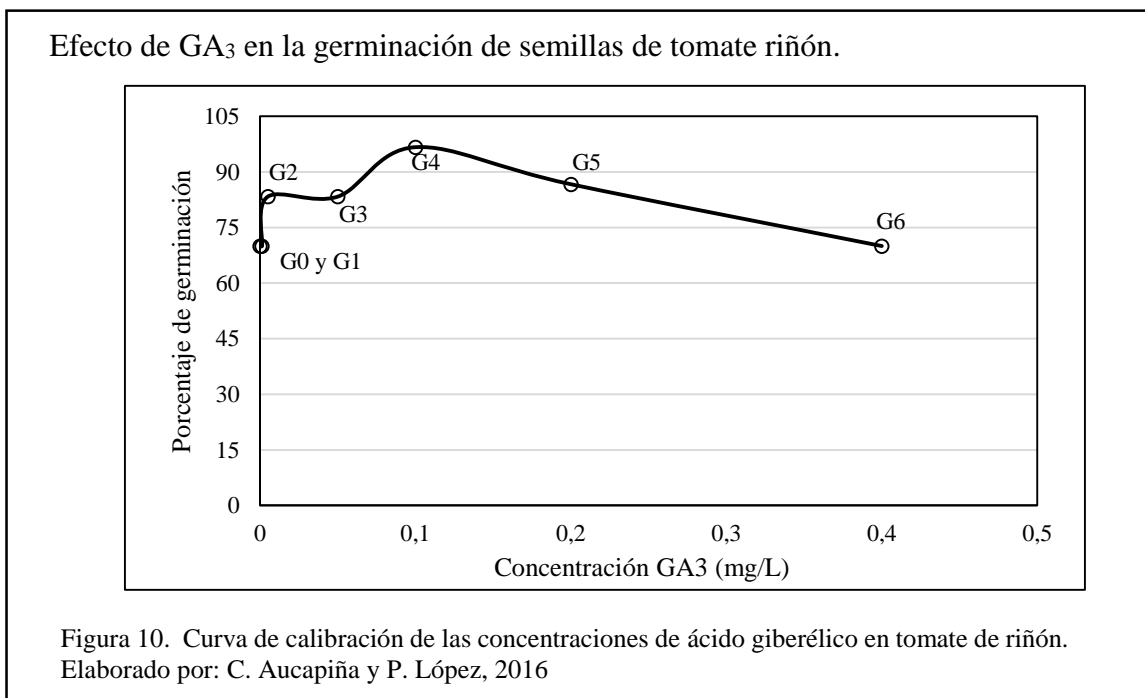
Tabla 7.

Prueba de Duncan al 5% en tomate riñón para porcentajes de germinación.

Tratamiento	Concentración GA ₃ (mg/L)	Medias (%)	Rangos
G4	0,1	96,67	a
G5	0,2	86,67	b
G3	0,05	83,33	b
G2	0,005	83,33	b
G6	0,4	70,00	c
G0 Testigo	0	70,00	c
G1	0,001	70,00	c

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

En la figura 10, se observa que el tratamiento con ácido giberélico G4 (0,1 mg/L) presentó los mejores resultados en cuanto a porcentaje de germinación con un 96,87%, por lo tanto se toma como concentración ideal de referencia para el estudio en orquídeas. Además, en las concentraciones G5 (0,2 mg/L) y G6 (0,4 mg/L) se inhibe el efecto deseado presentando porcentajes de germinación de 86,67 y 70% respectivamente, este último similar al testigo.



En el ensayo para la calibración de IBA y mediante el análisis de varianza (ANOVA) para la longitud de la raíz (anexo 4), se determinaron que existen diferencias estadísticas altamente significativas al nivel de 5% entre las concentraciones establecidas. El coeficiente de variación fue de 6,98%.

Según la prueba de Duncan al 5% (tabla 8), en tomate riñón, para la longitud de la raíz, se establecieron cinco rangos de significancia. En el primer rango se encuentra la concentración A3 (5 mg/L) que presentó el mayor crecimiento en cuanto a la longitud de

la radícula con un promedio de 6,73 cm. En el último rango se ubicó el tratamiento A5 (10 mg/L) con la menor longitud de la raíz con una media de 0,92 cm.

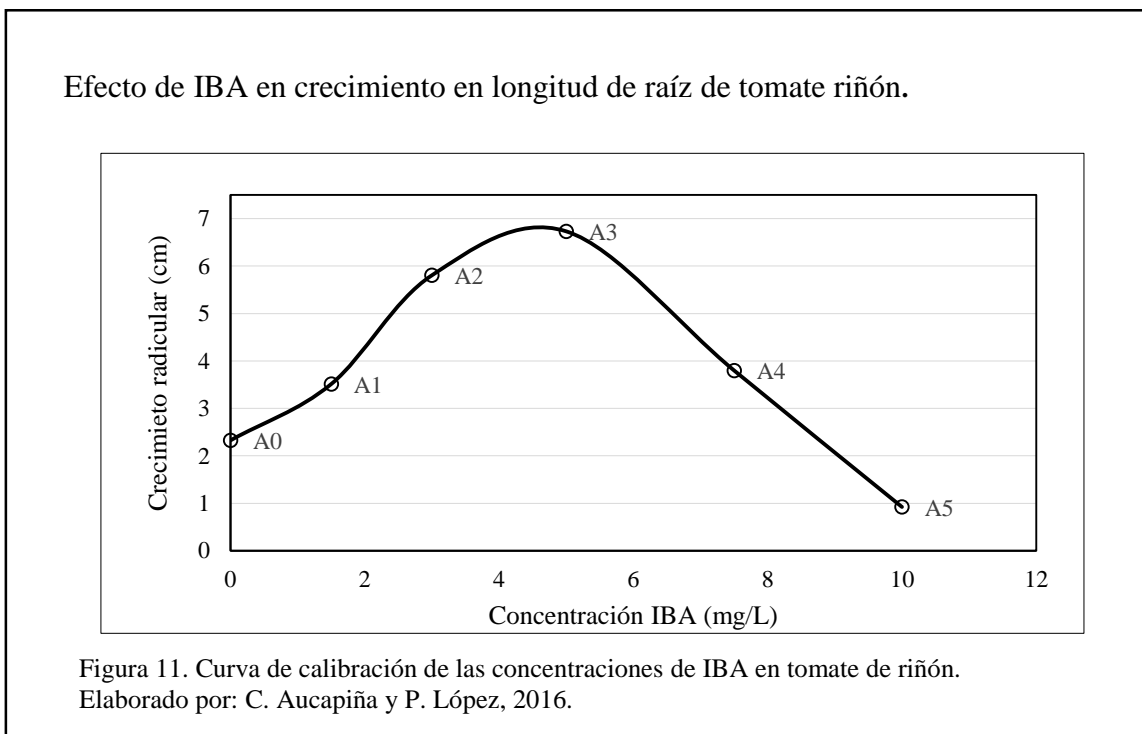
Tabla 8.

Prueba de Duncan al 5% en tomate riñón para longitud de raíz.

Tratamientos	Concentración de IBA (mg/L)	Medias (cm)	Rangos		
A3	5	6,73	a		
A2	3	5,81		b	
A4	7,5	3,80			c
A1	1,5	3,51			c
A0 Testigo	0	2,33			d
A5	10	0,92			e

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

En la figura 11, se muestra la curva de la variable longitud de la raíz por efecto de IBA, se determinó que la concentración ideal de referencia para el estudio en orquídeas es A3 (5 mg/L), además se observa que el tratamiento A5 (10 mg/L) presenta un carácter inhibitorio con una media de longitud radicular de 0,92cm , menor al testigo.



En el ensayo para la calibración de concentraciones de kinetina se observa que el análisis de varianza (ANOVA) para el crecimiento en longitud de las plántulas (anexo 5), presentó diferencias estadísticas altamente significativas al nivel de 5% entre las concentraciones establecidas. El coeficiente de variación fue de 7,86%.

Según la prueba de Duncan al 5% (tabla 9), en tomate riñón, para la variable longitud de plántulas, se establecieron cinco rangos de significancia. En el primer rango se encuentra la concentración C3 (0,1 mg/L) que presentó el mayor crecimiento en longitud de las plántulas con un promedio de 7,94 cm. En el último rango se ubicó el tratamiento C5 (1,5 mg/L) con el menor crecimiento con una media de 2,02 cm.

Tabla 9.

Prueba de Duncan al 5%, en tomate riñón para longitud de las plántulas.

Tratamientos	Concentración de Kin (mg/L)	Medias (cm)	Rangos			
C3	0,1	7,94	a			
C4	0,4	5,47		b		
C2	0,01	5,29		b		
C1	0,0025	4,35			c	
C0 Testigo	0	3,67				d
C5	1,5	2,02				e

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

En la figura 12 se visualiza el tratamiento C3 (0,1 mg/L) que constituye la concentración ideal de referencia para el ensayo en orquídeas; además la concentración C5 (1,5 mg/L) que presentó un efecto inhibitorio.

Efecto de Kin en crecimiento en longitud de plántulas de tomate riñón.

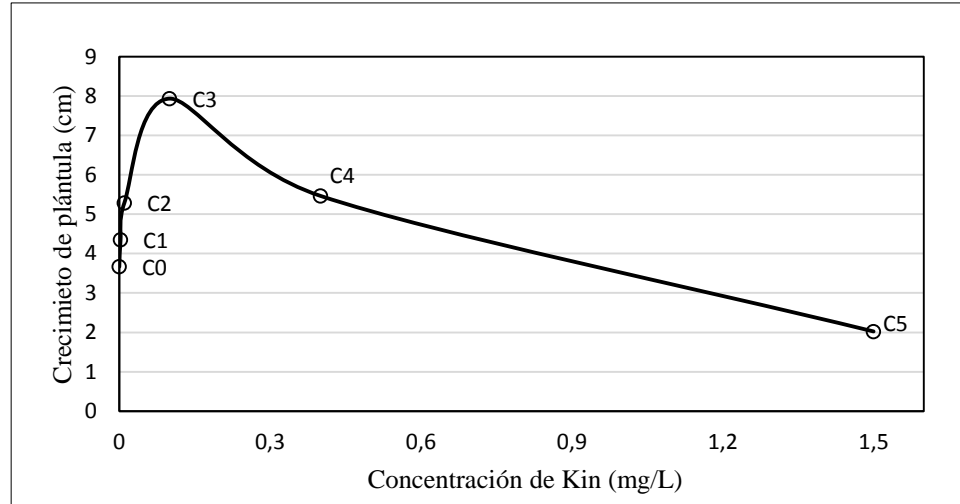


Figura 12. Curva de calibración de las concentraciones de kinetina en tomate riñón.
Elaborado por: C. Aucapiña y P. López.

3.1.1 Discusión

En este estudio se establece que el tratamiento G4 (0,01 mg/L) constituye la concentración ideal de referencia, pues presentó un porcentaje de germinación de 96,67%, a concentraciones superiores la variable analizada empieza a decrecer. Asimismo, Rossetto, Coneglian, Nakagawa, Shimizu y Marin (2000), obtuvieron un efecto inhibitorio en semillas de maracuyá inducido por las altas concentraciones de GA₃. Fraile, Álvarez-Herrera y Deaquiz (2012), alcanzaron un 100% de germinación en tomate riñón mediante la utilización de giberelinas, esto debido a que las giberelinas dan lugar a la germinación, a través de la activación del crecimiento vegetativo, el debilitamiento del endospermo y movilización del material almacenado en el mismo (Taiz & Zeiger, 2006, pág. 888).

Por otro lado en la calibración de concentración de auxina se utilizó IBA, para determinar la concentración ideal del crecimiento en longitud de la raíz, pues según Boutherin y Bron (1994), el ácido indolbutírico posee mala actividad auxínica pero cuenta con una excelente

reacción rizógena. En el ensayo se determinó una concentración ideal en A3 (5 mg/L) y una inhibitoria en A5 (10 mg/L). Estos resultados concuerdan con los descritos por Cuesta y Mondaca (2014), quienes al aplicar un biorregulador de formulación comercial de 0,12% ácido indolbutírico y 0,004% de forclorfenurón obtuvieron una mejora en la cantidad y calidad de raíces con respecto al testigo en plantines de tomate; no obstante a concentraciones superiores no se obtuvieron resultados favorables. Asimismo en el estudio de Olaiya (2010) se observó un efecto inhibitorio al estudiar el crecimiento en longitud de raíz a dosis altas de IBA en semillas de tomate riñón, pues el testigo desarrolló una mayor longitud de raíz que los tratamientos con altas concentraciones de auxina, ocasionando un efecto retardante significativo en la formación radicular, tal efecto concuerda con Glick, Penrose y Li (1998), quienes mencionan que a altas dosis de auxinas se estimula la síntesis de etileno endógeno, que es un inhibidor de la elongación de la raíz en las plantas.

Según Pierik (1997, pág. 70), la kinetina es una citoquinina de uso común, que ayuda a promover el crecimiento y desarrollo. En este estudio se obtuvo una concentración ideal de referencia de C3 (0,4 mg/L) que promueve el crecimiento en longitud de plántulas de tomate riñón, lo que concuerda con lo expresado por Ruiz (2010), que cuantificó promedios de peso de biomasa de maíz mayores que el testigo, al aplicar un tratamiento de Cytoquin 1,2 L/Ha + Sea Weed 1L/Ha. Resultados similares han sido publicados por Chamorro, Martínez, Fernández y Mosquera (2007), quienes al estudiar el cultivo de *Limonium* “Misty blue”, obtuvieron una mejor tasa de multiplicación a una concentración de 0,5 mg/L de kinetina.

3.2 Establecimiento del uso de giberelinas en la dinámica de germinación de semillas de orquídea a nivel *in vitro*

En este ensayo se logró obtener muestras óptimas para el cultivo *in vitro* y determinar las concentraciones ideales que promovieron la germinación en las especies analizadas.

3.2.1 Análisis de viabilidad de semillas

La viabilidad más alta observada se presenta en *Epidendrum jamiesonis* con un promedio de 96%, a diferencia de *Epidendrum schistochilum* que mostró el promedio más bajo de viabilidad con un 70%; además la especie *Oncidium ornithorhynchum* obtuvo un porcentaje de viabilidad igualmente alto con un 94% tal como se muestra en la tabla 10. Esto indica que la investigación puede llevarse a cabo pues la prueba de tetrazolio muestra que las semillas son viables para el cultivo *in vitro* (anexo 6).

Tabla 10.

Porcentaje de viabilidad de semillas de las especies de orquídea Epidendrum jamiesonis, Epidendrum schistochilum y Oncidium ornithorhynchum.

Especie	Conteos	Semillas Viables	Semillas No viables	Total semillas	Porcentaje de viabilidad
<i>Epidendrum jamiesonis</i>	1	66	2	68	97
	2	65	4	69	94
	3	49	1	50	98
Promedio					96
<i>Epidendrum schistochilum</i>	1	37	17	54	69
	2	35	12	47	74
	3	33	16	49	67
Promedio					70
<i>Oncidium ornithorhynchum</i>	1	44	2	46	96
	2	51	3	54	94
	3	54	4	58	93
Promedio					94

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

3.2.2 Germinación *in vitro* de semillas de orquídea

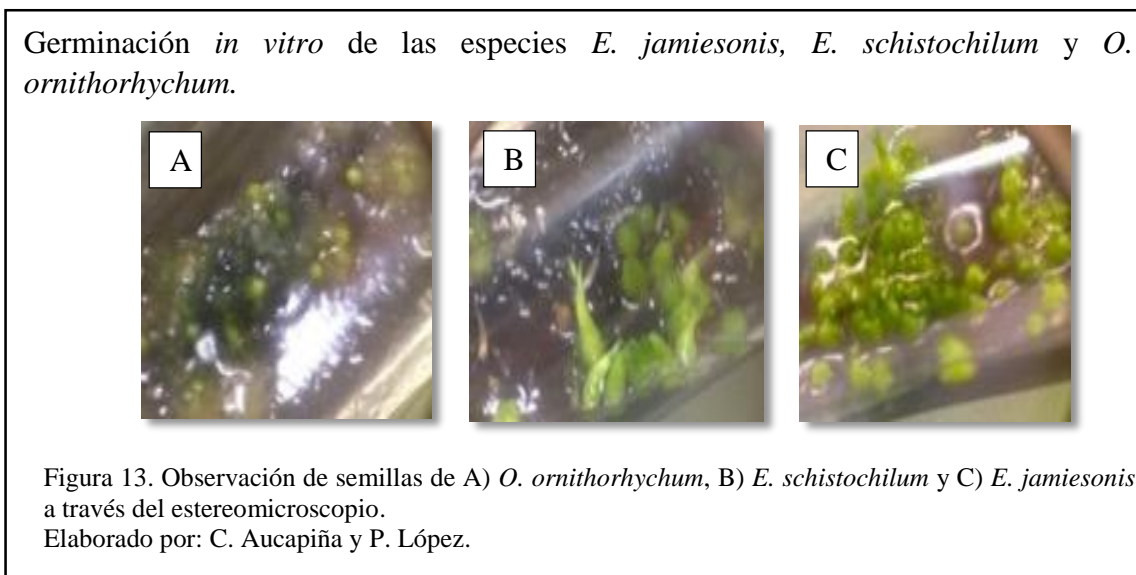
Mediante el análisis de varianza (ANOVA), en *Epidendrum schistochilum*, *Epidendrum jamiesonis*, *Oncidium ornithorhynchum*, para la variable germinación de semillas (anexo 7), se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, especies y para la interacción de especies con tratamientos, es decir estos factores influyen en la germinación de semillas de las orquídeas. El coeficiente de variación fue de 7,86%. Según la prueba de Duncan al 5% (tabla 11) de la interacción de los tratamientos con *Epidendrum schistochilum* (E2), *Epidendrum jamiesonis* (E15) y *Oncidium ornithorhynchum* (O1), se establecieron siete rangos de significancia. La interacción que presentó el mejor porcentaje de germinación se ubicó en el primer rango, fue la del tratamiento G4 (0,1 mg/L) con la especie E2 con un promedio de 57,22%, seguido de la especie E15 que al mismo tratamiento presentó un promedio de 54,71%. En el último rango se ubicaron las interacciones de la especie O1 con los tratamientos G1 (0,001 mg/L), G2 (0,005 mg/L), G0 (0 mg/L) y G6 (0,4 mg/L) con los promedios más bajos de germinación de semillas. En la figura 13 se observa la germinación de las semillas de orquídea analizadas. En el anexo 8 se aprecian los tratamientos ideales y testigos.

Tabla 11.

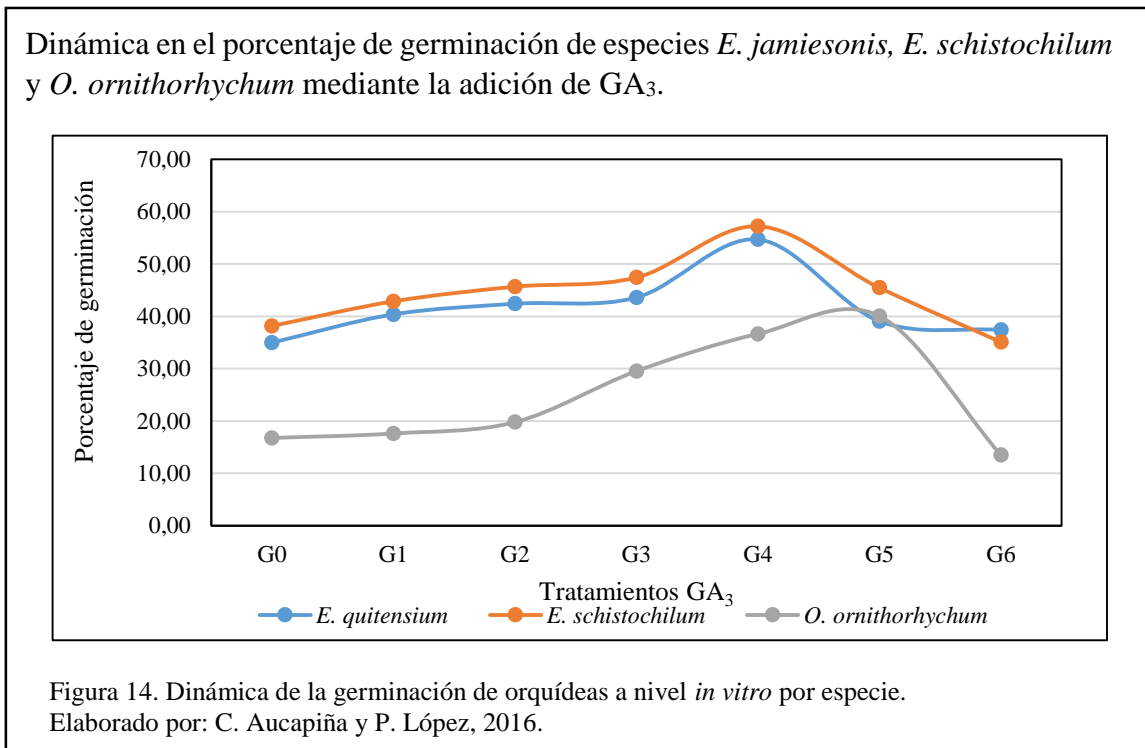
Prueba de Duncan al 5% en la interacción de tratamientos en las especies *E. schistochilum*, *E. jamiesonis* y *O. Ornithorhynchum* para la variable germinación de semillas.

Especie	Tratamiento	Medias (%)	Rangos					
E2	G4	57,22	a					
E15	G4	54,71	a	b				
E2	G3	47,73		b	c			
E2	G2	45,67			c	d		
E2	G5	45,46			c	d		
E15	G3	43,61			c	d	e	
E2	G1	42,87			c	d	e	
E15	G2	42,41			c	d	e	
E15	G1	40,38			c	d	e	
O1	G5	40,05			c	d	e	
E15	G5	39,07			c	d	e	
E2	G0	38,16			c	d	e	f
E15	G6	37,40				d	e	f
O1	G4	36,65				d	e	f
E2	G6	35,08					e	f
E15	G0	34,99					e	f
O1	G3	29,53						f
O1	G2	19,78						
O1	G1	17,61						
O1	G0	16,75						
O1	G6	13,47						

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.



En la figura 14, se muestra la dinámica de los tratamientos con las especies de orquídeas. Las especies *E. schistochilum* como *E. jamiesonis* presentan promedios de germinación elevados al tratamiento G4 (0,1 mg/L) con valores de 57,22% y 54,71% respectivamente. Por otro lado, la especie *Oncidium ornithorhynchum* presenta su máximo porcentaje de germinación 40,05% al tratamiento G5 (0,2 mg/L), a partir de esta concentración los porcentajes de germinación de las especies de *Epidendrum* decrecen.



Al tomar como referencia lo expuesto, se deduce que la reacción a un tratamiento con ácido giberélico depende de la especie en estudio, por consiguiente se estableció la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para especies de orquídeas, en la variable germinación de semillas mostró dos rangos de significación. En el primer rango se encuentran los tratamientos de *Epidendrum schistochilum* y *Epidendrum jamiesonis* con los mayores promedios de germinación con medias de 44,56% y 41,80% respectivamente.

En el segundo rango se encuentran los tratamientos de la especie *Oncidium ornithorhynchum* con una media de 24,83% de germinación.

3.2.3 Discusión

Gil Martínez y colaboradores (1995) mencionan que en la germinación natural de orquídeas, los hongos micorrícicos pueden regular el nivel de giberelinas en las semillas con las cuales forman simbiosis. En el cultivo asimbiótico no se cuenta con la función del hongo, es por ello que mediante la adición de ácido giberélico se puede obtener una tasa de germinación elevada a una concentración determinada. En el presente estudio se logró establecer que mediante la adición de 130 μ L de solución de ácido giberélico en cada tubo de ensayo a una concentración G4 (0,1 mg/L), se obtuvieron porcentajes de germinación superiores al 50% en el caso de *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum*, en *Oncidium ornithorhynchum* se obtuvo un porcentaje de germinación del 40% a una concentración ideal G5 (0,2 mg/L). Pedraza (2007) estableció resultados similares a los obtenidos en las especies de *Epidendrum* de esta investigación, pues al estudiar la especie *Masdevallia auropurpurea*, obtuvo el mejor porcentaje y tiempo de germinación a una concentración de 0,092 mg/L de ácido giberélico; no obstante, a 0,2 mg/L no produjo ningún estímulo en la germinación. Por otro lado, Rodrigues, Asmar y Pasqual (2010) reportaron la mayor velocidad de germinación en el cultivo *in vitro* de *Psidium guajava* a una concentración de 0,2 mg/L de ácido giberélico, similar a *Oncidium ornithorhynchum*. Asimismo Salazar (2012) no encontró diferencias significativas en el porcentaje de germinación de *Cattleya mendelii* al adicionar 0,5 mg/L de ácido giberélico al medio de cultivo, este hecho concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, pues las tres especies de orquídea analizadas presentan su punto de inhibición en el tratamiento G6 (0,4

mg/L). Igualmente, Sabá, Lameira, Luz, Gomes y Innecco (2002) encontraron que a valores altos de GA₃ se presentan efectos fitotóxicos en *Pilocarpus microphyllus* disminuyendo el porcentaje de germinación.

Además, se observa que las especies del género *Epidendrum* reaccionan diferente a *Oncidium ornithorhynchum*, pues esta última requiere el doble de concentración de ácido giberélico (0,2 mg/L) para observar una reacción positiva en el porcentaje de germinación; esta reacción se puede deber a que a pesar de la similitud en la taxonomía y el hábito de crecimiento, muchas especies presentan requerimientos diferentes en el proceso de germinación (Vogel & Macedo, 2011). Leite y Hebling (2007), al no encontrar diferencias significativas en los porcentajes de germinación en *Cattleya warnerii* tratados con giberelinas en presencia de luz, ratifican que las respuestas fisiológicas de cada especie varían de acuerdo a su contenido genotípico.

3.3 Definición de la concentración ideal de auxina y citoquinina

Para determinar una concentración ideal de auxina se tomó como referencia la concentración a la cual se presenta la mayor longitud de raíz, en el caso de citoquinina se analizó el número y longitud de brote.

3.3.1. Efecto de auxinas en la longitud de la raíz

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) para la variable longitud de raíz (anexo 9), se determinó que no existe diferencia significativa tanto para las especies *Epidendrum schistochilum* y *Epidendrum jamiesonis* como para los tratamientos. Es decir que los tratamientos no influyen significativamente en la longitud de la raíz. El coeficiente de variación fue de 9,12 %.

3.3.2 Efecto de citoquininas en el número de brotes

Al analizar la variable número de brotes, en *Epidendrum schistochilum* y *Epidendrum jamiesonis*, en base al análisis de varianza (ANOVA) (anexo 10) se observa que existen diferencias estadísticas altamente significativas al nivel de 5% para tratamientos y para especies, pero no existen diferencias significativas en la interacción tratamiento y especie. Es decir, que se presenta una concentración ideal factible en ambas especies, sin embargo existen mejores rendimientos en una de ellas. El coeficiente de variación fue de 23,17%.

Según la prueba Duncan al 5% (tabla 12) de los tratamientos en *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Epidendrum jamiesonis* (E15) para la variable número de brotes, se establecieron tres rangos de significancia. El mejor tratamiento C4 (0,4 mg/L) se ubicó en el primer rango pues presentó la mayor cantidad de brotes con un promedio de 2,01. El tratamiento que tuvo el menor número de brotes fue C3 (0,1 mg/L) con una media de 1,43 brotes. Los resultados obtenidos no coinciden con la concentración ideal establecida en tomate riñón, es decir que se observa una dinámica diferente en orquídeas.

Tabla 12.

Prueba de Duncan al 5% para los tratamientos en E. schistochilum y E. jamiesonis, en la variable número de brotes.

Tratamientos	Concentración de kinetina (mg/L)	Medias (Nº brotes)	Rangos	
C4	0,4	2,01	a	
C2	0,01	1,82	a	b
C0	0	1,67		b c
C1	0,0025	1,66		b c
C5	1,5	1,60		b c
C3	0,1	1,43		c

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

3.3.3 Efecto de citoquininas en la longitud de brotes

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA), en la especie *Epidendrum schistochilum* y *Epidendrum jamiesonis*, para la variable longitud de brotes (anexo 11), se establecieron diferencias estadísticas altamente significativas en tratamientos al nivel de 5%, es decir que los tratamientos influyen en la longitud de los brotes y en la variable especies de orquídeas. La interacción entre tratamientos y especies no presentaron significancia estadística. Es decir, que presentó una concentración ideal factible en ambas especies, no obstante existen mejores rendimientos en una de ellas. El coeficiente de variación fue de 16,55%.

Según la prueba Duncan al 5% de los tratamientos (tabla 13), en la especie *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Epidendrum jamiesonis* (E15), para la variable longitud de brotes, se encontraron dos rangos de significancia. El mayor crecimiento de brotes se registró en el tratamiento C2 (0,01 mg/L), que tuvo una media de 1,59 cm, por lo tanto se considera la concentración ideal para orquídeas, que resulta diferente a la establecida en tomate riñón y también es diferente a la concentración ideal para el número de brotes.

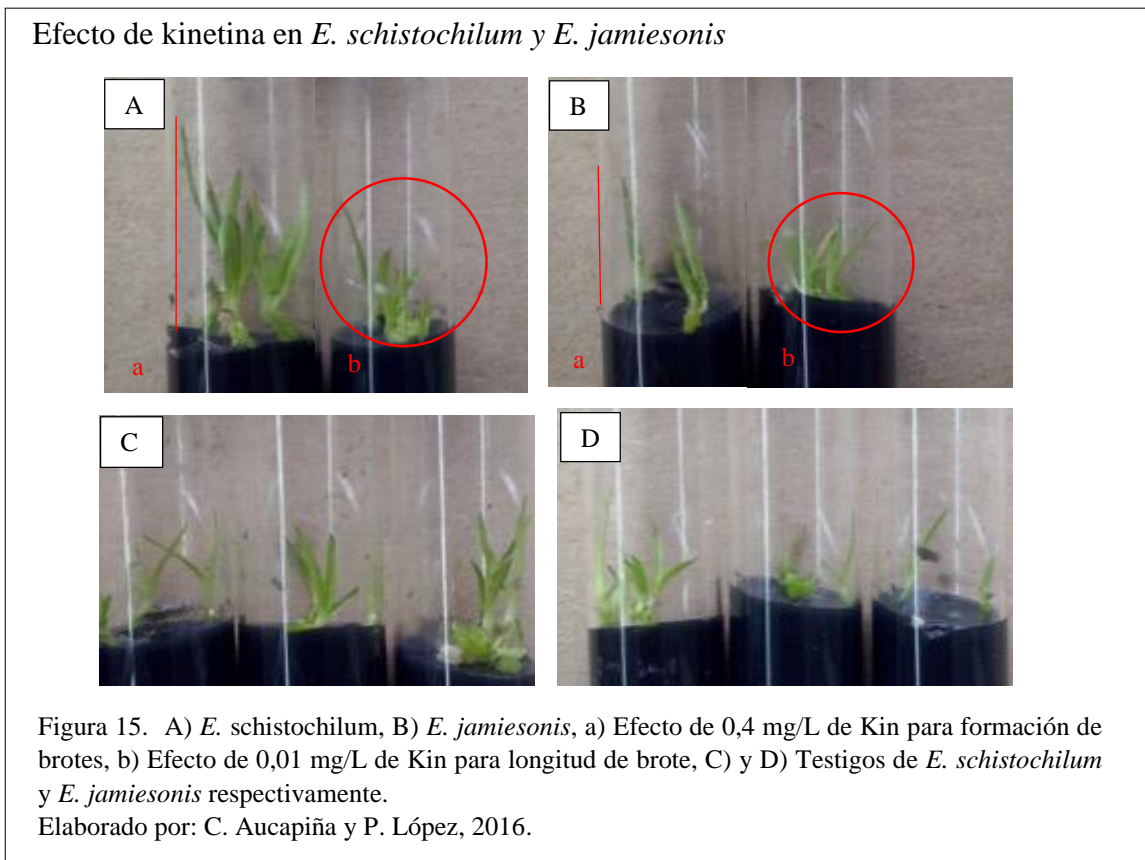
Tabla 13.

Prueba de Duncan al 5% para los tratamientos, en E. schistochilum y E. jamiesonis, en la variable longitud de brotes.

Tratamientos	Concentración de kinetina (mg/L)	Medias (cm)	Rangos
C2	0,01	1,59	a
C5	1,5	1,39	b
C1	0,0025	1,36	b
C4	0,4	1,31	b
C0	0	1,31	b
C3	0,1	1,28	b

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% se determinó que la especie *Epidendrum schistochilum* presentó mejores rendimientos, tanto para el número como para la longitud de brotes, con medias de 1,78 brotes y 1,44 cm respectivamente, tal como se observa en la figura 15. En el caso de *Epidendrum jamiesonis* que presenta una media de 1,62 brotes y 1,31 cm de longitud.



3.3.4 Discusión

Taiz y Zeiger (2006, pág. 836) hacen hincapié en la inhibición en la elongación radicular a concentraciones elevadas de auxina. Tal es el caso del estudio realizado por Mendes, Sibov, Sérgio y Faria (2015), pues no encontraron diferencias significativas a concentraciones de 1,2 y 4 mg/L de IBA en el desarrollo radicular de *Cyrtopodium saintlegerianum*, la misma reacción ocurre en esta investigación pues las concentraciones

estudiadas no intervienen en el la longitud de la radícula. Por otro lado Condemarín, Chico y Vargas (2007) mostraron resultados positivos en *Encyclia microtos* a una concentración de IBA de 1ppm. Asimismo Santos, Ferreira y Marques (2010), quienes estudiando los efectos de IBA en el cultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* a diferentes concentraciones (0,0; 0,9; 1,8; 2,7 y 3,6 mg/L), reportaron el mayor crecimiento de la longitud de la raíz a una concentración de 1,6 mg/L en un periodo de 60 días, mientras que a una concentración de 3,6 mg/L se observó un efecto inhibitorio; lo que indica que las concentraciones de IBA establecidas en esta investigación presentan un impacto fitotóxico en las especies evaluadas.

El tratamiento C4 (0,4 mg/L) presenta los mejores rendimientos en cuanto a número de brotes con un promedio de 2,01 brotes. Martin (2003) utilizó segmentos de rizomas de *Ipsea malabarica* como explantes en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con kinetina para la formación de brotes, logrando un promedio de 2,1 brotes a una concentración de 0,49 mg/L es decir se utilizó una concentración ideal parecida a este ensayo. Asimismo Roy, Patel, Patel, Sajeev y Deka (2011), en la germinación asimbiótica de *Vanda coerulea* reportaron un número de brotes superior a 4,66 brotes a la concentración de kinetina de 0,49 mg/L.

En cuanto a la longitud de los brotes se definió una concentración ideal de C2 (0,01 mg/L), resultados semejantes obtuvieron Lunelli, Kanashiro y Tavares (2015) al aplicar 8 mL del bioestimulante “Stimulate” que posee de entre sus principios activos kinetina al 0,009% en plantas epífitas, pues presentan mayor desarrollo foliar, es decir que la acción de la citoquinina se observa en concentraciones bajas. No obstante Machado y colaboradores (2002) señalan resultados positivos en *Catleya* sp. a una concentración de 0,2 mg/L de

kinetina; esta inconsistencia puede deberse a que las raíces de las orquídeas tienen actividad fotosintética y en ambientes húmedos existe un aumento en la tasa de fotosíntesis en esta región, lo que ayuda al crecimiento de la plántula (Ori, 2006).

En el protocolo establecido se agregó 130 μL de solución de hormona al tubo de ensayo al momento de la siembra del protocormo, esto además incrementa la humedad relativa y por ende promueve el desarrollo de la plántula, por lo tanto una concentración de 0,01 mg/L de kinetina significó ser suficiente para obtener el efecto deseado en la longitud y número de brotes, lo que se evidencia con el estudio realizado por Nayak, Chand, Rath y Patnaik (1998), quienes al utilizar una concentración baja de kinetina en *Cymbidium aloifolium*, reportaron una longitud de brotes de 1,39 cm a los 60 días, inferior a los resultados obtenidos en el presente estudio. Asimismo Komalavalli y Rao (2000), en la micropropagación de *Gymnema sylvestre* reportaron a 0,5 mg/L de kinetina se obtuvo una formación promedio de 1,5 brotes, un valor por debajo del obtenido en esta investigación.

Además se observa que la especie *Epidendrum schistochilum* presenta mejores rendimientos que *Epidendrum jamiesonis*, a pesar que ambas especies fueron sometidas a las mismas condiciones de luz y temperatura, este hecho se debe a que según Duarte (2013, pág. 105), las especies epífitas pueden presentar diferentes respuestas a las condiciones ambientales para su supervivencia, es decir que la especie *E. schistochilum* presentó mayor adaptabilidad y resistencia en el protocolo de uso de fitohormonas en condiciones *in vitro*.

3.4 Determinación del punto de equilibrio auxina-citoquinina

Para determinar el punto de equilibrio auxina-citoquinina, se analizó la longitud radicular, longitud foliar y número de brotes, tomándose como concentración ideal aquella que presentó mayor crecimiento en longitud radicular y foliar simultáneamente.

3.4.1 Efecto de la combinación auxina-citoquinina en la longitud de raíz

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), en *Epidendrum schistochilum* y *Epidendrum jamiesonis*, para la variable longitud de raíz (anexo 12), se estableció que existen diferencias estadísticas altamente significativas al nivel de 5% en tratamientos, es decir influyen en el crecimiento de la raíz. De la misma forma sucede entre las especies de orquídeas y en la interacción de ambos factores. El coeficiente de variación fue de 9,17%.

Según la prueba de Duncan al 5% en *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Epidendrum jamiesonis* (E15), para la interacción de los tratamientos con las especies de orquídeas, en la variable longitud de raíz (tabla 14), se establecieron siete rangos de significancia. La mejor interacción fue la del tratamiento A4C2 (7,5 mg/L IBA x 0,01 mg/L Kin) con la especie E2, que presentó un crecimiento de la raíz de 1,26 cm. En el último rango se ubicaron cinco interacciones, que tuvieron el menor crecimiento de la raíz, los tratamientos A3C5 (5 mg/L IBA x 1,5 mg/L Kin), A4C3 (7,5 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin), A2C3 (3 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin), A0C0 (testigo) con la especie E15 y el tratamiento A1C3 (1,5 IBA mg/L x 0,1 mg/L Kin) con la especie E2. A su vez, el mejor tratamiento para la especie E15 fue la combinación A2C4 (3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin) con un promedio de longitud de la raíz de 1,18 cm.

Tabla 14.

Prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos auxina-citoquinina en las especies E. schistochilum y E. jamiesonis, para la variable longitud de raíz.

Especies	Tratamiento	Medias (cm)	Rangos							
E2	A4C2	1,26	a							
E2	A1C5	1,21	a	b						
E2	A3C2	1,20	a	b	c					
E15	A2C4	1,18	a	b	c	d				
E2	A3C3	1,17	a	b	c	d				
E15	A3C3	1,15		b	c	d	e			
E2	A2C4	1,13		b	c	d	e	f		
E15	A4C2	1,11		b	c	d	e	f	ss	
E15	A5C1	1,10			c	d	e	f	ss	ss
E2	A0C0	1,09				d	e	f	ss	ss
E15	A1C5	1,09				d	e	f	ss	ss
E2	A5C3	1,08				d	e	f	ss	ss
E2	A5C1	1,06					e	f	ss	ss
E2	A2C3	1,05					e	f	ss	ss
E15	A3C4	1,04					e	f	ss	ss
E2	A3C1	1,04					e	f	ss	ss
E15	A3C2	1,04					e	f	ss	ss
E2	A4C3	1,04						f	ss	ss
E15	A1C3	1,03						f	ss	ss
E15	A5C3	1,03						f	ss	ss
E2	A3C4	1,02						f	ss	ss
E2	A3C5	1,02						f	ss	ss
E15	A3C1	1,02						f	ss	ss
E15	A3C5	1,02							ss	ss
E2	A1C3	1,01							ss	ss
E15	A4C3	1,00							ss	ss
E15	A2C3	1,00							ss	ss
E15	A0C0	1,00							ss	ss

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

3.4.2 Efecto de la combinación auxina-citoquinina en la longitud de brote

En cuanto a la longitud del brote, se observa que en el análisis de varianza (ANOVA) en la especie *Epidendrum schistochilum* y *Epidendrum jamiesonis* (anexo 13), se identificaron diferencias estadísticas altamente significativas al nivel de 5%, en los tratamientos, es decir influyen en la longitud de los brotes, así como también sucede entre las especies de orquídeas y la interacción de ambos factores. El coeficiente de variación fue de 11,62%.

De acuerdo a la prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos con las especies *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Epidendrum jamiesonis* (E15), para la variable

longitud de brotes (tabla 15), se establecieron nueve rangos de significancia. En el primer rango se ubicó la interacción del tratamiento A4C2 (7,5 mg/L IBA x 0,01 mg/L Kin) con la especie E2, que presentó el mayor crecimiento de los brotes con un promedio de 1,92 cm. En el último rango se ubicó la interacción del tratamiento A5C3 (10 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin) con la especie E15 con una media de 1,33 cm. La concentración ideal para la especie E15 fue A3C4 (5 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin) con un promedio de 1,65 cm.

Tabla 15.

Prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos auxina-citoquinina con la especie E. schistochilum y E. jamiesonis para la variable longitud de brotes.

Especies	Tratamiento	Medias (cm)	Rangos							
E2	A4C2	1,92	a							
E2	A3C2	1,84	a	b						
E2	A1C5	1,68		b	c					
E2	A3C3	1,66		b	c					
E2	A0C0	1,66		b	c					
E2	A5C3	1,66		b	c					
E15	A3C4	1,65		b	c					
E15	A5C1	1,62			c	d				
E2	A3C1	1,62			c	d	e			
E2	A4C3	1,61			c	d	e			
E15	A2C4	1,60			c	d	e			
E15	A3C3	1,60			c	d	e			
E15	A1C3	1,59			c	d	e	f		
E2	A2C3	1,59			c	d	e	f		
E2	A1C3	1,58			c	d	e	f		
E15	A4C2	1,57			c	d	e	f	g	
E15	A3C5	1,57			c	d	e	f	g	
E2	A3C5	1,56			c	d	e	f	g	h
E15	A1C5	1,56			c	d	e	f	g	h
E2	A2C4	1,52			c	d	e	f	g	h
E15	A3C1	1,50			c	d	e	f	g	h
E15	A2C3	1,42				d	e	f	g	h
E15	A4C3	1,42				d	e	f	g	h
E2	A5C1	1,41					e	f	g	h
E15	A3C2	1,39						f	g	h
E2	A3C4	1,37							g	h
E15	A0C0	1,36								h
E15	A5C3	1,33								h

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

3.4.3 Efecto de la combinación auxina-citoquinina en el número de brotes

En el caso de la variable número de brotes en *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Epidendrum jamiesonis* (E15) de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) (anexo 14), se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas al nivel de 5% en tratamientos, así también entre las especies y la interacción de ambos factores, es decir que influyen en la formación de los brotes. El coeficiente de variación fue de 20,69%.

Mediante la prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos auxina-citoquinina con las especies *Epidendrum schistochilum* (E2) y *Epidendrum jamiesonis* (E15), se establecieron seis rangos de significancia (tabla 16). En el primer rango se ubicó la interacción del tratamiento A1C5 (1,5 mg/L IBA x 1,5 mg/L Kin) con la especie E2 quien tuvo la mayor formación de brotes con una media de 2,68 brotes. El último rango compartieron la interacción de los tratamientos A5C3 (10 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin) y A0C0 (testigo) con la especie E15, que tuvieron el menor número de brotes formados con un promedio de 1,61 y 1,59 brotes respectivamente. A su vez, en la especie E15 existieron dos tratamientos que tuvieron la mejor formación de brotes, A2C4 (3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin) y A3C5 (5 mg/L IBA x 1,5 mg/L Kin) ambas con un promedio de 2,13 brotes.

Tabla 16.

Prueba de Duncan al 5% en la interacción de los tratamientos auxina-citoquinina en las especies E. schistochilum y E. jamiesonis para la variable número de brotes.

Especies	Tratamiento	Medias (N° brotes)	Rangos						
E2	A1C5	2,68	a						
E2	A4C2	2,47	a	b					
E2	A3C1	2,29	a	b	c				
E15	A3C5	2,13		b	c	d			
E15	A2C4	2,13		b	c	d			
E2	A3C2	2,12		b	c	d	e		
E2	A1C3	2,03			c	d	e	f	
E2	A2C4	2,01			c	d	e	f	
E2	A0C0	1,99			c	d	e	f	
E2	A2C3	1,98			c	d	e	f	
E2	A4C3	1,97			c	d	e	f	
E15	A5C1	1,96			c	d	e	f	
E2	A3C3	1,95			c	d	e	f	
E15	A4C2	1,94			c	d	e	f	
E15	A3C4	1,93			c	d	e	f	
E2	A3C4	1,91			c	d	e	f	
E2	A5C3	1,91			c	d	e	f	
E2	A5C1	1,89			c	d	e	f	
E15	A3C3	1,85			c	d	e	f	
E15	A1C3	1,80				d	e	f	
E15	A1C5	1,79				d	e	f	
E2	A3C5	1,77				d	e	f	
E15	A4C3	1,75				d	e	f	
E15	A3C2	1,72				d	e	f	
E15	A2C3	1,71				d	e	f	
E15	A3C1	1,66					e	f	
E15	A5C3	1,61						f	
E15	A0C0	1,59							f

Nota: Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% se determinó que la especie *Epidendrum schistochilum* (E2) presentó una mejor reacción a los tratamientos efectuados, presentando mejores rendimientos en las variables longitud de raíces, longitud de brotes y número de brotes, con medias de 1,10 cm, 1,62 cm y 2,07 brotes respectivamente, en comparación de *Epidendrum jamiesonis* (E15), que en cuanto a la longitud de la raíz presentó un promedio de 1,06 cm, de longitud de brotes 1,51 cm y 1,62 brotes.

En la figura 16 se observa el efecto del punto de equilibrio auxina-citoquinina en la especie *Epidendrum schistochilum*.

Efecto de combinación de hormonas IBA x Kin en *E. schistochilum*.

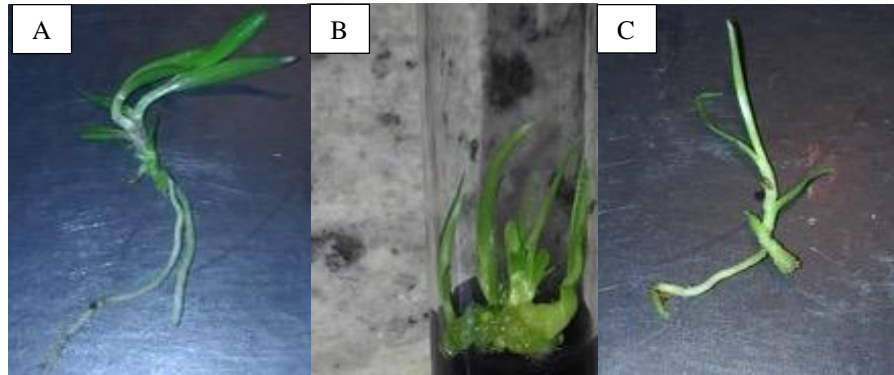


Figura 16. A) Punto de equilibrio 7,5 mg/L IBA x 0,01 mg/L Kin en la longitud radicular y foliar, B) Tratamiento A1C5 (1,5 mg/L IBA x 1,5 mg/L Kin) en la formación de brotes, C) Testigo. Elaborado por: C. Aucapiña y P. López, 2016.

En la figura 17 se observa los efectos de la combinación de hormonas Auxina-Citoquinina en el desarrollo de *Epidendrum jamiesonis*.

Efecto de combinación de hormonas IBA x Kin en *E. jamiesonis*.

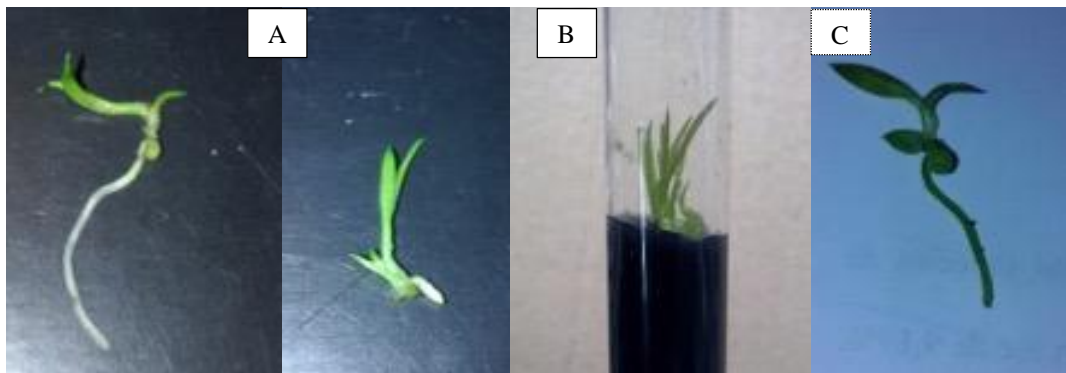


Figura 17. A) Punto de equilibrio A2C4 (3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin) para la longitud de raíz y número de brotes foliares B) Tratamiento A3C4 (5 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin) en la longitud de brotes, C) Testigo. Elaborado por: C. Aucapiña y P. López, 2016.

3.4.4 Discusión

George y colaboradores (2008, pág. 219) mencionan que se necesita un equilibrio entre la auxina y citoquinina para iniciar el crecimiento o la diferenciación de raíces. En este estudio se obtuvo mejores resultados que los presentados por Ogunsola y Ilori (2008), en el cultivo *in vitro* de *Synsepalum dulcificum* en medio MS con una combinación alta de auxina y baja citoquinina reportando un promedio de longitud de raíz de 0,6 cm. Pierik (1997, pág. 69) indica que la combinación de auxinas y citoquininas producen un efecto sinérgico, lo cual se observa en esta investigación, pues la combinación de auxina-citoquina del tratamiento A4C2 (7,5 mg/L IBA x 0,01 mg/L Kin) presenta un crecimiento en longitud radicular de 1,26 cm en *Epidendrum schistochilum* a comparación de los tratamientos de IBA donde no se observa un efecto significativo; algo similar ocurre con *Epidendrum jamiesonis* con una longitud radicular de 1,18 cm en el tratamiento A2C4 (3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin). El mismo efecto fue reportado por Roy y colaboradores (2011), en la propagación de semillas asimbiótica de *Vanda coerulea* y por Hossain, Sharma, Teixeira da Silva y Pathak (2010), en la germinación asimbiótica de semillas de *Cymbidium giganteum*, quienes obtuvieron mejores resultados en el desarrollo de protocormos cuando realizaron tratamientos con la combinación auxina-citoquinina, que los efectuados de manera individual.

Al analizar la longitud de brote se establece como tratamiento ideal a A4C2 (7,5 IBA mg/L x 0,01 mg/L Kin) en la especie *Epidendrum schistochilum* con un promedio de 1,92 cm, en el caso de *Epidendrum jamiesonis* la concentración ideal para la elongación de brotes es A3C4 (5 IBA mg/L x 0,4 mg/L Kin) con un promedio de 1,65 cm. Hajong, Kumaria y Tandon (2013), a una concentración alta de auxinas y baja de citoquininas en

el cultivo *in vitro* de *Dendrobium chrysanthum*, reportaron una longitud de brotes de 0,42 cm a los 60 días, inferior a los resultados presentados en ambas especies de *Epidendrum* de esta investigación. Además se ratifica que los tratamientos de la combinación de IBA x Kin da mejores resultados que los de kinetina, en este caso para la variable en la longitud de brotes. Lo que concuerda con Gogoi, Kumaria y Tandon (2012), en el cultivo *in vitro* de *Cymbidium eburneum*, cuyos resultados presentaron una respuesta pobre en el crecimiento y desarrollo de la longitud de los brotes en protocormos, al adicionar individualmente auxinas y citoquininas, mientras que cuando se combinaron ambas hormonas el resultado mejoró notoriamente.

Por lo expuesto se define que la concentración de equilibrio para elongación radicular y foliar en *Epidendrum schistochilum* es 7,5 mg/L IBA x 0,01 mg/L Kin; mientras que para *Epidendrum jamiesonis* se observaron resultados positivos a 3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin. Estos aspectos pueden deberse a que según George y colaboradores (2008, pág. 219), las concentraciones de hormonas no siempre conducen a los mismos resultados. Además Duarte (2013, pág. 105) menciona que las epífitas presentan diferentes reacciones ante situaciones de estrés, como en la propagación vegetativa, interacciones micorrícicas y reproducción sexual, además de mostrar diferentes grados de tolerancia a la sequía y adaptarse a condiciones de luminosidad.

En los resultados presentados por Krapiec, Milaneze y Machado (2003), en el estudio *Cattleya walkeriana* señalan que a la concentración de IBA x Kin (1,5 mg/L x 1,5 mg/L) el número de brotes formados es superior a 2, lo cual coincide con la especie *Epidendrum schistochilum* de este estudio. Nayak, Rath y Patnaik (1997) al estudiar la propagación *in vitro* de *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* y *Dendrobium moschatum*,

concluyeron que las dosis de citoquinina como de la combinación auxina-citoquinina son diferentes para cada especie. La combinación auxina-citoquinina tuvo un efecto sinérgico en el número de brotes, logrando un mayor promedio en el tratamiento A1C5 (1,5 mg/L IBA x 1,5 mg/L Kin), que cuando se agregó únicamente kinetina, tal como el estudio de Bhattacharyya, Kumaria, Job y Tandon (2015) en micropropagación de *Dendrobium thyrsiflorum*, quienes al evaluar diferentes dosis de fitohormonas, obtuvieron un mayor número de brotes en la combinación de auxina-citoquinina que de manera individual.

Conclusiones

Se logró determinar las concentraciones ideales de referencia en tomate riñón, para GA₃ 0,1 mg/L, para IBA 5 mg/L y Kin 0,1 mg/L, sin embargo se deben ajustar para su uso en orquídeas, por lo que se concluye que el efecto de las hormonas no siempre va a generar la misma respuesta en diferentes especies.

Para obtener una tasa de germinación elevada en las especies *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum* se debe adicionar 130 µL de solución de ácido giberélico a una concentración de 0,1 mg/L, en el caso de *Oncidium ornithorhynchum* se opta por la adición de 130 µL de GA₃ a una concentración de 0,2mg/L.

Al estudiar las especies *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum*, se concluye que no es factible la aplicación de 130 µL de solución de IBA de las concentraciones estudiadas, pues presentan el mismo efecto que el testigo en la variable longitud de la raíz, por otro lado para una mejor elongación de los brotes se debe aplicar 130 µL de solución de kinetina a una concentración de 0,01 mg/L y para generar un incremento en el número de los brotes la concentración ideal es 0,4 mg/L de kinetina.

Además, se determina que el punto de equilibrio auxina-citoquinina para la especie *Epidendrum schistochilum* es 7,5 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin, pues a esta concentración presenta el mayor crecimiento en longitud tanto radicular como foliar, en el caso de *Epidendrum jamiesonis* se obtuvo mejores resultados a 3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin. Por lo tanto, se concluye que la combinación de hormonas presenta mejores resultados en las variables longitud radicular, longitud de brote y número de brotes, que al aplicar las hormonas individualmente.

Referencias

- Abdelnour, A., & Muñoz, A. (1999). Rescate, establecimiento y conservación de orquídeas en vías de extinción. *Tecnología en marcha*, 13(1), 24-30.
- Angiosperm Phylogeny Website. (2013). *Angiosperm Phylogeny Website*. Obtenido de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Araujo, A., Pasqual, M., Pereira, A., & Rocha, A. (2006). Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orquidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e Carvão Ativado. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 2(2), 61-67.
- Arditti, J. (1977). Clonal propagation of orchids by means of tissue culture-a manual. En J. Arditti, *Orchid biology vol I* (págs. 203–293). New York: Cornell University Press.
- Arditti, J., & Ernst, R. (1993). *Micropropagation of Orchids*. New York: John Wiley and Sons.
- Arditti, J., & Krikorian, A. (1996). Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122(3), 183-241. doi:10.1111/j.1095-8339.1996.tb02073.x
- Asociación Mexicana de Orquideología. (2008). Icones Orchidacearum. En A. M. Orquideología, E. Hágsater, & M. Soto (Edits.), *Orchids of México*. México: Herbario AMO. Recuperado el 20 de Febrero de 2016, de http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Fascicle10.pdf

- Asociación por la Naturaleza Extremeña. (2006). *Guía de orquídeas de Extremadura: Proyecto Orquídea*. España: Tecnigraf, S.A.
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Job, N., & Tandon, P. (2015). Phyto-molecular profiling and assessment of antioxidant activity within micropropagated plants of *Dendrobium thyrsiflorum*: a threatened, medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3), 535-550.
- Bhojwani, S., & Dantu, P. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. India: Springer.
- Boutherin, D., & Bron, G. (1994). *Multiplicación de plantas hortícolas*. Zaragoza, España: ACRIBIA.
- Brzobohaty, B., Moore, I., & Palme, K. (1994). Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. *Plant Molecular Biology*, 26(5), 1483-1484.
- Caneva, S. (1994). *Orquídeas, principales géneros y especies*. Buenos Aires, Argentina: Albatros.
- Cerna, M., & Tafur, V. (2009). Cultivo *in vitro* de *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae). *La Granja*, 9(1), 44-51.
- Chamorro, A., Martínez, S. L., Fernández, J., & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. Misty blue. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 47-53.

- Condemarín, C., Chico, J., & Vargas, C. (2007). Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo *in vitro* de yemas axilares de *Encyclia microtos* (Rchb.f.) Hoehne (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1-2), 247-254. Recuperado el 18 de Febrero de 2016, de <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/19513>
- Cruz, M., Melgarejo, L., & Romero, M. (2010). Fitohormonas. En M. Cruz, L. Melgarejo, & M. Romero, *Libro experimentos en fisiología y bioquímica vegetal* (págs. 39-40). Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 28 de Diciembre de 2015, de http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/content/laboratorios/fisiologiavegetal/documentos/Libro_experimentos_en_fisiologia_y_bioquimica_vegetal_Reparado_.pdf
- Cuesta, G., & Mondaca, E. (2014). Efecto de un biorregulador a base de auxinas sobre el crecimiento de plantines de tomate. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 20(2), 215-222. doi:dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2014.01.001
- Davies, P. (2010). *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction* (Tercera ed.). Ithaca, U.S.A.: Kluwer Academic Publishers.
- Dressler, R. (1982). *The Orchids: Natural History and Classification*. London: Harvard University, Smithsonian Institution.
- Dressler, R. (1993). *Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama*. New York, Estados Unidos de América: Cornell University Press.

- Duarte, M. (2013). *Transplante de epífitas entre Florestas Estacionais Semideciduais para enriquecimiento de florestas em processo de restauração*. Piracicaba: Universidad de Sao Paulo.
- Ecuagenera. (2009). *Orquídeas: Manual de cultivo*. Quito: Gráficas Hernández.
- Endara, L., & Jost, L. (2010). Orchidaceae. En S. León-Yáñez, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa, & H. Navarrete, *El libro rojo de las especies endémicas del Ecuador* (Segunda edición ed.). Quito, Ecuador: Herbario QCA, Pontificia Católica del Ecuador.
- Endara, L., & León-Yáñez, S. (2006). Orquídeas endémicas ecuatorianas: Implicaciones para la conservación. *First Scientific Andean Orchid Conference*. Gualaceo, Ecuador.
- Endara, L., Williams, N., & León-Yáñez, S. (2010). Explorando los patrones de endemismo de las orquídeas ecuatoriana: Implicaciones para su conservación. *X Congreso Latinoamericano de Botánica*. La Serena, Chile.
- Fraile, A., Álvarez-Herrera, J. G., & Deaquiz, Y. (2012). Efecto de las giberelinas en la propagación de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo diferentes sustratos enriquecidos con fertilizante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(1), 41-54.
- García, J., Sanchez, L., Jiménez, R., & Solano, R. (2003). Orchideaceae: Tribu Epidendreae. *Flora del Bajío y regiones adyacentes*(119), 33-34.
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G.-J. (Edits.). (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Vol. I). Dordrecht: Spinger.

- Gil Martinez, F. (1995). *Elementos de Fisiología Vegetal*. España: Mundi Prensa.
- Glick, B., Penrose, D., & Li, J. (1998). A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63–68. doi:10.1006/jtbi.1997.0532
- Gogoi, K., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). *Ex situ* conservation of *Cymbidium eburneum* Lindl.: a threatened and vulnerable orchid, by asymbiotic seed germination. *3 Biotech*, 2(4), 337–343. doi:10.1007/s13205-012-0062-8
- Hágsater, E. (2006). The Genus Epidendrum. En A. M. Orquideología, *Icones Orchidacearum* (pág. 803). México: Herbario AMO. Recuperado el 22 de Febrero de 2016, de http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Fascicle8.pdf
- Hajong, S., Kumaria, S., & Tandon, P. (2013). Effect of Plant Growth Regulators on Regeneration Potential of Axenic Nodal Segments of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1425-1435.
- Hew , C., & Clifford , P. (1993). Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. *Plant Growth Regulation*, 13(3), 231-239. doi:10.1007/BF00024843
- Hooley, R. (1994). Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Molecular Biology*, 26(5), 1529-1555. doi:10.1007/BF00016489
- Hopkins , W., & Hüner, N. (2008). *Introduction to Plant Physiology*. Ontario: Wiley.
- Hosomi, S., Custódio, C., Seaton, P., Marks, T., & Machado, N. (2012). Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following

storage. *In vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 48(1), 27-136. doi:10.1007/s11627-011-9404-1

Hossain, M., Sharma, M., Teixeira da Silva, A., & Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(2), 479–487. doi:10.1016/j.scienta.2009.10.009

Iturralde, G. (Agosto de 2015). Tráfico de Orquídeas. En J. B. Quito, *6to Curso Internacional de Orquídeas*. Conferencia llevada a cabo en el 6to Curso Internacional de Orquídeas, Quito.

Jiménez, R., & Hádsater, E. (2010). *Oncidium ornithorhynchum*, una especie mal interpretada y un nombre para una vieja especie *Oncidiym sotoanum*. *Lankesteriana*, 9(3), 411-422. Recuperado el 24 de Diciembre de 2015, de [http://www.lankesteriana.org/lankesteriana/Vol.9\(3\)/12%20Jimenez%20Machorro%20&%20Hagsater.pdf](http://www.lankesteriana.org/lankesteriana/Vol.9(3)/12%20Jimenez%20Machorro%20&%20Hagsater.pdf)

Jørgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. Missouri: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 75.

Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*, 15(5), 214-217.

Komalavalli, N., & Rao, M. V. (2000). *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre* – A multipurpose medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(2), 97–105. doi:10.1023/A:1006421228598

- Krapiec, P., Milaneze, M. A., & Machado, M. F. (2003). Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, 25(1), 179-182.
- Lecoufle, M. (2006). *Orquídeas*. Barcelona, España: Omega.
- Leite, V., & Hebling, S. (2007). Effect of giberellic acid (GA3) and light on the *in vitro* germination of *Cattleya warnerii* T. Moore seeds. *Natureza on line*, 5(2), 55-62. Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_leitevca_heblingsa_5562.pdf
- Lunelli, N., Kanashiro, S., & Tavares, A. (2015). Efeito de bioestimulante composto de cinetina, ácido indolbutírico e ácido giberélico em epífitas, visando a restauração florestal. *Hoehnea*, 42(2), 337-344. Recuperado el 12 de Febrero de 2016, de <https://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-39/2014>
- Machado, G., Moreira, J., Lopes, S., Silva, V., Yoshimitsu, S., Ferreira de Novais, R., & Cecon, P. (2002). Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas do grupo orquídea *Cattleya*. *Ceres*, 49(289), 613-628. Recuperado el 12 de Febrero de 2016, de <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/2839>
- Marija, M. (2003). *El gran libro de las orquídeas*. Barcelona, España: De Vecchi.
- Martin, K. P. (2003). Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipea malabarica* (Reichb. f.) J. D. Hook, an endangered orchid. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39(3), 323-324.

- 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*. Recuperado el 20 de noviembre de 2015, de División Académica de Ciencias Agropecuarias: <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf>
- Menchaca, R. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas*. Recuperado el 21 de Diciembre de 2015, de http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PRO_PAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF
- Menchaca, R., & Moreno, D. (2011). *Conservación de orquídeas, una tarea de todos*. Mexico: Universidad Autónoma Chapingo.
- Mendes, D., Sibov, S., & Faria, M. (2015). Influência dos ácidos naftaleno acético e ácido indol butírico (auxinas) no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Orchidaceae). *Revista Electrónica de la Universidad de Educación Araguaia*, 7(1), 13-15. Recuperado el 18 de Febrero de 2016, de <http://www.fara.edu.br/sipe/index.php/renefara/article/view/325>
- Menezes, T., Rodrigues, F., Asmar, S., & Pasqual, M. (2010). Sacarose e GA3 na Germinação de sementes no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de Goiabeira 'Pedro Sato'. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 6(2), 69-75.
- Mercier, H. (2004). Auxinas. En G. B. Kerbauy (Ed.), *Fisiologia Vegetal* (págs. 217-249). São Paulo: Guanabara Koogan S. A.

- Miller, C., Skoog, F., Okomura, F., von Saltza, M., & Strong, F. (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1345-1350. doi:10.1021/ja01588a032
- Ministerio de Turismo del Ecuador. (2013). *Oficialmente Ecuador es el país de las orquídeas*. Recuperado el 7 de diciembre de 2015, de <http://www.turismo.gob.ec/oficialmente-ecuador-es-el-pais-de-las-orquideas/>
- Ministerio de Turismo del Ecuador. (2014). *La “Maywa de Quito” es la orquídea emblemática de la capital ecuatoriana*. Recuperado el 14 de Diciembre de 2015, de *La “Maywa de Quito” es la orquídea emblemática de la capital ecuatoriana*: <http://www.turismo.gob.ec/la-maywa-de-quito-es-la-orquidea-emblematica-de-la-capital-ecuadoriana/>
- Mitra, G., Prasad, R., & Choudhury, A. (1976). Inorganic salts and differentiation of protocorm in seed callus of an orchid and correlated changes in its free amino acid content. *Indian Journal of Experimental Biology*, 14: 350–351.
- Nayak, N. R., Chand, P. K., Rath, S. P., & Patnaik, S. N. (1998). Influence of some Plant Growth Regulators on the growth and Organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. seed-derived rhizomes *in vitro*. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34(3), 185-188. doi:10.1007/BF02822706
- Nayak, N., Rath, S., & Patnaik, S. (1997). *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high

frequency shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*, 71(3-4), 243-250.
doi:10.1016/S0304-4238(97)00075-7

Nogueira, R., Pereira, O., Kasuya, M., Lanna, M., & Mendonça, M. (2005). Fungos micorrízicos asociados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19(3), 417-424.

Ogunsola, K. E., & Ilori, C. O. (2008). *In vitro* propagation of miracle berry (*Synsepalum dulcificum* Daniel) through embryo and nodal cultures. *African Journal of Biotechnology*, 7(3), 244-248.

Olaiya, C. (2010). Presowing Bioregulator Seed Treatments Increase the Seedling Growth and Yield of Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(3), 349–356. doi:10.1007/s00344-010-9142-3

Ori, S. (2006). *Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em Phalaenopsis amabilis (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada in vitro*. Sao Paulo: Instituto de Botânica.

Pedraza, J. (2007). Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación *in vitro* de *Masdevallia auropurpurea* Reich. *Revista Científica*(9), 117-141. Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de <http://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/revcie/article/view/354>>.

Pérez, J. (2004). *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en agricultura*. Santa Cruz, Panamá: ARTE Comunicación Visual.

Phyto Technology Laboratories. (2015). *Phyto Technology Laboratories*. Obtenido de <http://phytotechlab.com/>

- Pierik, R. (1997). *In vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht: Springer Science+Business Media , B.V.
- Pitman, N., Valencia, R., & León-Yáñez, S. (2000). *El libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (Segunda ed.). Quito: Publicacion del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Placencia, M. C. (2010). *Efecto de dos fitohormonas en la fase de introducción de la orquídea Epidendrum sp. bajo condiciones In vitro (tesis de pregrado)*. Imbabura, Ecuador: Universidad Técnica del Norte.
- Pritchard, H., & Prendergast, F. (1990). Viability testing in terrestrial orchid seed. *Acta Universitatis Wratislaviensis*, 11-16.
- Rademacher, W. (2015). Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. *Springer Science&Business Media*(34), 845–872. doi:10.1007/s00344-015-9541-6
- Rao, A. (1977). Tissue culture in orchid industry. En Y. Bajaj, & J. Reinert (Edits.), *Applied and Fundamental Aspects of Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. (págs. 44-69). Berlin: Springer-Verlag.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT.
- Rodríguez, A. (2013). *Inducción a la germinación in vitro de Epidendrum radicans Pav. ex Lindl (Tesis de Pregrado)*. México, Mexico: Unidad Nacional Autónoma de México.


- Rossetto, C., Coneglian, R., Nakagawa, J., Shimizu, M., & Marin, V. (2000). Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) em função de tratamento pré-germinativo. *Revista Brasileira de Sementes*, , 22(1), 247-252.
- Roy, A. R., Patel, R. S., Patel, V. V., Sajeev, S., & Deka, B. (2011). Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 325-331. doi:10.1016/j.scienta.2011.01.023
- Ruiz, T. (2010). *Evaluación de la tecnología Agcelencetm, Basf® usando el producto Opera Sc (Pyraclostrobin® + Epoxiconazol), para conocer su efecto en el desarrollo y producción del híbrido de maíz Pioneer (Tesis de pregrado)*. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica Superior del Litoral.
- Sabá, R. T., Lameira, O. A., Luz, J. M., Gomes, A. P., & Innecco, R. (2002). Micropropagação do jaborandi. *Horticultura Brasileira*, 20(1), 106-109.
- Salazar, A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 61(1), 69-78. Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/32463
- Salazar, M. (2004). El nombre de la Orquídea. *Ecuador Tierra Incógnita*, 31. Obtenido de http://www.terraecuador.net/revista_31/31_nombre_orquideas.htm
- Salisbury , F., & Ross, C. (2000). *Fisiología de las plantas*. Madrid: Paraninfo.

- Santos, M. R., Ferreira, M., & Marques, M. (2010). BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* Kunth. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 6(2), 90-98.
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2009). *Cultivo de orquídeas por semilla*. London: Botanic Gardens.
- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11, 118-131.
- Skoog, F., Strong, F., & Miller, C. (1965). Cytokinins. *Science*, 148(3669), 532-533. doi:10.1126/science.148.3669.523-a
- Smith, R. (2000). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments* (Second edition ed.). California, USA: Academic Press.
- Souza, A., Costa, M., Santos-Serejo, J., Junghans, T., & Souza, F. (2006). Introdução à cultura de tecidos de plantas. En A. Souza, & T. Junghans (Edits.), *Introdução a micropropagação de plantas* (págs. 11-35). Cruz das Almas: Embrapa.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (Vol. II). España: Publicaciones Universitat Jaume.
- The Plant List. (2013). *The Plant List: A working list of all plant species*. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de <http://www.theplantlist.org/>
- Tobar, F. (2009). *Ecuador país de Orquídeas, Provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsachilas*. Quito: Jardín Botánico de Quito, Herbario QCA de la Universidad Pontificia Católica del Ecuador.





- Valencia, J. (29 de Octubre de 2013). *Jardin Botánico de Bogotá*. Obtenido de <http://coleccion.es.jbb.gov.co/herbario/especimen/9438>
- Verdugo, G., Marchant, J., Cisternas, M., Calderón, X., & Peñaloza, P. (2007). Caracterización morfométrica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (Orchidaceae) usando análisis de imagen. *Gayana Botánica*, 64(2), 232-238.
- Vogel, I., & Macedo, A. (2011). Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(2), 147-155. doi:10.1007/s11240-010-9810-9
- Weaver, R. (1972). *Plant Growth Substance in Agriculture*. San Francisco: W.H. Ferrman and Company.
- Yam, T., & Arditti, J. (2009). History of orchid micropropagation: a mirror of the history. *Korean Society for Plant Biotechnology and Springer*, 3(1), 1-56.

Anexos

Anexo 1. Patente de manejo de vida silvestre “Jardín Botánico y vivero comercial Orquídeas de Sarina”.


Ministerio del Ambiente

**PATENTE DE MANEJO DE VIDA SILVESTRE
2015**

    	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%; text-align: center;">Número: 006-2015-FLO-DPAP-MA</td><td style="width: 50%; text-align: center;">Lugar y Fecha: Quito, 03 de agosto de 2015</td></tr></table> <p>La Dirección Provincial del Ambiente Pichincha del Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: Sara Gloria Gutiérrez Torres, CI: 170027824-3 representante legal del Jardín Botánico y vivero comercial Orquídeas de Sarina, para que realice en el país el manejo de flora silvestre, de acuerdo a las siguientes especificaciones:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Solicitud de renovación de patente presentada por: Sara Gloria Gutiérrez Torres, CI: 170027824-32. Valoración del informe anual y proyectos: Ing. Diego Morillo3. Complementos de manejo autorizados: Manejo de flora silvestre con fines comerciales y fines recreacionales.4. Contraparte institucional y responsabilidad técnica delegada a: Dirección Provincial del Ambiente Pichincha.5. Duración: 03 de agosto de 2015 al 02 de agosto de 20166. Inspección realizada al vivero y a las instalaciones del laboratorio: 04 de junio del 2015 por el Ing. Diego Morillo G.7. Obligaciones del beneficiario:<ol style="list-style-type: none">7.1. Llevar registro completo de: recolección, siembra, colecta, Cultivo, cosecha, acopio, procesamiento, comercialización, exportación e importación.7.2. Presentar un informe anual, incluyendo la planificación de trabajo del próximo año, para renovación de patente y aquella que fuera requerida por la autoridad en el transcurso del año.7.3. Regirse a las disposiciones citadas al reverso del presente documento.7.4. Facilitar información y permitir el acceso de los funcionarios del Ministerio del Ambiente a sus instalaciones para el respectivo control.7.5. Llevar un registro completo de actividades realizadas. <p style="text-align: center;"> Dr. Dario Del Salto Solís DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA</p>	Número: 006-2015-FLO-DPAP-MA	Lugar y Fecha: Quito, 03 de agosto de 2015
Número: 006-2015-FLO-DPAP-MA	Lugar y Fecha: Quito, 03 de agosto de 2015		

Luis Cordero N 752 y Av. 6 de Diciembre, Edificio Canopus Plaza
Telefax (593-2) 565741/ 563542 www.ambiente.gob.ec
Quito - Ecuador

Anexo 2. Ensayo de calibración de hormonas en tomate riñón.



Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 3. ANOVA en tomate riñón para el porcentaje de germinación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de p
Concentración	6	1933,33	322,22	16,92	0,0001**
Error	14	266,67	19,05		
Total	20	2200			

CV = 5,46

** = significativo al 5%

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 4. ANOVA en tomate riñón para la longitud de la raíz.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de p
Concentración	5	69,37	13,87	192,18	0,0001**
Error	12	0,87	0,07		
Total	17	70,24			

CV = 6,98

** = significativo al 5%

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 5. ANOVA en tomate riñón para longitud de plántulas.

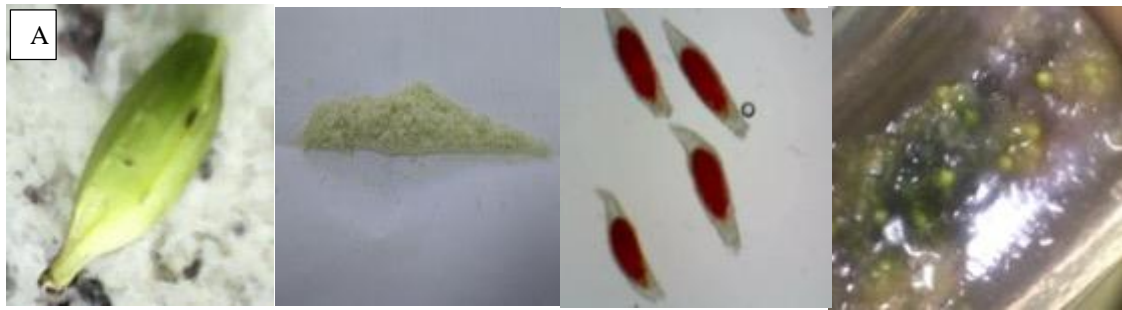
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de p
Concentración	5	59,13	11,83	83,45	0,0001**
Error	12	1,7	0,14		
Total	17	60,83			

CV = 7,86

** = significativo al 5%

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 6. Viabilidad de semillas de Orquídea.



Cápsula

Semillas

Prueba de tetrazolio

Protocormos

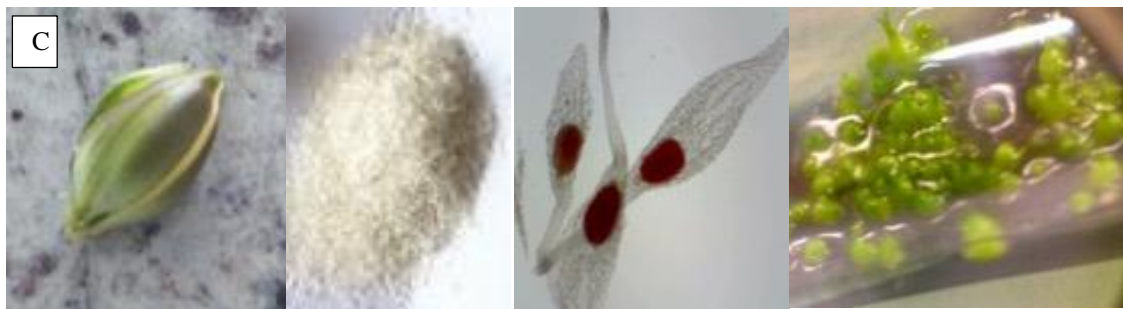


Cápsula

Semillas

Prueba de tetrazolio

Protocormos



Cápsula

Semillas

Prueba de tetrazolio

Protocormos

Nota: Selección de la muestra, análisis de viabilidad y germinación de las especies A) *Oncidium ornithorhynchum*, B) *Epidendrum jamiesonis* y C) *Epidendrum schistochilum*.
Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 7. ANOVA para la variable germinación de semillas en las especies *E. jamiesonis*, *E. schistochilum* y *O. Ornithorhynchum*.

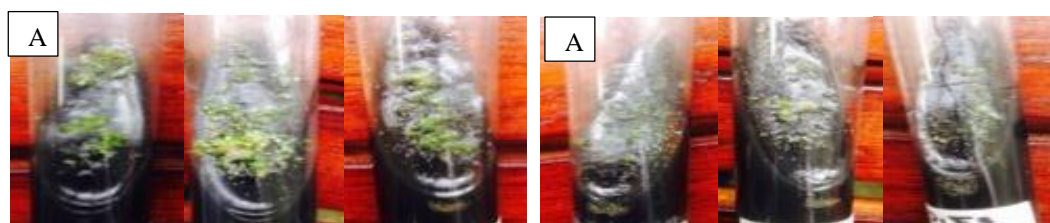
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de p
Especies	2	4790,64	2395,32	98,41	0,0001 **
Tratamientos	6	2873,11	478,85	19,67	0,0001 **
Especies*Tratamientos	12	772,02	64,33	2,64	0,0099 **
Error	42	1022,24	24,34		
Total	62	9458,00			

CV = 7,86

** = significativo al 5%

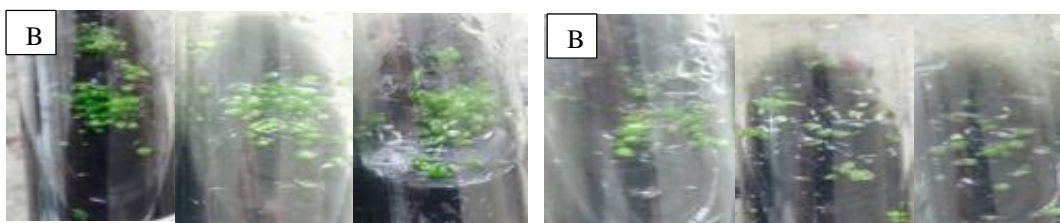
Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 8. Germinación de semillas de orquídea, por especie, tratamiento ideal y testigo.



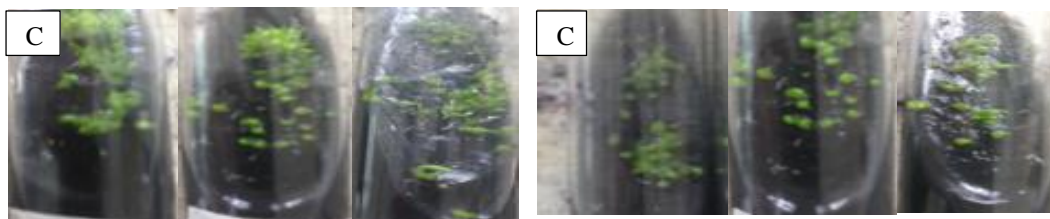
Tratamiento G5 (0,2mg/L)

Testigos



Tratamiento G4 (0,1mg/L)

Testigos



Tratamiento G4 (0,1mg/L)

Testigos

Nota: A) *Oncidium ornithorhynchum*, B) *Epidendrum jamiesonis*, C) *Epidendrum schistochilum*.

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 9. ANOVA en la especie *E. schistochilum*, *E. jamiesonis* para la variable longitud de raíz por efecto de IBA.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadraros	Cuadrado Medio	Valor de F	Valor de p
Especie	1	0,03	0,03	2,83	0,0959 ns
Tratamientos	5	0,09	0,02	1,83	0,1143 ns
Tratamientos*Especies	5	027	0,05	5,67	0,0001 **
Error	96	0,91	0,01		
Total	107	1,29			

CV = 9,12

** = significativo al 5%

ns = no significativo

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 10. ANOVA en la especie *E. schistochilum*, *E. jamiesonis* para la variable número de brotes por efecto de Kin.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadraros	Cuadrado Medio	Valor de F	Valor de p
Especie	1	0,67	0,67	4,31	0,0407 **
Tratamiento	5	3,53	0,71	4,56	0,0009 **
Tratamiento*Especie	5	0,73	0,15	0,94	0,4560 ns
Error	96	14,85	0,15		
Total	107	19,77			

CV = 23,17

** = significativo al 5%

ns = no significativo

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 11. ANOVA en la especie *E. schistochilum*, *E. jamiesonis* para la variable longitud de brotes por efecto de Kin.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadraros	Cuadrado Medio	Valor de F	Valor de p
Especie	1	0,45	0,45	3,80	0,0041 **
Tratamiento	5	1,17	0,23	8,66	0,0010 **
Tratamiento*Especie	5	0,55	0,11	4,51	0,0693 ns
Error	96	4,97	0,05	2,12	
Total	107	7,13			

CV = 16,55

** = significativo al 5%

ns = no significativo

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 12. ANOVA en la especie *E. schistochilum*, *E. jamiesonis* para la variable longitud de raíz por efecto de combinación de hormonas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F	Valor de p
Especies	1	0,11	0,11	4,83	0,0011 **
Tratamientos	13	0,90	0,07	10,95	<0,0001 **
Tratamientos*Especies	13	0,27	0,02	7,12	0,0126 **
Error	223	2,18	0,01	2,15	
Total	250	3,46			

CV = 9,17

** = significativo al 5%

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 13. ANOVA en la especie *E. schistochilum*, *E. jamiesonis*, para la variable longitud de brotes por efecto de combinación de hormonas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F	Valor de p
Especie	1	0,71	0,71	21,53	<0,0001 **
Tratamiento	13	1,12	0,09	2,59	<0,0001 **
Tratamiento*Especie	13	2,59	0,20	6,02	0,0023 **
Error	223	7,42	0,03		
Total	250	11,84			

CV = 11,62

** = significativo al 5%

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.

Anexo 14. ANOVA en la especie *E. schistochilum*, *E. jamiesonis* para la variable número de brotes por efecto de combinación de hormonas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F	Valor de p
Especie	1	3,71	3,71	22,85	<0,0001 **
Tratamiento	13	4,43	0,34	2,10	0,0152 **
Tratamiento*Especie	13	6,25	0,48	2,96	0,0005 **
Error	223	36,36	0,16		
Total	250	50,74			

CV = 20,69

** = significativo al 5%

Elaborado por C. Aucapiña y P. López, 2016.