

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

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

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

**TEMA:
ANÁLISIS QUÍMICO DE LA MADERA DE “BALSA” *Ochroma pyramidale* URB.
MALVACEAE Y DETERMINACIÓN DE SUS POSIBLES USOS COMO
SUSTRATO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* Y EXTERNO DE ORQUÍDEAS.**

**AUTORES:
CARLOS ANDRÉS CARLOZAMA LARREA
PABLO RENATO SALAS LEIVA**

**TUTOR:
MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

Quito, marzo de 2017

Cesión de derechos de Autor

Nosotros, Carlos Andrés Carlozama Larrea con documento de identificación N° 1718165911 y Pablo Renato Salas Leiva con documento de identificación N° 1718740648, expresamos 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: " **ANÁLISIS QUÍMICO DE LA MADERA DE "BALSA" *Ochroma pyramidale* URB. MALVACEAE Y DETERMINACIÓN DE SUS POSIBLES USOS COMO SUSTRATO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* Y EXTERNO DE ORQUÍDEAS.**", 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, 8 de marzo del 2017



Carlos Andrés Carlozama Larrea

CI. 1718165911



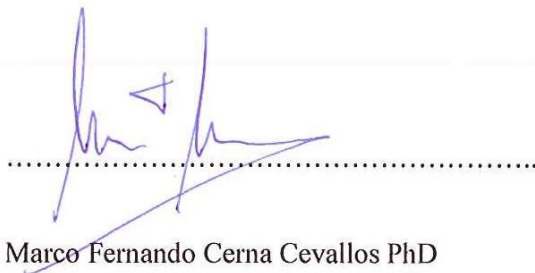
Pablo Renato Salas Leiva

CI. 1718740648

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el Trabajo experimental,
**“ANÁLISIS QUÍMICO DE LA MADERA DE “BALSA” *Ochroma pyramidale* URB.
MALVACEAE Y DETERMINACIÓN DE SUS POSIBLES USOS COMO
SUSTRATO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* Y EXTERNO DE ORQUÍDEAS.”**
realizado por Carlos Andrés Carlozama Larrea y Pablo Renato Salas Leiva, obteniendo un
producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica
Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, 8 de marzo del 2017



Marco Fernando Cerna Cevallos PhD

CI. 0501872071

Dedicatoria

A mis padres Rosy y Diego por ser un ejemplo de lucha, unión y perseverancia en la vida, además, de cada uno de sus consejos entregados con amor en lo largo de este camino. A Diana y Nadia por ser dos personas que entraron en mi vida y la cambiaron para seguir adelante, con su amor y con un nuevo título de padre. A mi hermano Juan Diego por su apoyo y buen ejemplo de responsabilidad. A mis mejores amigos Cristian, William, Ernesto y Pablo que me acompañaron en cada etapa de este camino. A mis compañeros por cada una de las experiencias compartidas haciéndolas únicas e inolvidables.

Andrés Carlozama

A mis padres Galo Salas y Miryan Leiva y mi hermana Dayana Salas, quienes me brindaron siempre su amor, apoyo y consejos, inculcándome valores para ser una mejor persona. Han sido mi fuente inspiración y la fuerza que me acompañó para cumplir todas las metas que me he propuesto a lo largo de mi vida. A mis mejores amigos Daniel, Ángel, Andrés y especialmente Berenice. Además de todos y cada uno de mis compañeros con quienes compartimos las aulas y de los cuales me llevo los mejores recuerdos para toda la vida.

Pablo Salas

Agradecimientos

En primer lugar, agradecemos a Dios por darnos esta oportunidad de cumplir una meta más en la vida. A nuestro tutor, el PhD. Marco Cerna, por todo el conocimiento que supo transmitirnos y la dedicación aportada a nuestra investigación. Al MsC. Jans Beltrán y la Ing. Cristina Aucapiña por su invaluable tiempo y apoyo para despejar varias dudas y ayuda en los problemas que surgieron durante la investigación.

Además de un sincero agradecimiento a la Señora Sara Gutiérrez y el Señor Alfredo Trujillo, representantes legales del “Jardín Botánico y vivero comercial Orquídeas de Sarina”, por su ayuda para la obtención del material vegetal utilizado en la presente investigación y por el trabajo realizado en sus instalaciones.

Finalmente, un agradecimiento a la Universidad Politécnica Salesiana, lugar donde adquirimos conocimientos suficientes y experiencia necesaria para superar los retos que se nos presente durante la vida.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco teórico	4
1.1 La Balsa en el Ecuador	4
1.1.1 Balsa	5
1.1.2 Descripción botánica y morfológica de <i>Ochroma pyramidale</i> Urb. MALVACEAE	5
1.1.3 Propiedades químicas de la balsa	6
1.2 Análisis Químicos	6
1.2.1 Cenizas	6
1.2.2 Extractos	7
1.2.3 Lignina Insoluble.....	7
1.2.4 Holocelulosa.....	7
1.2.5 α -Celulosa	8
1.2.6 Hemicelulosas	8
1.3. Análisis Físicos.....	8
1.3.1. Humedad	8
1.4. Las orquídeas.....	9
1.4.1 Morfología.....	9
1.4.2 <i>Sobralia rosea</i>	10
1.4.3 <i>Epidendrum jamiesonis</i>	10
1.4.4 <i>Epidendrum schistochilum</i>	11

1.5	Cultivo <i>in vitro</i>	11
1.6	Explante.....	11
1.7	Medio de cultivo.....	12
1.8	Aclimatación en cultivo <i>ex vitro</i>	12
1.9	Sustrato	13
Capítulo 2		14
Materiales y Métodos		14
2.1	Localización	14
2.2	Ensayos para la realización de las pruebas químicas sobre aserrín de balsa	15
2.2.1	Cenizas totales.....	15
2.2.2	Obtención de material libre de extractos.....	16
2.2.3	Lignina insoluble.....	17
2.2.4	Holocelulosa.....	18
2.2.5	α -Celulosa	19
2.2.6	Hemicelulosas	19
2.3	Ensayo para la realización de la prueba física sobre aserrín de balsa	20
2.3.1	Determinación del porcentaje de humedad retenido por el aserrín.....	20
2.4	Siembra <i>in vitro</i>	22
2.4.1	Especies experimentadas.....	22
2.4.2	Prueba de viabilidad de las semillas de orquídeas	22
2.4.3	Protocolo de desinfección de las semillas	23
2.4.4	Preparación de medios de cultivo con partículas de balsa de 850 μ m y 710 μ m	24

2.4.5	Siembra <i>in vitro</i> de semillas de <i>Sobralia rosea</i> y <i>Epidendrum schistochilum</i> ..	26
2.4.6	Tratamientos empleados para la siembra <i>in vitro</i>	27
2.4.7	Variables.....	28
2.4.8	Diseño experimental.....	28
2.4.9	Análisis estadístico.....	30
2.5	Adaptación a cultivo <i>ex vitro</i>	30
2.5.1	Elaboración de sustratos para adaptación y cultivo externo de orquídeas	30
2.5.2	Adaptación en recipientes plásticos	30
2.5.3	Tratamientos.....	33
2.5.4	Variables.....	33
2.5.5	Diseño experimental.....	33
2.5.6	Análisis estadístico.....	34
2.5.7	Evaluación.....	34
2.6	Mantenimiento.....	35
2.6.4	Riego	35
Capítulo 3		36
Resultados y discusión		36
3.1	Distribución de la balsa en Ecuador	36
3.2	Pruebas Químicas	36
3.2.1	Cenizas Totales	36
3.2.2	Lignina insoluble.....	37
3.2.3	Holocelulosa.....	38

3.2.4	α -Celulosa.....	39
3.2.5	Hemicelulosa.....	40
3.2.6	Discusión.....	41
3.3	Pruebas físicas	42
3.3.1	Porcentaje de humedad.....	42
3.3.2	Discusión.....	46
3.4	Análisis de viabilidad de semillas de orquídeas	47
3.5	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de orquídea.....	48
3.5.1	Porcentaje de germinación de semillas de <i>Sobralia rosea</i>	48
3.5.2	Porcentaje de germinación de semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	55
3.5.3	Discusión.....	62
3.6	Adaptación de plántulas de orquídeas a cultivos <i>ex vitro</i>	63
3.6.1	Discusión.....	66
	Conclusiones	68
	Recomendaciones.....	69
	Referencias bibliográficas.....	70
	Anexos	75

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Cantidades de reactivos para la preparación de un litro de medio de cultivo MS</i>	25
Tabla 2. <i>Diseño experimental para siembra de orquídeas sobre aserrín de balsa</i>	29
Tabla 3. <i>Esquema experimental de adaptación de plántulas en recipientes plásticos cerrados</i>	34
Tabla 4. <i>Porcentaje de cenizas totales</i>	36
Tabla 5. <i>Pesos de crisol con muestra a 105°C en función del tiempo para determinar lignina insoluble</i>	37
Tabla 6. <i>Pesos de muestras en función del tiempo para determinar Holocelulosa</i>	38
Tabla 7. <i>Pesos de muestras en función del tiempo para determinar α-Celulosa</i>	39
Tabla 8. <i>Valores promedio de compuestos químicos en madera de balsa</i>	40
Tabla 9. <i>Anova para el porcentaje de humedad en condiciones normales</i>	43
Tabla 10. <i>Prueba de Duncan al 5% para el porcentaje de humedad en de la balsa en condiciones normales</i>	43
Tabla 11. <i>Anova para el porcentaje de humedad en condiciones extremas</i>	44
Tabla 12. <i>Prueba de Duncan al 5% para el porcentaje de humedad en de la balsa en condiciones extremas</i>	45
Tabla 13. <i>Porcentaje de humedad promedio para distintos tamaños de aserrín de balsa en condiciones normales y condiciones extremas</i>	45
Tabla 14. <i>Porcentajes de viabilidad de semillas de especies de orquídeas</i>	47
Tabla 15. <i>Porcentajes de germinación en semillas de <i>Sobralia rosea</i></i>	49
Tabla 16. <i>Anova para el porcentaje de germinación en semillas de <i>Sobralia rosea</i></i>	50

Tabla 17. Prueba de Duncan al 5% de las interacciones de los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Sobralia rosea</i>	51
Tabla 18. Prueba de Duncan al 5% para el volumen de MS utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Sobralia rosea</i>	52
Tabla 19. Prueba de Duncan al 5% para la presencia o ausencia de carbón activado utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Sobralia rosea</i>	53
Tabla 20. Prueba de Duncan al 5% de la interacción Volumen de MS - Carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Sobralia rosea</i>	53
Tabla 21. Prueba de Duncan al 5% del tamaño de aserrín utilizado para la germinación de semillas de <i>Sobralia rosea</i>	54
Tabla 22. Prueba de Duncan al 5% de la interacción entre tamaño de aserrín y carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Sobralia rosea</i>	55
Tabla 23. Porcentaje de germinación en semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	55
Tabla 24. Anova para el porcentaje de germinación en semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	56
Tabla 25. Prueba de Duncan al 5% de las interacciones de los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	58
Tabla 26. Prueba de Duncan al 5% para el volumen de MS utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	59

Tabla 27. Prueba de Duncan al 5% para la presencia o ausencia de carbón activado utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	59
Tabla 28. Prueba de Duncan al 5% de la interacción Volumen de MS - Carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	60
Tabla 29. Prueba de Duncan al 5% del tamaño de aserrín utilizado para la germinación de semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	61
Tabla 30. Prueba de Duncan al 5% de la interacción entre tamaño de aserrín y carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de <i>Epidendrum schistochilum</i>	61
Tabla 31. Porcentaje promedio de crecimiento longitudinal del tallo especies de orquídeas	64
Tabla 32. Anova para el promedio de crecimiento longitudinal del tallo en <i>Epidendrum jamiesonis</i> y <i>Epidendrum schistochilum</i>	65
Tabla 33. Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en el crecimiento longitudinal del tallo en plantas de orquídea	65
Tabla 34. Prueba de Duncan al 5% para especies en el crecimiento longitudinal del tallo en plantas de orquídea	66

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de extracción de extractos en la muestra de aserrín mediante etanol-benceno (V/V)	17
Figura 2. Prueba de lignina insoluble para la determinación de las pruebas químicas en la madera de balsa	18
Figura 3. A) Muestras con reacción negativa a la prueba tetrazolium B) Muestras con reacción negativa a la prueba tetrazolium C) semilla tinturadas con tetrazolium sobre porta objetos.	23
Figura 4. Protocolo de desinfección de semillas de orquídeas realizado en la cámara de flujo laminar	24
Figura 5. A) Tubo de ensayo con balsa sin carbón activo y B) Tubo de ensayo con balsa con carbón activo.....	27
Figura 6. Sustrato elaborado a base de balsa en recipientes plásticos	31
Figura 7. Sustrato elaborado a partir de fibra de coco en recipientes plásticos	32
Figura 8. Sustrato elaborado a partir de <i>Sphagnum</i> en recipientes plásticos	32
Figura 9. Semillas con reacción positiva al Tetrazolium vistas al microscopio 10X.	48

Índice de anexos

Anexo 1. Patente del Jardín botánico de orquídeas de Sarina.....	75
Anexo 2. Día de inicio de germinación para cada tratamiento	76
Anexo 3. Porcentajes de germinación de <i>Sobralia rosea</i> y <i>Epidendrum schistochilum</i> en función del tratamiento sin el testigo.....	77
Anexo 4. Formación de plántulas en medio de 9 mL de MS con carbón activo en balsa de 710µm junto con el testigo	78
Anexo 5. Germinación de las semillas de orquídeas.....	79
Anexo 6. Crecimiento durante 60 días del tallo de <i>Epidendrum jamiesonis</i> en milímetros	80
Anexo 7. Crecimiento durante 60 días del tallo de <i>Epidendrum schistochilum</i> en milímetros.....	81
Anexo 8. Promedio del crecimiento longitudinal del tallo de <i>Epidendrum jamiesonis</i> y <i>Epidendrum schistochilum</i> en función del tipo de sustrato	82
Anexo 9. Cultivo externo de orquídeas.....	83

Resumen

En esta investigación se determinó la distribución de las poblaciones de balsa en el Ecuador, también se probó la viabilidad del uso de partículas de balsa en la composición de medios de cultivo *in vitro* para la germinación de semillas de *Sobralia rosea* y *Epidendrum schistochilum*, además del cultivo externo de plántulas de *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum*. Inicialmente se realizaron análisis químicos determinando la concentración de cenizas, lignina insoluble, holocelulosa, α -Celulosa y hemicelulosa, se evaluó la capacidad de retención de humedad. En relación al cultivo *in vitro* se probaron 13 tratamientos combinando diferentes volúmenes de MS, adición de carbón activado y partículas de balsa (850 μ m y 710 μ m). Además, se ensayó con partículas de 1,18 a 5 mm para elaborar sustratos de cultivo externo, comparando los resultados con sustratos de fibra de coco y *Sphagnum*. Se demostró la factibilidad del uso de partículas de balsa de 710 μ m con 9 mL MS y carbón activado, presentando un porcentaje de germinación de 87,54% y 87,15%. En el cultivo externo, los mejores resultados en base al crecimiento longitudinal del tallo se obtuvieron con partículas de balsa de 1,18 a 5 mm.

En conclusión, la balsa puede ser un buen sustituto de agentes gelificantes para elaborar medios de cultivo *in vitro*, y como base para sustratos de cultivo externo de orquídeas, por su resistencia a la descomposición, capacidad para retener el agua y buen soporte.

Palabras clave: balsa, cultivo *in vitro*, cultivo externo, orquídeas, Medio MS, sustratos.

Abstract

In this research the distribution of balsa populations in Ecuador was determined, also the viability of the use of balsa particles in the composition of culture media *in vitro* for the germination of seeds of *Sobralia rosea* and *Epidendrum schistochilum*, in addition to the external culture of seedlings of *Epidendrum jamiesonis* and *Epidendrum schistochilum*. Initially, chemical analyzes were performed determining the concentration of ash, insoluble lignin, holocellulose, α -Cellulose and hemicellulose, the moisture retention capacity was also evaluated. With regard to the *in vitro* culture, 13 treatments were tested combining different volumes of MS, addition of activated carbon and balsa particles (850 μ m and 710 μ m). In addition, it was tested with 1,18 to 5mm particles to make external culture substrates, comparing the results with coconut fiber and *Sphagnum* substrates. The feasibility of using 710 μ m balsa particles with 9 mL MS and activated carbon was demonstrated, with the germination 87,54% and 87,15%. In the external culture, based on longitudinal stem growth were obtained with balsa particles of 1.18 to 5 mm.

In conclusion, balsa can be a good substitute for gelling agents for *in vitro* culture media, and as a base for external orchid growing substrates because their resistance to decomposition, ability to retain water and good support.

Keywords: Balsa, *in vitro* culture, external culture, orchids, MS medium, substrates.

Introducción

Bastidas (2009), indica que las orquídeas son especies fanerógamas pertenecientes a la familia Orchidaceae, éstas se encuentran distribuidas por todo el mundo ya que poseen una gran capacidad de adaptación, el Ecuador cuenta con 219 géneros, 4125 especies clasificadas y 1301 especies endémicas.

Esta familia se presenta a nivel mundial de diferentes formas y colores, según el portal electrónico The Plant List (2013), existe un total de 27801 especies de orquídeas aceptadas y un total de 899 géneros descubiertos hasta el 2016.

En el manual de orquídeas escrito por Díaz-Toribio (2013), se menciona que las orquídeas necesitan sustratos de madera como la corteza del pino que es un material orgánico y ligero el cual absorbe bien el agua y facilita su drenaje. La corteza de pino presenta características químicas que permiten un buen desarrollo para estas especies, un componente principal es la lignina que puede estar entre el 47,7% y 60,0% dependiendo de la variedad de pino, como se detalla en el estudio de Rodríguez & Torres (1994).

Otro sustrato es la fibra de coco, este posee características óptimas para el crecimiento y germinación de las orquídeas, los estudios realizados por la Asociación Costarricense de Orquideología (2008, pág. 5) y la investigación de Serrano (2009), mencionan la eficacia de la fibra de coco como sustrato. En este contexto, las características morfológicas de los poros de la madera de balsa permiten retener cantidades importantes de agua por lo cual almacena líquidos por largos períodos; la madera de balsa recién cortada presenta un porcentaje de humedad que puede ir desde el 200% al 400% referido en base seca (Moreira, 2013).

“En el Ecuador la madera de balsa se emplea exclusivamente para la industria maderera, debido a sus diversos usos y también por sus propiedades aislantes” (Osorio, Molina, Navarrete, Fonseca, & Simba, 2010). También se emplea para la construcción de aviones, de partes de automóviles, barcos, y acabados de construcción (Balsebot International INC, 2013). La balsa se destaca por su lenta descomposición frente a condiciones de humedad alta, presentando resistencia al agua (González, Cervantes, Torres, Sánchez, & Simba, 2010). Además “la balsa posee una gran demanda en el mercado internacional, por la calidad que ésta presenta, el Ecuador es el mayor exportador de esta especie alcanzando un porcentaje del 95%” (Pérez, 2012).

La madera de balsa se encuentra distribuida en México, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil hasta Paraguay, en el Ecuador se distribuye en la región costera y en la Amazonía, esta se cultiva desde los 0-1000 msnm, soportando 1500-3000 mm de precipitación (Ecuador forestal, 2012).

Las características de la madera de balsa, la convertirían en una alternativa válida para la elaboración de un sustrato para orquídeas, debido a que presenta una lenta descomposición y una mayor cantidad retención de humedad siendo un medio óptimo para estas plantas.

En base a lo expuesto se plantea como objetivo principal de este estudio, determinar la viabilidad de las partículas de madera de balsa *Ochroma pyramidale* Urb. MALVACEAE como posible medio de cultivo *in vitro* y sustrato externo de orquídeas, para lo cual se determinó la ubicación de las plantaciones de madera de balsa en el Ecuador, continuando con el análisis químico y físico a esta madera con el fin de determinar la calidad de la misma.

Para la determinación de la humedad se realizó un DCA con 4 tratamientos para cada condición. Además, de un ANOVA y prueba de Duncan al 5% para determinar si existe diferencia significativa. Como variable independiente se consideró el tamaño de partícula y la variable dependiente fue la cantidad de humedad retenida.

En la germinación *in vitro* se realizó un DCA con 13 tratamientos para cada especie y ANOVA con una prueba de Duncan al 5%, teniendo como variables independientes el tamaño de aserrín de balsa, el volumen de MS y la presencia-ausencia de carbón activado. La variable dependiente fue el porcentaje de germinación.

En el cultivo externo se llevó a cabo un DCA con 6 tratamientos mediante la utilización de partículas de balsa, fibra de coco y *Sphagnum*. Se realizó análisis estadístico ANOVA y una prueba de Duncan al 5%, la variable dependiente fue el tipo de sustrato mientras que la variable dependiente fue el crecimiento longitudinal del tallo.

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico Infostat.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1 La Balsa en el Ecuador

El Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones (2012), indica que el cultivo de balsa requiere de climas cálidos y húmedos para un óptimo desarrollo. Además, menciona que este cultivo requiere suelos con características edafológicas especiales, demandando cantidades altas de nutrientes, además de que el suelo se encuentre correctamente drenado. Parra (2016, pág. 42), señala que para el año 2013 se creó el Programa de Incentivos para Forestación y Reforestación con fines comerciales dentro del cual se encontraba incluida la balsa, también señaló que La Corporación Financiera Nacional proyectó 20000 ha para el cultivo de balsa, de las cuales se sembraron 16000 ha, que equivale a aproximadamente a 16 millones de árboles y la meta a alcanzar sería un incremento del 5% anual.

En el Ecuador la balsa se encuentra distribuida ampliamente en la región Amazónica, Sierra, Costa y Galápagos (Jorgensen & León-Yáñez, 1999). En la región costa se encuentra en las provincias de Esmeraldas, Guayas, Manabí y los Ríos, en la región amazónica se encuentra en Morona Santiago, Pastaza, Orellana, Napo, Zamora Chinchipe y Sucumbíos, en la sierra se encuentra en Imbabura y Pichincha y en la región Insular (Trópicos, 2017).

1.1.1 Balsa

La balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. MALVACEAE, es una especie autóctona de la región amazónica del Ecuador, se distribuye por zonas tropicales y de temperatura cálido-húmedo de América, esta especie es de rápido crecimiento y tiene un amplio interés económico en el mercado internacional debido a sus distintos usos (Pérez, 2012).

Anteriormente la balsa pertenecía a la familia Bombacacea según Jorgensen & León-Yáñez (1999). En la actualidad, se la ubicó dentro de la familia Malvaceae presentando varios sinónimos como *Bombax pyramidale* Cav. ex Lam., *Ochroma bicolor* Rowlee, *Ochroma pyramidale* var. *bicolor* (Rowlee) Brizicky, *Ochroma pyramidale* var. *concolor* (Rowlee) R.E.Schult (The Plant List, 2013).

1.1.2 Descripción botánica y morfológica de *Ochroma pyramidale* Urb.

MALVACEAE

La balsa es un árbol que alcanza hasta 30 m de altura y 70 cm de DAP (Vinuela, 2012). Presenta un tronco recto y cilíndrico con raíces tabulares grandes (Ecured, 2013). Tiene una corteza externa gris, lisa con hojas simples, alternas, pentalobuladas, grandes, pubescentes por el envés, con el pecíolo casi del tamaño de la lámina foliar (Morales & Varón, 2006). Sus Flores son grandes, blancas y campanuladas y con un fruto en forma de cápsula dehiscente, las semillas pequeñas, negras se encuentran rodeadas por una lana (Vinuela, 2012).

1.1.3 Propiedades químicas de la balsa

La balsa presenta diversas propiedades químicas que son de gran utilidad para la elaboración de sustratos para orquídeas, muchas de estas son descritas por Honorato-Salazar y Colaboradores (2015, págs. 133-134), que sugieren su factibilidad para el uso como base en sustratos para el cultivo *in vitro* y externo de orquídeas.

1.2 Análisis Químicos

Son técnicas empleadas para determinar la composición química de un material o muestra, esta técnica permite obtener información sobre los elementos que se encuentran presentes en la muestra previamente analizada y de esta manera conocer los distintos componentes mayoritarios, minoritarios y trazas de elementos (Tecnalia, 2016).

1.2.1 Cenizas

Según Pacheco (2002), las cenizas son las sustancias inorgánicas que se pueden determinar por incineración del material entre 575 y 850°C. En la interpretación otorgada por Ecured (2012), la ceniza de la madera o cualquier material vegetal similar, consiste principalmente en carbonato de sodio y carbonato de potasio, el contenido de ceniza en la madera seca varía desde un 2% en peso para la balsa, a un 0,2% para la secuoya.

1.2.2 Extractos

Los extractos se definen como un preparado de distinta consistencia, esta puede ser sólida, líquida o blanda todos estos derivados generalmente de material vegetal desecado, la forma de obtención es mediante una evaporación parcial o total del disolvente en los líquidos de extracción vegetal (Carrión & García, 2010, pág. 30).

1.2.3 Lignina Insoluble

Pacheco (2002), señala que la lignina es el polímero más abundante en el mundo vegetal después de la celulosa, y su función es asegurar protección contra la humedad y los agentes atmosféricos además de actuar como elemento aglomerante de las fibras. La lignina junto con la celulosa forma la pared celular y forma parte del material de relleno de las células, dando rigidez a la planta (Botánica online, 2016).

1.2.4 Holocelulosa

Según la definición de Vctrac (2016), la holocelulosa es un complejo de celulosa y hemicelulosas formado por eliminación de la lignina de los materiales vegetales lignocelulósicos. Según Fonseca (2006, pág. 28) el contenido de holocelulosa presente en la madera representa un total del 70-90% de las sustancias que se encuentran en la pared celular libre de extractos.

1.2.5 α -Celulosa

La α -Celulosa indica la cantidad de celulosa no degradada que posee un alto peso molecular (Citroni, y otros, 2007).

1.2.6 Hemicelulosas

Según Roig (2011), la hemicelulosa es un polisacárido no celulósico que comprende varios componentes de diferente composición química y estructura molecular, siendo las más importantes los xylanos y los glucanos, la hemicelulosa comprende el 25% de la materia seca de la pared celular y tiene propiedades diferentes a las de la celulosa.

1.3. Análisis Físicos

Los análisis físicos son una serie de pruebas cuyo fin es determinar las propiedades mecánicas de un material (Everest Sociedad Anónima, 2014).

1.3.1. Humedad

Según lo descrito por Maldonado (2003, pág. 5), la humedad es el método para determinar la cantidad de agua presente en la muestra. Se basa en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una estufa, refiriendo su peso al peso total de la muestra y expresada como porcentaje.

1.4. Las orquídeas

El autor Bastidas (2009), indica que las orquídeas son especies fanerógamas pertenecientes a la familia Orchidaceae, éstas se encuentran distribuidas por todo el mundo ya que poseen una gran capacidad de adaptación, de las cuales el Ecuador presenta 219 géneros, 4125 especies clasificadas y 1301 especies endémicas. La mayoría de las orquídeas se encuentran en las regiones tropicales de América Central y América del Sur, África, Madagascar, Asia y Nueva Guinea (Kuhns, 2016).

Las orquídeas en el Ecuador fueron exploradas desde el fin de la segunda guerra mundial donde distintos investigadores internacionales especialmente de Estados Unidos y Suecia realizaron exploraciones en el país (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2013).

1.4.1 Morfología

La estructura de las orquídeas en general la describe Nauray (2013, pág. 8), como hierbas con raíces fasciculadas, es decir que carecen de una raíz principal, las raíces presentan tamaños y diámetros similares, además en la gran mayoría de especies es común el velamen, una capa que protege la raíz y tiene la capacidad de almacenar agua. Los tallos pueden ser simples, modificados como tubérculos, rizomas o pseudobulbos (Freuler, 2008, pág. 11). Las hojas son alternas, envainadoras y presentan nervaduras paralelas (Nauray, 2013, pág. 8). Las flores pueden ser solitarias o en inflorescencia en racimo o panícula, presentan tres sépalos y tres pétalos, el pétalo mediano es mayor, más colorido y conocido como labelo (Singer, 2009, pág. 339). La ubicación del ovario es inferior y puede ser unilocular o trilocular, el androceo y gineceo se encuentran

fusionados (Nauray, 2013, pág. 8). Los frutos se presentan en forma de cápsulas septicidas dehiscentes, las semillas son microscópicas y carecen de endosperma (Singer, 2009, pág. 340).

1.4.2 *Sobralia rosea*

Esta orquídea es de tipo terrestre, que posee una distribución por diversos países de Latinoamérica como son Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, principalmente ocupando los bosques húmedos, crece desde los 0 hasta los 2000m.s.n.m, en la zona del Ecuador florece todo el año pero principalmente en los meses de Enero hasta Abril, los tallos de esta especie alcanza hasta los 3 m, presentando grandes flores que duran de 2 a 8 días, tienen sépalos y pétalos de color blanco-rosa, y además un labelo de color rosado oscuro a púrpura (GAD municipal de Limón Indaza, 2015).

1.4.3 *Epidendrum jamiesonis*

Esta especie se localiza a una altura que va desde los 2000 metros hasta los 3500 m.s.n.m, fue descubierta en la ciudad de Quito provincia de Pichincha, es una especie que se adapta fácilmente, presenta tallos quebradizos y un color púrpura en sus flores (Cerna, Aucapiña, & López, 2016, pág. 12).

1.4.4 *Epidendrum schistochilum*

Ubicada en Colombia y Ecuador a una altura de 900 a 2500 m.s.n.m, siendo esta especie una orquídea terrestre que presenta un tamaño grande y gigante, con tallos erectos, simples a ligeramente ramificados, obtusos oblongos ligulados, estrechándose en el peciolo, presenta hojas alargadas que florecen en el invierno en la parte terminal, racemosa, con inflorescencias floreadas con líneas lanceoladas lineales, acuminadas (Internet Orchid Species Photo Encyclopedia, 2017).

1.5 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* abarca un sentido muy amplio en cuanto a su definición, y como lo señala Roca & Mroginski (1991, pág. 20), es todo el conjunto de técnicas por las cuales, bajo métodos de asepsia se cultiva cualquier tipo de explante sobre un medio específico y de composición química establecida para cada uno de ellos, el cultivo *in vitro* comprende distintas técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

1.6 Explante

Morcillo, Cortés , & García (2013), indican que para que exista un apropiado crecimiento del cultivo vegetal es de mucha importancia que se elija el tipo de explante. Éste es cualquier parte o pequeña pieza del tejido tomado de la planta madre. Para esto

es necesario tener en cuenta que sea capaz de generar una rápida proliferación, como es el caso de ápices, yemas o semillas. Es decir material vegetativo que se encuentra en un continuo ciclo de división celular.

1.7 Medio de cultivo

Abdelnour & Vincent (1994, pág. 8), lo describe como la combinación de varias sustancias que permiten mantener la viabilidad en el cultivo de tejidos, además de promover una diferenciación celular y el continuo crecimiento y multiplicación *in vitro*, mediante una composición equilibrada de hormonas y nutrientes. Entre los componentes del medio de cultivo se encuentran los minerales, sustancias orgánicas (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas), preparaciones complejas para el enriquecimiento y materiales de soporte como gelificantes.

1.8 Aclimatación en cultivo *ex vitro*

El paso de plántulas *in vitro* a condiciones de cultivo *ex vitro* es una etapa primordial en el proceso de micropropagación. De este proceso dependerá la supervivencia de las plántulas y la calidad dentro de procesos de producción. Díaz, Medina, Lafite, Digonzelli, & Sosa (2004), priorizan ésta etapa ya que permite que la planta pueda alcanzar un desarrollo en un ambiente que presente un menor porcentaje de humedad relativa en comparación con el cultivo *in vitro*, además de una variación en la composición del sustrato y la cantidad de luz a la que es expuesta. La elección del sustrato adecuado es directamente proporcional a la eficiencia del proceso de adaptación

y depende de una combinación equilibrada de los componentes del sustrato para lograr que exista el crecimiento autótrofo esperado.

1.9 Sustrato

El sustrato es el medio que da soporte a las raíces de plantas. Para Quintero, González, & Guzmán (2011), el sustrato tiene las funciones de anclaje y fijación de raíces lo que evita que sean expuestas a la luz, ayuda a la respiración de éstas y puede o no contener agua y nutrientes, además puede ser de naturaleza orgánica, sintética o mineral, este puede contener materiales que sean inertes o activos que ayuden a una correcta nutrición mineral e hídrica de la planta, para la selección del sustrato adecuado depende de las características de la planta que se va a sembrar y de las características medioambientales.

Un sustrato funciona como medio de composición que según Cabrera (2002), debe poseer características físicas óptimas para poder utilizarlo, tales como aireación, drenaje, retención de agua y bajo peso húmedo para que las plantas sembradas puedan germinar y crecer con facilidad. Los autores Berjon, Murray & Carrión (2004, págs. 133-158), señalan que un sustrato es todo material sólido distinto del suelo *in situ*, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta y que este puede intervenir o no en la nutrición vegetal.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Localización

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana campus El Girón, ubicada en la ciudad de Quito. La balsa fue obtenida de la empresa Gibago Cía. Ltda., ubicada en la parroquia rural Puembo, provincia de Pichincha.

Las muestras vegetales fueron obtenidas del jardín botánico “Orquídeas de Sarina” patente N° 006-2015-FLO-DPAP-MA, emitida el 3 de agosto del 2015 en la ciudad de Quito. Quienes facilitaron material al proyecto “Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel *in vitro*” desarrollado por Cristina Aucapiña y Paul López 2016, los cuales cedieron material para desarrollar el cultivo externo.

Para el cultivo *in vitro* las cápsulas de orquídeas fueron obtenidas del jardín botánico “Orquídeas de Sarina” patente N° 005-2017-FLO-DPAP-MA (Anexo 1), emitida el 14 de febrero del 2017 en la ciudad de Quito.

Las especies cedidas con las que se realizó la investigación fueron: *Sobralia rosea* y *Epidendrum schistochilum* (cápsulas), y *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum* (plántulas). La duración de la investigación fue de siete meses, iniciando en mayo del 2016 y finalizando en Noviembre del 2016. Los primeros 4 meses fueron empleados para la realización de pruebas químicas sobre madera de balsa y el cultivo *in*

vitro de semillas, mientras que el tiempo restante fue empleado en la elaboración de cultivos externos para la adaptación de plántulas y su monitoreo.

2.2 Ensayos para la realización de las pruebas químicas sobre aserrín de balsa

La madera de balsa usada para la experimentación fue previamente fraccionada en un molino (Edible Pulp Milling Machine DM-WP150II) y separada por tamaños con la ayuda de tamices número 16 (1,18mm), 20 (850 μ m) y 25 (710 μ m). El aserrín de balsa empleado en las pruebas químicas fue de tamaño 710 μ m de tamiz número 25.

La metodología aplicada para las pruebas químicas se desarrolló en base a lo descrito por Honorato-Salazar y Colaboradores (2015), incluyendo algunas modificaciones, además de tomar en cuenta los métodos estandarizados provenientes de la Asociación técnica para la industria de la pulpa y el papel (Technical Association of the Pulp and Paper Industry TAPPI).

2.2.1 Cenizas totales

Se usó la metodología descrita por TAPPI (2006-2007): se pesó 1 g de aserrín de balsa obtenida del tamiz número 25 (710 μ m) y se lo colocó dentro de un crisol previamente tarado en estufa (Mettler) a 100°C. La muestra se colocó en la estufa a 60°C por 40 min y se tomó el peso del crisol con la muestra. Luego en la mufla (Thermo SCIENTIFIC F48010) se colocó el crisol con aserrín y se mantuvo a una temperatura de 575°C durante 8 horas, controlando que no se genere llamas, para lo cual se aumentó gradualmente la temperatura desde los 100°C hasta llegar paulatinamente a los 575°C.

Transcurridas las 8 horas se esperó a que se enfríe y se colocó la muestra en el desecador por 1 hora para finalmente ser pesada nuevamente. Se realizó tres repeticiones del ensayo.

2.2.2 Obtención de material libre de extractos

En base al método de Honorato-Salazar y Colaboradores (2015): se usaron 16 g de aserrín de balsa de tamaño 710 μ m, los cuales fueron secados previamente en la estufa a una temperatura de 105 °C durante 30 min. Posteriormente, se realizaron 2 extracciones secuenciales en un equipo de destilación Soxhlet por 5 horas (figura 1). La primera extracción fue de etanol-benceno con relación 1-2 (v/v) y la segunda únicamente de etanol. En cada extracción se utilizó 8 g de aserrín de balsa. Terminado el proceso, la balsa se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se añadió 500 mL de agua destilada hirviendo para después ser mantenido en baño maría a la temperatura de ebullición durante una hora. Para finalizar se realizó una filtración al vacío y se dejó secar a temperatura ambiente obteniendo un material libre de extractos.

Equipo de destilación Soxhlet



Muestra de aserrín de balsa

Etanol

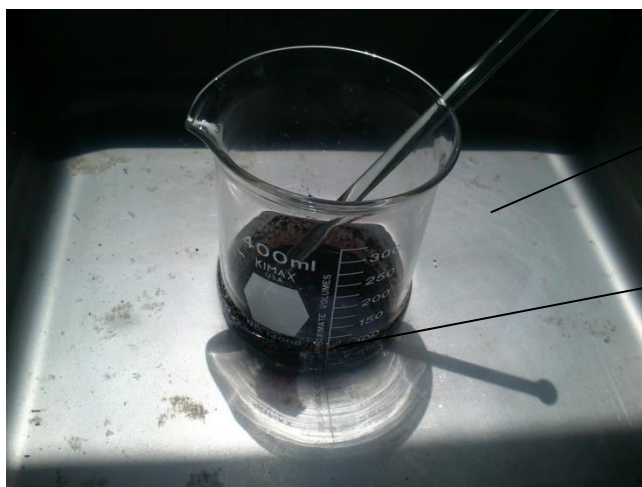
Benceno

Figura 1. Proceso de extracción de extractos en la muestra de aserrín mediante etanol-benceno (V/V)
Fotografía: Realizado por los autores (2016)

2.2.3 Lignina insoluble

En base al método descrito por TAPPI (2006-2007): se utilizó un g de aserrín de balsa libre de extractos el cual se lo colocó en un vaso de precipitación de 400 mL y se añadió 15 mL de ácido sulfúrico con una concentración del 72%. Una vez mezclado se lo dejó en baño maría a una temperatura de 20°C durante 2 horas con agitación cada 15 min (figura 2). Transcurridas las 2 horas el contenido del vaso fue traspasado a un matraz Erlenmeyer en el cual se colocó un volumen de 560 mL de agua destilada y se calentó a reflujo durante 4 horas. Al terminar, el contenido del matraz que se filtró al vacío fue lavado con 100 mL de agua destilada caliente. Finalmente, el residuo se pesó y dejó secar en la estufa a una temperatura de 105°C hasta que alcanzó un peso constante.

Prueba de la cantidad de lignina insoluble presente en la balsa



Agitación en baño

Solución de ácido
sulfúrico al 72%
más aserrín de
balsa

Figura 2. Prueba de lignina insoluble para la determinación de las pruebas químicas en la madera de balsa
Fotografía: Realizado por los autores (2016)

2.2.4 Holocelulosa

En base al método de Honorato-Salazar y Colaboradores (2015): se destinó 2,5 g de aserrín de balsa libre de extractos obtenidos mediante la extracción con etanol. El aserrín fue colocado en un matraz Erlenmeyer de 500 mL al que se le añadió 80 mL de agua destilada caliente, 80 mL de ácido acético y un g de clorato de sodio. El matraz fue tapado con un vidrio reloj y se lo colocó en baño maría a 75°C por una hora. Transcurrido el tiempo se agregaron 0,5 mL de ácido acético y un g de clorito de sodio, estos fueron mezclados y mantenidos durante una hora a 75°C en baño maría. Este proceso se repitió cuatro veces, una vez por hora. La solución se dejó enfriar con agua y se filtró al vacío. El producto fue lavado con 120 mL de agua destilada, 80 mL de etanol y 150 mL de acetona. Para finalizar, el producto filtrado se colocó en un crisol y se lo llevó a la estufa a una temperatura de 105°C hasta que éste alcanzó un peso estable.

2.2.5 α -Celulosa

En base al método de Rowell y Colaboradores (2005, págs. 35-74) se colocaron 2 g de material resultante de la prueba de holocelulosa en un vaso de precipitación al cual se añadió 10 mL de hidróxido de sodio al 17,5% de concentración y fue cubierto con un vidrio reloj. Se colocó en un baño maría a una temperatura de 20°C, se le agregó 5 mL de hidróxido de sodio al 17,5% cada 5 min hasta alcanzar un total de 25 mL y se dejó en reposo por 30 min. Se incorporó 33 mL de agua destilada y se dejó reposar una hora antes de filtrar al vacío. El producto de la filtración fue lavado con 100 mL de hidróxido de sodio al 8,5% y agua destilada. Luego de filtrarlo, se añadió 15 mL de ácido acético al 10% durante 3 min. Finalizado el tiempo se lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y se continuó con la filtración al vacío. El producto fue secado en una estufa a una temperatura de 105°C hasta que el peso reportado fue constante.

2.2.6 Hemicelulosas

En base al método de Honorato-Salazar y Colaboradores (2015): el cálculo del contenido de hemicelulosas fue obtenido a partir de la diferencia entre los valores obtenidos en la prueba de holocelulosa y los obtenidos en la prueba de α -Celulosa.

2.3 Ensayo para la realización de la prueba física sobre aserrín de balsa

2.3.1 Determinación del porcentaje de humedad retenido por el aserrín

Teniendo los 4 tamaños de aserrín de balsa, se pesaron 5 g de cada uno y se los colocó en un crisol previamente pesado. Se les añadió 30 mL de agua destilada a cada crisol. Se determinó el porcentaje de humedad en condiciones normales (temperatura ambiente) y en condiciones extremas, en donde los crisoles fueron ingresados a la estufa a una temperatura de 80°C por 120 min. Una vez transcurrido el tiempo se colocó los crisoles en el desecador por 2 horas y fueron pesados (Cerna, Determinación del porcentaje de humedad, 2016).

2.3.1.1 Tratamientos

Se emplearon 4 tratamientos:

Condiciones normales:

T1: 710µm de aserrín de balsa

T2: 850µm de aserrín de balsa

T3: 1,18mm de aserrín de balsa

T4: aserrín de balsa mayor a 2mm

Condiciones extremas:

T1: 710µm de aserrín de balsa

T2: 850 μ m de aserrín de balsa

T3: 1,18mm de aserrín de balsa

T4: aserrín de balsa mayor a 2mm

2.3.1.2 Variables

Variables independientes: Tamaño del aserrín de balsa

Variables dependientes: Porcentaje de humedad retenida por el aserrín de madera de balsa

2.3.1.3 Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 1x4 con 3 repeticiones. Existieron 4 tratamientos para cada condición.

Como unidad experimental se consideró cada crisol con aserrín de balsa. En total existieron 24 unidades experimentales.

2.3.1.4 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con pruebas de significancia de Duncan al 5% para determinar si existió diferencia significativa entre los tamaños de aserrín de balsa.

2.4 Siembra *in vitro*

2.4.1 Especies experimentadas

Fueron empleadas dos especies, *Sobralia rosea* (Sr1) y *Epidendrum schistochilum* (Es1). Para la extracción de las semillas se tomó cápsulas maduras y se realizó cortes longitudinales a lo largo de estas para poder abrirlas. Las semillas fueron extraídas con pequeños golpeteos sobre la cápsula. Las semillas extraídas de cada cápsula fueron colocadas en sobres individuales elaborados a partir de papel filtro, los cuales se etiquetaron con la codificación de cada especie Cerna y Colaboradores (2014).

2.4.2 Prueba de viabilidad de las semillas de orquídeas

Se usó el método descrito por Machado-Neto y Colaboradores (2012): se tomó una pequeña cantidad de semillas con una pinza, asegurándose de que existan al menos 100 semillas y se las colocó dentro de tubos eppendorf de 1,5 mL de capacidad. A cada micro tubo se le añadió una solución de sucrosa al 10% y se la mantuvo a temperatura ambiente por 24 horas. Trascurrido este tiempo, se extrajo la solución de sucrosa con la ayuda de una micropipeta evitando la pérdida de semillas. Luego se colocó 1 mL de solución de tetrazolium al 1%, estos tubos fueron mantenidos durante 24 horas a una temperatura de 40°C en baño maría; posteriormente la solución fue extraída y reemplazada con 1 mL de agua destilada, inmediatamente se realizó el conteo de semillas con un estéreo - microscopio. Las semillas que se tornaron color rosa (figura 3) son las que se consideraron como viables.

Prueba de viabilidad de las semillas de orquídeas

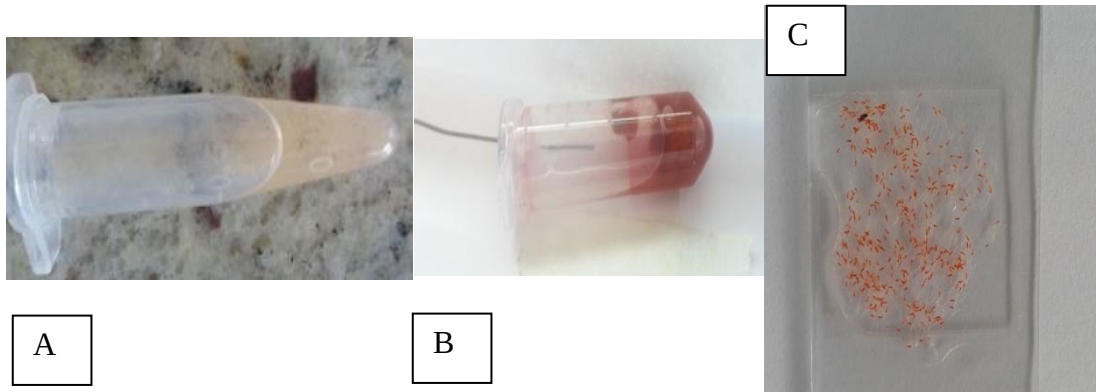


Figura 3. A) Muestras con reacción negativa a la prueba tetrazolium B) Muestras con reacción negativa a la prueba tetrazolium C) semilla tinturadas con tetrazolium sobre porta objetos.
Fotografías: Realizado por los autores (2016)

2.4.3 Protocolo de desinfección de las semillas

De acuerdo al método descrito por Cerna y Colaboradores (2016, pág. 14), este protocolo se realizó sobre las semillas que presentaron el mayor porcentaje de viabilidad. Se lo llevó a cabo en la cámara de flujo (figura 4) y se utilizó jeringas de 10 mL de capacidad en donde se introdujeron las semillas. Para empezar se tomó una solución de hipoclorito de sodio al 3% con la jeringuilla y se la mantuvo durante 4 min con una agitación constante. Al finalizar el tiempo se eliminó la solución de hipoclorito y se lavó con agua destilada dos veces.

Posteriormente, se utilizó alcohol al 70% en la misma jeringuilla y se mantuvo por un lapso de 1 min con agitación permanente. Se eliminó el contenido de alcohol y se lavó con agua destilada tres veces.

Para finalizar la parte superior de la jeringuilla fue cortada para dejar al descubierto las semillas desinfectadas listas para ser sembradas.

Protocolo de desinfección de las semillas de orquídeas

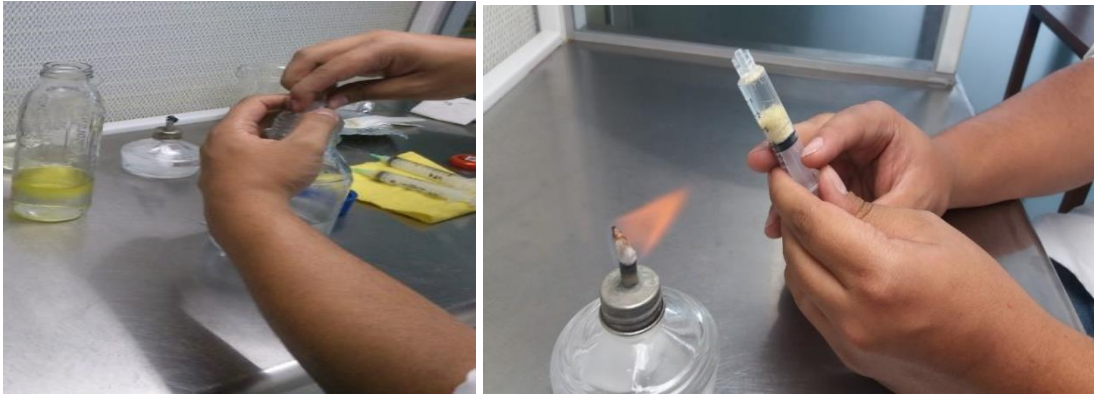


Figura 4. Protocolo de desinfección de semillas de orquídeas realizado en la cámara de flujo laminar
Fotografía: Realizado por los autores (2016)

2.4.4 Preparación de medios de cultivo con partículas de balsa de 850 μ m y 710 μ m

Para preparar el medio de cultivo se utilizó como base partículas de balsa al 7% (850 μ m o 710 μ m) en reemplazo del agente gelificante. A esta base se le añadió una solución de sales minerales MS (tabla 1), sacarosa (30 g/L) como fuente de carbono, vitaminas y carbón activado (2g/L), ajustando a un pH de 5,7 mediante el uso de HCl o NaOH 0,1 M.

En tubos de ensayo de 25 mL (16,5x 2cm) se colocó 0,7g de partículas de balsa, se le añadió la solución de MS con sacarosa y carbón activado, luego el tubo fue sellado con una tapa de papel aluminio y sellada con plástico de embalaje. Posteriormente los tubos fueron autoclavados a 120°C, durante 15 min a 1,5 atm (Autoclave vertical-Linha AV modelo AV-50).

Tabla 1.*Cantidades de reactivos para la preparación de un litro de medio de cultivo MS*

Solución	Reactivo	Cantidad de Reactivo (g)	Para preparar 1 litro
Stock 1	NH ₄ NO ₃	0,33	200 mL
	KNO ₃	0,38	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0181	
Stock 2	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0017	100 mL
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00025	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0332	
Stock 3	KI	0,0083	100 mL
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,00025	
	KH ₂ PO ₄	0,17	
Stock 4	H ₃ BO ₃	0,062	100 mL
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0025	
Stock 5	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2784	100 mL
	Na ₂ EDTA	0,3724	
	Mioinositol	0,25	
	Glicina	0,04	
Vitaminas	Ácido Nicotínico	0,0025	50 mL
	Piridoxina	0,0025	50 mL
	Tiamina	0,005	50 mL
Fuente de carbono	Sacarosa		30 g
Gelificante	Agar		8 g

Nota: Tabla en base a Roca y Mroginski, (1991, pág. 31)

2.4.5 Siembra *in vitro* de semillas de *Sobralia rosea* y *Epidendrum schistochilum*

Método descrito por Cerna y Colaboradores (2014, pág. 10), el procedimiento se lo realizó en la cámara de flujo laminar desinfectada, con la presencia de un mechero de alcohol para que exista una mayor asepsia. En este ambiente se abren los tubos de ensayo con el medio de cultivo, con la ayuda de una espátula se compacta la balsa formando una superficie plana en bisel de 45° aproximadamente, se tomó las semillas desinfectadas previamente en una jeringa, con la ayuda de una pinza punta fina se las inoculó sobre la balsa. Luego se selló los tubos con el tapón de papel aluminio flameado y se cubrió con plástico de embalaje empezando de esta manera la experimentación (Anexo 2).

Los tubos de ensayo (figura 5) sembrados fueron colocados durante 12 horas a 4°C en oscuridad absoluta, para luego ser enviados al cuarto de crecimiento con luz artificial permanente y temperatura de 25°C, con un foto período de 12 horas luz.

Los resultados obtenidos fueron tomados a los 40 días de experimentación. Se lo realizó mediante la determinación de la cantidad de semillas germinadas con la ayuda de un estéreo microscopio. El porcentaje de germinación de cada tratamiento se obtuvo a través de la relación entre la cantidad de semillas que germinaron y la cantidad de semillas sembradas por 100.

Siembra *in vitro* de semillas de orquídeas

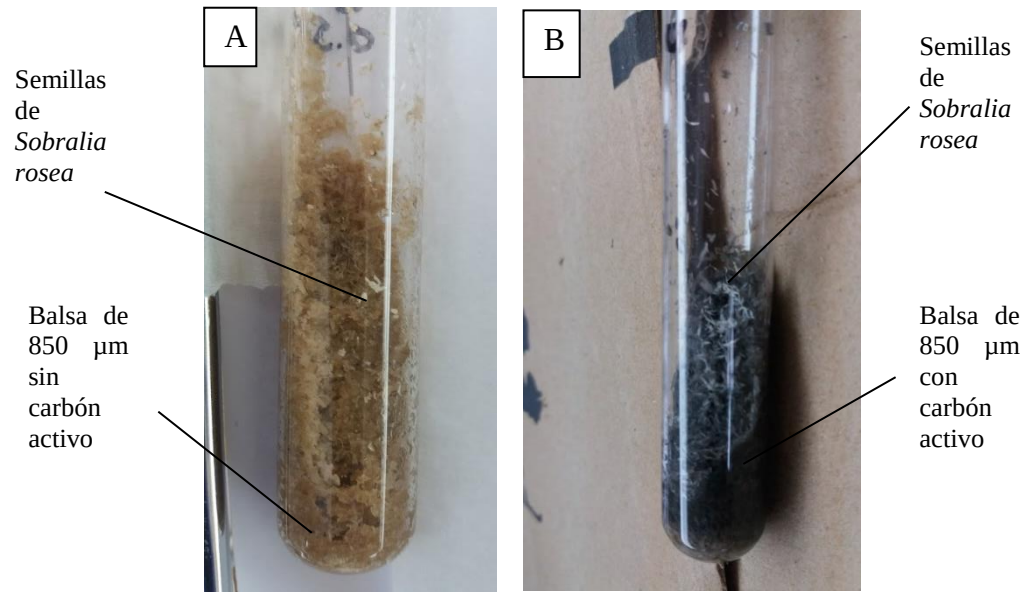


Figura 5. A) Tubo de ensayo con balsa sin carbón activo y B) Tubo de ensayo con balsa con carbón activo
Fotografía: Realizado por los autores (2016)

2.4.6 Tratamientos empleados para la siembra *in vitro*

Se aplicaron 13 tratamientos:

T1: Partículas de balsa 850 μm , 7 mL de MS, con carbón activado.

T2: Partículas de balsa 850 μm , 8 mL de MS, con carbón activado.

T3: Partículas de balsa 850 μm , 9 mL de MS, con carbón activado.

T4: Partículas de balsa 850 μm , 7 mL de MS.

T5: Partículas de balsa 850 μm , 8 mL de MS.

T6: Partículas de balsa 850 μm , 9 mL de MS.

T7: Partículas de balsa 710 μm , 7 mL de MS, con carbón activado.

T8: Partículas de balsa 710 μm , 8 mL de MS, con carbón activado.

T9: Partículas de balsa 710 μm , 9 mL de MS, con carbón activado.

T10: Partículas de balsa 710 μm , 7 mL de MS.

T11: Partículas de balsa 710 μm , 8 mL de MS.

T12: Partículas de balsa 710 μm , 9 mL de MS.

Como testigo (T0) se utilizó un medio de cultivo MS comercial con agar (8g/L) y carbón activado (2g/L) para cada tratamiento.

2.4.7 Variables

Variables independientes: Tamaño de aserrín de balsa, volumen de MS y la presencia o ausencia de carbón activado.

Variable dependiente: Porcentaje de germinación

2.4.8 Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial $2 \times 3 \times 2 + 1$ con 3 repeticiones de cada tratamiento (tabla 2) para cada especie de orquídea. En total se tuvo 12 tratamientos por especie, incluido un testigo positivo; que en este caso fueron medios de cultivo con agar comercial y carbón activado.

Tabla 2.*Diseño experimental para siembra de orquídeas sobre aserrín de balsa*

Especie	Tamaño	Volumen de MS	Carbón activado	Tratamiento
<i>Sobralia rosea</i>	850 µm	7 mL	Presente	T1
			Ausente	T2
		8 mL	Presente	T3
			Ausente	T4
		9 mL	Presente	T5
			Ausente	T6
	710µm	7 mL	Presente	T7
			Ausente	T8
		8 mL	Presente	T9
			Ausente	T10
		9 mL	Presente	T11
			Ausente	T12
		Testigo		T0
<i>Epidendrum schistochilum</i>	850 µm	7 mL	Presente	T1
			Ausente	T2
		8 mL	Presente	T3
			Ausente	T4
		9 mL	Presente	T5
			Ausente	T6
	710µm	7 mL	Presente	T7
			Ausente	T8
		8 mL	Presente	T9
			Ausente	T10
		9 mL	Presente	T11
			Ausente	T12
		Testigo		T0

Nota: Realizado por los autores (2016)

Como unidad experimental fue considerado cada tubo de ensayo de 25 mL de volumen total con medios de cultivo inoculados con aproximadamente 100 semillas de orquídea. En total se utilizaron 78 unidades experimentales.

2.4.9 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con pruebas de significancia de Duncan al 5% para determinar las variables que presentaron diferencias significativas.

2.5 Adaptación a cultivo *ex vitro*

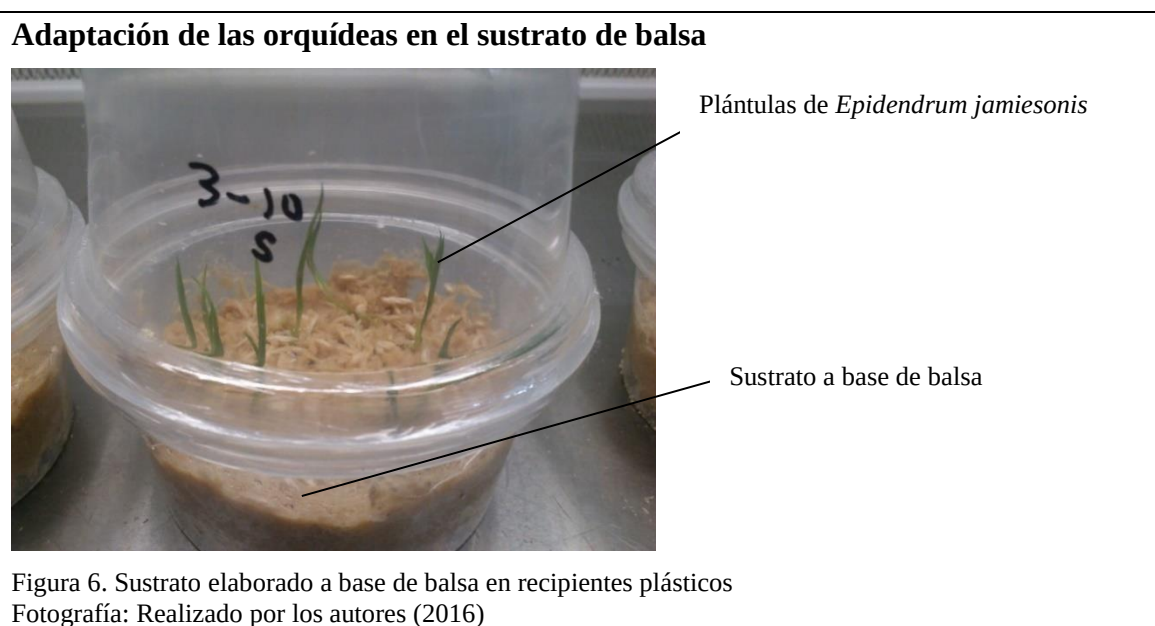
2.5.1 Elaboración de sustratos para adaptación y cultivo externo de orquídeas

Los sustratos con los que se experimentó fueron elaborados con fragmentos de madera de balsa de tamaño entre 1,18 y 5mm. Además se usaron sustratos de fibra de coco con pequeñas piedras pómez y sustratos a base de *Sphagnum* y trozos de madera de pino, que son empleados típicamente para la adaptación de plántulas de especies de orquídeas en general.

2.5.2 Adaptación en recipientes plásticos

Se dispuso recipientes plásticos de polipropileno de 12 cm de diámetro y una altura de 9 cm, de volumen 1017cc. En la base de cada recipiente se colocó una capa de piedras pómez estériles de 113 cc (25%), estas piedras fueron humedecidas con agua mediante un aspersor hasta que se formó una capa de agua en la base del recipiente.

Posteriormente se colocó un volumen de 339 cc (75%) de fragmentos de balsa por encima éstas piedras alcanzando una altura de 3 cm aproximadamente. El sustrato fue humedecido con 50 mL de agua potable hasta que la madera quedó saturada. Las plántulas de *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum* fueron extraídas de los tubos de ensayo y colocadas dentro de agua a 30°C para retirar la totalidad de los restos de agar adheridos a las raíces. Posteriormente las plántulas se sumergieron dentro de una solución antifúngica de Captán 5g/L de agua durante 30 segundos antes de ser sembradas sobre los sustratos. Se colocaron 6 plántulas por cada recipiente. Para finalizar se selló con otro recipiente de iguales dimensiones, a éste se le realizó de 3 a 6 pequeños orificios en la base. La unión entre ambos recipientes fue asegurada con cinta plástica de embalaje (figura 6).



En el caso de sustratos de fibra de coco (figura 7) se utilizó como base 113 cc de pequeñas piedras pómez (25%). Estas fueron humedecidas hasta formar una pequeña capa de agua en la base del recipiente. Se colocó 339 cc de sustrato (75%).

Adaptación de orquídeas en el sustrato de fibra de coco



Sustrato elaborado a partir de fibra de coco

Plántulas de *Epidendrum schistochilum*

Figura 7. Sustrato elaborado a partir de fibra de coco en recipientes plásticos
Fotografía: Realizado por los autores (2016)

Para los sustratos elaborados con *Sphagnum* (figura 8) se sustituyó la base de piedras caliza por 113cc de trozos de corteza de pino (25%) y se colocó un volumen de 339 cc de sustrato (75%). Los recipientes con plántulas se colocaron dentro de un cuarto de crecimiento con luz artificial las 24 horas del día y una temperatura de 25°C.

Adaptación de orquídeas en el sustrato de *Sphagnum*



Plántulas de *Epidendrum schistochilum*

Sustrato elaborado con *Sphagnum*

Figura 8. Sustrato elaborado a partir de *Sphagnum* en recipientes plásticos
Fotografía: Realizado por los autores (2016)

2.5.3 Tratamientos

Se realizaron 6 tratamientos:

T1: *Epidendrum jamiesonis* en sustrato de fibra de coco con piedra pómez

T2: *Epidendrum jamiesonis* en sustrato de *Sphagnum* con trozos de pino

T3: *Epidendrum jamiesonis* en sustrato de madera de balsa con piedras estériles

T4: *Epidendrum schistochilum* en sustrato de fibra de coco con piedra pómez

T5: *Epidendrum schistochilum* en sustrato de *Sphagnum* con trozos de pino

T6: *Epidendrum schistochilum* en sustrato de madera de balsa con piedras estériles

Para cada tratamiento se elaboraron 5 recipientes como se visualiza en la tabla 3.

2.5.4 Variables

Variables independientes: Tipo de sustrato y especies de orquídeas

Variable dependiente: Promedio de crecimiento longitudinal del tallo

2.5.5 Diseño experimental

Se aplicó un Diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2, con un total de 5 repeticiones de cada unidad experimental. Se tomó como unidad

experimental cada cápsula formada por la unión de 2 recipientes plásticos (polipropileno) con 6 plántulas sembradas.

Tabla 3.

Esquema experimental de adaptación de plántulas en recipientes plásticos cerrados

Sustrato	Especie	Tratamiento
Fibra de coco	<i>Epidendrum jamiesonis</i>	T1
Madera de balsa		T2
<i>Sphagnum</i>		T3
Fibra de coco	<i>Epidendrum</i>	T4
Madera de balsa	<i>schistochilum</i>	T5
<i>Sphagnum</i>		T6

Nota: Realizado por los autores (2016)

2.5.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con pruebas de significancia de Duncan al 5% para determinar las variables que presentaron diferencias significativas.

2.5.7 Evaluación

Los resultados obtenidos fueron tomados a los 60 días de experimentación. Se lo realizó mediante la determinación del crecimiento de cada plántula. Para esto se realizó una diferencia entre la longitud del tallo transcurridos 60 días de adaptación y la longitud del tallo al momento de la siembra sobre los sustratos, de lo cual se obtuvo un promedio de crecimiento de cada unidad experimental.

2.6 Mantenimiento

2.6.4 Riego

El riego de las plantas no fue sometido a estudio pero presentó variaciones de acuerdo al sustrato. Cada riego independiente del tipo de sustrato se lo realizó con 20 mL de agua. La frecuencia con que se regaron las plantas se determinó basándose en el aspecto del sustrato, visualizando la base del recipiente para constatar la presencia o ausencia de agua. En el sustrato comercial de fibra de coco se determinó que el riego se dé cada 15 días. Para el caso de los sustratos de madera de balsa los riegos se produjeron cada 21 días mientras que en los sustratos de *Sphagnum* el riego se debió dar cada 9 días. Los riegos fueron dados independientemente de la especie de orquídea sembrada.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Distribución de la balsa en Ecuador

La balsa se encuentra distribuida por todo el Ecuador, principalmente en las regiones de la costa, Amazonía y Galápagos, en las provincias de Esmeraldas, Guayas, Manabí, Los Ríos, Pastaza, Napo, Zamora Chinchipe, Sucumbíos, Morona Santiago, Orellana, Napo. También se presenta en la región de la sierra en Imbabura y Pichincha a una altura máxima de 1800m.s.n.m (Trópicos, 2017).

3.2 Pruebas Químicas

3.2.1 Cenizas Totales

Los porcentajes de cenizas totales de cada repetición fueron más o menos constantes presentando un promedio de 0,5183 % como se detalla en la tabla 4.

Tabla 4.
Porcentaje de cenizas totales

Crisol	Peso crisol (g)	Peso crisol seco (g)	Peso crisol con muestra (g)	Peso de crisol final (g)	Porcentaje de cenizas
1	22,4721	22,4695	23,4376	22,4744	0,5061
2	21,6853	21,6827	22,6942	21,6881	0,5339
3	22,5136	22,5088	23,4606	22,5137	0,5148
Promedio					0,5183

Nota: Realizado por los autores (2016)

3.2.2 Lignina insoluble

En este ensayo se determinó que el porcentaje de lignina insoluble presente en la madera de balsa es de 24,83%. La operación realizada para obtener este valor se presenta a continuación:

$$\% \text{ lignina} = \frac{\text{Peso final del crisol} - \text{Peso crisol vacío}}{\text{Peso de crisol con muestra libre de extractos} - \text{peso crisol vacío}} * 100$$

$$\% \text{ lignina insoluble} = \frac{23,6391}{24,4466} * 100$$

$$\% \text{ lignina insoluble} = 24,83$$

Los valores obtenidos durante el experimento se demuestran en la tabla 5.

Tabla 5.

Pesos de crisol con muestra a 105°C en función del tiempo para determinar lignina insoluble

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Peso final del crisol (g)
0	105	24,4466
15	105	24,2354
30	105	24,0253
45	105	23,8645
60	105	23,7328
90	105	23,6438
105	105	23,6393
120	105	23,6391

Nota: Realizado por los autores (2016)

3.2.3 Holocelulosa

En la prueba para la determinación de Holocelulosa, se encontró que la madera de balsa tiene un porcentaje del 82,83 %. Los valores obtenidos durante el experimento se demuestran en la tabla 6.

La operación realizada para calcular el porcentaje de Holocelulosa fue la siguiente.

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{\text{Peso final del crisol}}{\text{Peso de crisol con muestra libre de extractos}} * 100$$

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{24,8652}{30,0212} * 100$$

$$\% \text{ Holocelulosa} = 82,83$$

Tabla 6.

Pesos de muestras en función del tiempo para determinar Holocelulosa

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Peso final del crisol (g)
0	105	30,0212
15	105	27,6166
30	105	25,0760
45	105	24,8853
60	105	24,8708
75	105	24,8656
90	105	24,8652

Nota: Realizado por los autores (2016)

3.2.4 α -Celulosa

En la prueba de α -Celulosa, se determinó que la madera de balsa tiene un porcentaje del 41,88 %. Los valores obtenidos durante el experimento se demuestran en la tabla 7.

Tabla 7.

Pesos de muestras en función del tiempo para determinar α -Celulosa

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Peso final del crisol (g)
0	105	27,6784
15	105	26,8635
30	105	25,9267
60	105	24,2579
120	105	24,1345
240	105	24,1092

Nota: Realizado por los autores (2016)

La operación realizada para el cálculo de α -Celulosa fue la siguiente:

$\% \alpha - Celulosa$

$$= \frac{\text{Peso final del crisol} - \text{Peso crisol vacío}}{\text{Peso de crisol con muestra libre de extractos} - \text{Peso crisol vacío}} * 100$$

$$\% \alpha - Celulosa = \frac{24,1092 - 21,5377}{27,6784 - 21,5377} * 100$$

$$\% \alpha - Celulosa = 41,88$$

3.2.5 Hemicelulosa

El cálculo del porcentaje de Hemicelulosa, se determinó mediante la diferencia entre los valores obtenidos de Holocelulosa y α -celulosa.

$$\% \text{ Hemicelulosas} = \% \text{ Holocelulosa} - \% \alpha - \text{Celulosa}$$

$$\% \text{ Hemicelulosas} = 82,83 - 41,88$$

$$\% \text{ Hemicelulosas} = 40,95$$

La síntesis de los resultados de los análisis químicos de la madera de balsa del presente estudio, se comparó con los resultados obtenidos en el estudio de Honorato-Salazar (2015, pág. 135) y el estudio de Fonseca (2006, pág. 112) se muestran en la tabla 8.

Tabla 8.

Valores promedio de compuestos químicos en madera de balsa

Compuesto	Porcentaje		
	Carlozama A. & Salas P. (2016)	Honorato-Salazar y colaboradores (2015, pág. 135)	Fonseca (2006, pág. 112)
Cenizas totales	0,51	0,49	0,35
Lignina insoluble	24,83	23,02	28,22
Holocelulosa	82,83	81,99	-
α celulosa	41,88	40,30	-
Hemicelulosa	40,95	41,67	-

Nota: Realizado por los autores (2016)

3.2.6 Discusión

En este estudio los resultados de las pruebas químicas mostraron porcentajes de lignina insoluble de 24,82%. En el trabajo presentado por Honorato-Salazar (2015, pág. 135), la madera de balsa presenta un porcentaje de lignina de 23,02% mientras que los resultados presentados por Fonseca (2006, pág. 89) en su estudio sobre la madera de pino indica porcentajes similares a esta investigación con un total aproximado de lignina de 28,22%. La lignina en la madera confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa contra el ataque enzimático de bacterias y hongos (Papinutti, Diorio, & Forchiassin, 2003, pág. 16), es decir disminuye o evita la pudrición de la madera, esto indica que ambas especies pueden disminuir la pudrición gracias a este componente.

En la investigación expuesta por Fonseca (2006, pág. 28) se indica que la holocelulosa se encuentra en mayores cantidades en maderas duras que en maderas blandas y se las conoce como hidratos de carbono. En el estudio de Honorato-Salazar (2015, pág. 135) el porcentaje de holocelulosa en la madera de balsa es de 81,99% y en la investigación presentada por Bernabé-Santiago (2003, pág. 24) el porcentaje de holocelulosa en la madera de *Pinus oocarpa* es de 74,7% siendo esta especie utilizada como sustrato para cultivo externo de orquídeas. La madera de balsa es una madera blanda, ésta presentó una cantidad de 82,83% de holocelulosa es decir que este porcentaje representa la fuente de energía de la balsa y esta puede servir para las plántulas de orquídeas, en comparación con la especie de pino anteriormente mencionada, la balsa puede ser utilizada como sustrato con mejores resultados.

La α -Celulosa es una subdivisión de la homocelulosa conocida como celulosa noble, mientras que la hemicelulosa cumple la función de ser el intermediario entre la celulosa y la lignina, se cree que comprende entre el 15-30% de la pared celular de la madera (Fonseca, 2006). En este estudio se presentaron valores de 41,8763% para α -Celulosa y 40,9491% para hemicelulosa mientras que en el estudio realizado por Honorato-Salazar (2015, pág. 135) el porcentaje es de 40,30 y 41,67% respectivamente, resultados similares a la presente investigación.

La variación de los resultados presentados en esta investigación con respecto a la investigación de Honorato-Salazar y Colaboradores (2015), pueden deberse a factores como la altitud de cada país, factores ambientales, y los distintos cambios realizados en la metodología, además, de errores provocados en la experimentación. Con respecto al estudio de Fonseca (2006), la balsa presenta diferentes características morfológicas y fisiológicas respecto al pino, sin embargo los porcentajes de los componentes analizados son similares.

3.3 Pruebas físicas

3.3.1 Porcentaje de humedad

3.3.1.1 Condiciones normales

En el análisis ANOVA (tabla 9) para la determinación de humedad del aserrín de madera de balsa en condiciones normales indican que el tamaño de aserrín es una fuente de variación de alta significancia con un coeficiente de variación de 1,22.

Tabla 9.*Anova para el porcentaje de humedad en condiciones normales*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Modelo	42,14	3	14,05	53,15	<0,001 **
Tamaño de aserrín	42,14	3	14,05	53,15	<0,001 **
Error	2,11	8	0,26		
Total	44,25	11			

CV= 1.22

Nota: Realizado por los autores (2016)

La prueba de Duncan al 5% para el porcentaje de humedad retenido por la madera de balsa en condiciones normales (tabla 10) indica que entre el tamaño de entre 1,18 mm y mayores a 2 mm no presenta diferencia significativa y se ubican en el primer rango de significancia. El tamaño 850 μ m y 710 μ m se ubican en el segundo rango y no presentan diferencia significativa entre estos.

Tabla 10.*Prueba de Duncan al 5% para el porcentaje de humedad en de la balsa en condiciones normales*

Tratamiento	Tamaño de aserrín	Medias (%)	Rangos
T4	> 2 mm	44,44	A
T3	1,18mm	43,65	A
T2	850 μ m	40,51	B
T1	710 μ m	40,19	B

Nota: Realizado por los autores (2016)

3.3.1.2 Condiciones extremas

En el análisis ANOVA (tabla 11) para la determinación de humedad del aserrín de madera de balsa en condiciones extremas indican que el tamaño de aserrín es una fuente de variación de alta significancia con un coeficiente de variación de 3,78.

Tabla 11.

Anova para el porcentaje de humedad en condiciones extremas

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Modelo	18,67	3	6,22	16,04	<0,001 **
Tamaño de aserrín	18,67	3	6,22	16,04	<0,001 **
Error	3,10	8	0,39		
Total	21,77	11			

CV= 3,78

Nota: Realizado por los autores (2016)

En la tabla 12 se muestra la prueba de Duncan al 5% para el porcentaje de humedad retenido por la madera de balsa en condiciones extremas en donde se observa que el tamaño de partículas de entre 1,18 mm y mayores a 2 mm no presenta diferencia significativa y se ubican en el primer rango de significancia. El tamaño 850µm y 710µm no presentan diferencia significativa y se ubican en el segundo rango de significancia.

Tabla 12.

Prueba de Duncan al 5% para el porcentaje de humedad en de la balsa en condiciones extremas

Tratamiento	Tamaño de aserrín	Medias (%)	Rangos
T4	> 2 mm	17,95	A
T3	1,18mm	17,51	A
T2	850 µm	15,33	B
T1	710µm	15,19	B

Nota: Realizado por los autores (2016)

En condiciones extremas, el aserrín de tamaño mayor retenido en el tamiz número 16, es decir los trozos de entre 2 y 5 mm, son los que retuvieron en mayor cantidad la humedad con un 17,95%. Le sigue el aserrín de tamaño 1,18mm con porcentaje de humedad de 17,51%. Finalmente, el aserrín de tamaño 710 µm con un porcentaje de 15,33% y el de 850 µm con 15,19% de retención de humedad. Se observa que la retención de humedad es directamente proporcional tamaño de aserrín, es decir que a mayor tamaño de aserrín mayor retención de humedad presenta.

Tabla 13.

Porcentaje de humedad promedio para distintos tamaños de aserrín de balsa en condiciones normales y condiciones extremas

Tratamiento	Tamaño de aserrín	de Porcentaje de humedad condiciones normales	Porcentaje de humedad condiciones extremas
T4	> 2 mm	44,44	17,95
T3	1,18mm	43,65	17,51
T2	850 µm	40,51	15,33
T1	710µm	40,19	15,19

Nota: Realizado por los autores (2016)

En función de estos resultados (tabla 13), para la elaboración de sustratos para el cultivo *ex vitro* y adaptación de las plántulas se empleó el aserrín de tamaño entre 2 y 5 mm. Por

que retienen mejor la humedad y compactan el sustrato dando mayor soporte a las plántulas

3.3.2 Discusión

En la investigación presentada por Acosta-Durán y Colaboradores (2008, pág. 103), se señala que el aserrín de madera puro usado como sustrato retiene gran cantidad de humedad siendo esto un problema para las especies sembradas en el mismo, debido a dificultades que suelen presentarse. En el aserrín de la madera de balsa los porcentajes de retención de humedad vienen dados en relación directa a su tamaño. Mientras mayor es el tamaño del aserrín, mayor será la capacidad de retención de agua, es por este motivo la balsa de tamaño entre 2 y 5 mm se utilizó como sustrato de cultivo externo y la balsa de tamaño 850 μm y 710 μm para el cultivo *in vitro*. En el trabajo presentado por (Muñoz, 2007, pág. 4) se menciona que un sustrato adecuado corresponde a aquel que tiene un 20 o 30% de agua fácilmente disponible. En el sustrato de madera de balsa los porcentajes de humedad superan notoriamente el 30%, alcanzando un 44,44% en el tamaño de aserrín >2mm y un 40,19% en el tamaño de aserrín de 710 μm , debido a esta propiedad la balsa presenta un alto potencial como sustrato *in vitro* y *ex vitro* para la siembra y adaptación de orquídeas.

La balsa expuesta a condiciones extremas brinda un resultado real de la cantidad de humedad retenida. En condiciones normales, permite conocer la cantidad de tiempo que la balsa retiene humedad en condiciones ambientales.

La variación entre la cantidad de humedad retenida entre cada tamaño de partícula de balsa es directamente proporcional a su tamaño.

3.4 Análisis de viabilidad de semillas de orquídeas

En este ensayo se determinó mediante la prueba de Tetrazolium que las semillas usadas para el experimento tenían un alto grado de viabilidad (figura 9), así:

Sobralia rosea 92,36 % y

Epidendrum schistochilum 92,44% de viabilidad.

En la tabla 14 se detallan los valores obtenidos.

Tabla 14.
Porcentajes de viabilidad de semillas de especies de orquídeas

Especie	Total	Viables	No Viables	Porcentaje de viabilidad (%)
<i>Sobralia rosea</i>	151	136	15	90,06
	269	255	14	94,79
	103	95	8	92,23
Media				92,36
<i>Epidendrum schistochilum</i>	138	131	7	94,92
	174	158	16	90,80
	143	131	17	91,60
Media				92,44

Nota: Realizado por los autores (2016)

Análisis de viabilidad de las semillas de orquídeas



Semilla tinturada debido a la reacción positiva de la prueba de tetrazolium

Figura 9. Semillas con reacción positiva al Tetrazolium vistas al microscopio 10X.
Fotografía: Realizado por los autores (2016)

3.5 Germinación *in vitro* de semillas de orquídea

Los porcentajes de la germinación presentados a continuación están dados en función de las 2 especies utilizadas, *Sobralia rosea* y *Epidendrum schistochilum*.

3.5.1 Porcentaje de germinación de semillas de *Sobralia rosea*

En relación al ensayo para evaluar los distintos tratamientos y sus efectos en la germinación de las semillas de orquídeas se obtuvieron resultados que se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15.
Porcentajes de germinación en semillas de Sobralia rosea

Tratamiento	Porcentaje de germinación		
	Repetición		
	1	2	3
T0	91,54	90,3	89,3
T1	74,2	75,31	74
T2	59,6	60,3	59,2
T3	75,9	74,3	74,1
T4	63,11	63,55	61,4
T5	86,93	85,2	86,8
T6	65,25	65,5	63,2
T7	77,11	75,2	74,25
T8	58,7	62,98	60,3
T9	78,5	76,21	75,2
T10	65,23	64,85	63,25
T11	87,5	86,21	88,9
T12	64,5	63,95	65,32

Nota: Realizado por los autores (2016)

En el análisis ANOVA (Tabla 16), muestra que el volumen de MS y la presencia o no de carbón activado son fuentes con una alta significancia estadística. Además de la interacción entre MS y el carbón activado. El contraste entre los tratamientos utilizados sobre aserrín de balsa y el testigo positivo también presenta una alta significancia. El tamaño del aserrín es una fuente de variación significativa, mientras que las interacciones entre el tamaño de aserrín-carbón activado; tamaño de aserrín-volumen de MS y la interacción triple entre el tamaño de aserrín-volumen de MS y Carbón activado fueron no significativas, es decir que no presentan influencia alguna sobre el porcentaje de germinación de semillas mostrando un coeficiente de variación de 1,71.

Tabla 16 .*Anova para el porcentaje de germinación en semillas de *Sobralia rosea**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Modelo	40,8397	12	340,33	222,34	<0,001
Tratamiento	40,8397	12	340,33	222,34	<0,001
Tamaño de aserrín	11,46	1	11,46	7,49	0,0121 *
MS	434,70	2	217,35	142,05	<0,001 **
Carbón activado	2427,70	1	2427,70	1586,73	<0,001 **
Tamaño de aserrín *MS	2,36	2	1,18	0,77	0,4791 ns
Tamaño de aserrín *Carbón activado	0,53	1	0,53	0,34	0,5644 ns
MS*Carbón activado	166,45	2	83,22	54,39	<0,001 **
Tamaño de aserrín *MS*Carbón activado	0,72	2	0,36	0,23	0,7941 ns
Tratamientos vs. Testigo	1040,05	1	1040,05	679,48	<0,001 **
Error	39,80	26	1,53		
Total	4123,76	38			

CV= 1,71

**= altamente significativo al 5%

*=significativo

Ns= nada significativo

Nota: Realizado por los autores (2016)

La prueba de Duncan al 5% para la interacción de los tratamientos en la germinación de semillas de *Sobralia rosea* (Tabla 17) establece 5 rangos de significancia. Las interacciones que mayor media de germinación presentaron fueron los tratamientos T11 y T5 que se ubicaron en el primer rango, con un promedio de 87,34% para el tratamiento 11 y 86,31% para el tratamiento 5. Estos tratamientos fueron los que se utilizaron carbón activado con un volumen de MS de 9 mL, independientemente del tamaño de aserrín.

En el segundo rango se ubicaron los tratamientos con medias que van desde el 74,50 % en T1 hasta el 76,64% para el T9. Además se incluyen el T7 y T3. En el caso de los tratamientos con el rendimiento más bajo, T8 y T2, los cuales se ubican en el quinto rango. El T8 comparte el cuarto y quinto rango de significancia. Estos 2 tratamientos fueron en los que se utilizaron el menor volumen de MS y se prescindió del uso de carbón activado dentro de los 2 tamaños de aserrín. La media de germinación de T8 fue de 60,69% mientras que en el T2 de 59,70%.

Tabla 17.

*Prueba de Duncan al 5% de las interacciones de los tratamientos para la germinación de semillas de *Sobralia rosea**

Tratamiento	Tamaño de aserrín	Volumen de MS	Carbón activado	Medias (%)	Rangos
T11	710µm	9 mL	Presente	87,54	A
T5	850 µm	9 mL	Presente	86,31	A
T9	710µm	8 mL	Presente	76,64	B
T7	710µm	7 mL	Presente	75,52	B
T3	850 µm	8 mL	Presente	74,77	B
T1	850 µm	7 mL	Presente	74,50	B
T6	850 µm	9 mL	Ausente	64,65	C
T12	710µm	9 mL	Ausente	64,59	C
T10	710µm	8 mL	Ausente	64,44	C
T4	850 µm	8 mL	Ausente	62,69	C D
T8	710µm	7 mL	Ausente	60,69	D E
T2	850 µm	7 mL	Ausente	59,70	E

Nota: Realizado por los autores (2016)

La prueba de Duncan al 5% (Tabla 18) para el volumen de MS utilizado en la elaboración de medios de cultivo genera 3 rangos para los 3 volúmenes experimentales.

El primer rango de significancia lo ocupa el volumen de 9 mL con una media de germinación de 75,77%. En el segundo rango se encuentra el volumen de 8 mL con una media de 69,63% de germinación para dejar en el último rango al volumen de 7 mL con un porcentaje de germinación promedio de apenas 67,60%.

En el caso de las fuentes de variación altamente significativas (**) se encuentra el Volumen de MS y la presencia o ausencia de carbón activado. En el caso de las interacciones, el volumen de MS junto con la presencia de carbón activado fue la única que presentó una alta significancia (tabla16).

Tabla 18.

*Prueba de Duncan al 5% para el volumen de MS utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de *Sobralia rosea**

Volumen de MS	Medias (%)	Rangos
9 mL	75,77	A
8 mL	69,63	B
7 mL	67,60	C

Nota: Realizado por los autores (2016)

Para la presencia o ausencia de carbón activado (Tabla 19) se muestra que existen dos rangos significativos, en el primer rango se ubica a los tratamientos que se les añadió carbón activado con una media de 79,21% de germinación, mientras que los medios en los que se prescindió del carbón activado la media de germinación presentada fue de 62,79%. Esto evidencia que existe una marcada diferencia a favor del uso de carbón activado dentro de los medios de cultivo.

Tabla 19.

Prueba de Duncan al 5% para la presencia o ausencia de carbón activado utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de Sobralia rosea

Carbón activado	Medias (%)	Rangos
Presente	79,21	A
Ausente	62,79	B

Nota: Realizado por los autores (2016)

En cuanto a la interacción más significativa (Tabla 20), volumen de MS junto con carbón activado, se muestran 4 rangos de significancia. El primer rango es para los medios de cultivo en los que se utilizó 9 mL de MS con carbón activado, teniendo una media de germinación del 86,92%. El segundo rango lo comparten los tratamientos en los que se tuvo 8 y 7 mL de MS con unas medias de germinación de 75,70 y 75,01 % respectivamente.

Tabla 20.

Prueba de Duncan al 5% de la interacción Volumen de MS - Carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de Sobralia rosea

Volumen de MS	Carbón activado	Medias (%)	Rangos
9 mL	Presente	86,92	A
8 mL	Presente	75,70	B
7 mL	Presente	75,01	B
9 mL	Ausente	64,62	C
8 mL	Ausente	63,57	C
7 mL	Ausente	60,18	D

Nota: Realizado por los autores (2016)

Los últimos 2 rangos de significancia fueron para los tratamientos en los que no se utilizó carbón activado, en el tercer rango se encuentran los tratamientos con volúmenes

de 9 y 8 mL, para dejar al final el rango en el que se usó 7 mL de MS sin carbón activado.

Los resultados muestran que existe una relación directa entre la cantidad de MS empleado en la elaboración de medios de cultivo con el porcentaje de germinación. A mayor volumen de MS mayor porcentaje de germinación. Así mismo la ausencia de carbón activado afecta de manera significativa la media de germinación de semillas.

La única fuente de variación que presentó significancia (*) fue el tamaño del aserrín utilizado. La prueba de Duncan al 5% (Tabla 21) muestra 2 rangos de significancia en donde el aserrín de tamaño 710µm presenta una media de germinación de 71,56%, considerándose el mejor tamaño para realizar medios de cultivo. El tamaño de aserrín de tamaño 850 µm reportó una media de crecimiento de 70,44%, ocupando el último rango de significancia.

Tabla 21.

Prueba de Duncan al 5% del tamaño de aserrín utilizado para la germinación de semillas de Sobralia rosea

Tamaño de aserrín	Medias (%)	Rangos
710µm	71,56	A
850 µm	70,44	B

Nota: Realizado por los autores (2016)

La tabla 22 muestra la prueba de Duncan en la interacción entre el tamaño de aserrín y la presencia o no de carbón activado generando de esta manera 3 rangos de significancia en donde se observa que sin importar el tamaño del aserrín, los medios de cultivo a los que no se les agregó el carbón activado ocupan el último rango de significancia. La

interacción entre el tamaño de aserrín 710µm con la presencia de carbón activado ocupa el rango A con una media de germinación de 79,90%.

Tabla 22.

Prueba de Duncan al 5% de la interacción entre tamaño de aserrín y carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de Sobralia rosea

Tamaño de aserrín	Carbón activado	Medias (%)	Rangos
710µm	Presente	79,90	A
850 µm	Presente	78,53	B
710µm	Ausente	63,23	C
850 µm	Ausente	62,35	C

Nota: Realizado por los autores (2016)

3.5.2 Porcentaje de germinación de semillas de *Epidendrum schistochilum*

Tabla 23.

Porcentaje de germinación en semillas de Epidendrum schistochilum

Tratamiento	Porcentaje de germinación		
	Repetición		
	1	2	3
T0	92,10	90,20	93,06
T1	77,12	74,22	75,30
T2	57,20	59,00	61,88
T3	77,66	75,30	73,23
T4	65,35	67,13	63,90
T5	87,66	84,63	83,66
T6	64,20	66,20	63,95
T7	78,32	77,69	75,11
T8	61,54	60,30	62,50
T9	79,06	77,50	77,25
T10	66,32	64,20	63,10
T11	88,91	86,20	86,35
T12	67,20	66,50	63,10

Nota: Realizado por los autores (2016)

Los porcentajes de germinación de semillas de *Epidendrum schistochilum* de las 3 repeticiones realizadas se detallan en la Tabla 23.

Tabla 24.

Anova para el porcentaje de germinación en semillas de Epidendrum schistochilum

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Modelo	3983,02	12	331,92	113,18	<0,001
Tratamiento	3983,02	12	331,92	113,18	<0,001
Tamaño de aserrín	15,42	1	15,42	5,26	0,0327 *
MS	336,93	2	168,47	57,49	<0,001 **
Carbón activado	2361,96	1	2361,96	806,12	<0,001 **
Tamaño de aserrín *MS	1,44	2	0,72	0,24	0,7883 ns
Tamaño de aserrín *Carbón activado	3,78	1	3,78	1,27	0,2730 ns
MS*Carbón activado	123,32	2	66,16	22,58	<0,001 **
Tamaño de aserrín *MS*Carbón activado	6,25	2	3,12	1,06	0,3685 ns
Tratamientos vs. Testigo	1124,93	1	1124,93	383,58	<0,001
Error	76,25	26	2,93		
Total	4059,27	38			

CV= 2,34

**= altamente significativo al 5%

*=significativo

Ns= nada significativo

Nota: Realizado por los autores (2016)

El estudio del porcentaje de germinación de semillas de *Epidendrum schistochilum* se realizó mediante el Análisis de varianza (ANOVA). La Tabla 24 muestra que existieron diferencias altamente significativas (**) en las fuentes de variación como el volumen de MS y la presencia o ausencia de carbón activado. La única interacción que presenta alta significancia fue la que se da entre el volumen de MS y la presencia o no de carbón

activado. Estos 3 factores influyeron directamente en el porcentaje de germinación de semillas. Se destaca que el contraste entre los tratamientos empleados y el testigo positivo arrojan una diferencia altamente significativa. Además, se muestra que la fuente de variación tamaño de aserrín presenta significancia (*). Las otras interacciones no influyeron sobre la germinación, considerándose no significativas (ns). El coeficiente de variación presentado fue de 2,34.

La prueba de Duncan al 5% para la interacción de los tratamientos utilizados dentro de la germinación de semillas de *Epidendrum schistochilum* que se muestra en la Tabla 25 establece 4 rangos de significancia. Dentro de los tratamientos que mejores resultados generaron se incluyen el tratamiento T11 y T5, al igual que ocurrió con la germinación de semillas de *Sobralia rosea*. Ambos tratamientos presentan medias de germinación de 87,15% y 85,32% respectivamente por lo que se ubican dentro del primer rango de significancia, estos tratamientos representan los ensayos en donde se utilizó un volumen de 9 mL con la presencia de carbón activado tanto en tamaños de balsa de 850µm y 710µm. El siguiente rango lo ocupan los tratamientos T9, T7, T1 y T3 con medias de germinación de 77,94%, 77,04%, 75,55% y 75,40%, respectivamente. Los 2 tratamientos con menos porcentaje de germinaciones registradas fueron el T8 y T2 los cuales ocupan el último rango de significancia, con medias de 61,45% y 59,36%.

En la tabla 25 se observa a los tratamientos que ocupan los 2 primeros rangos, a estos se le añadió carbón activado junto al MS. Así mismo los tratamientos que se encuentran en los 2 últimos rangos de significancia fueron en los que no existió carbón activado. Los mejores tratamientos tuvieron un volumen de 9 mL en su composición, mientras que los tratamientos con menor porcentaje de germinación tuvieron un volumen de 7 mL.

Tabla 25.

Prueba de Duncan al 5% de las interacciones de los tratamientos para la germinación de semillas de Epidendrum schistochilum

Tratamiento	Tamaño de aserrín	Volumen de MS	Carbón activado	Medias (%)	Rangos
T11	710µm	9 mL	Presente	87,15	A
T5	850µm	9 mL	Presente	85,32	A
T9	710µm	8 mL	Presente	77,94	B
T7	710µm	7 mL	Presente	77,04	B
T1	850µm	7 mL	Presente	75,55	B
T3	850µm	8 mL	Presente	75,40	B
T12	710µm	9 mL	Ausente	65,60	C
T4	850µm	8 mL	Ausente	65,46	C
T6	850µm	9 mL	Ausente	64,78	C
T10	710µm	8 mL	Ausente	64,54	C
T8	710µm	7 mL	Ausente	61,45	D
T2	850µm	7 mL	Ausente	59,36	D

Nota: Realizado por los autores (2016)

Una de las fuentes de variación que presentó una alta significancia dentro de la germinación de semillas fue el volumen de MS utilizado. La prueba de Duncan al 5% (Tabla 26) generó 3 rangos de significancia ubicando al volumen de 9 mL en el primer rango con una media de germinación del 75,71%. El volumen de 8 mL se ubicó en el segundo rango con una media de 80,83 mientras que el tercer rango lo ocupó el volumen de 7 mL con una media de 68,35% de germinación. Se observa que el volumen que mejores resultados genera es 9 mL de MS.

Tabla 26.

Prueba de Duncan al 5% para el volumen de MS utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de Epidendrum schistochilum

Volumen de MS	Medias (%)	Rangos
9 mL	75,71	A
8 mL	70,83	B
7 mL	68,35	C

Nota: Realizado por los autores (2016)

La presencia o ausencia de carbón activado muestra que existen dos rangos significativos; en el primero se encuentra los tratamientos que se les añadió carbón activado con una media de 79,73% de germinación, mientras que los medios en los que no se añadió carbón activado presentan una media de 63,53%, ubicándose en el segundo rango significativo como se muestra en la tabla 27.

Tabla 27.

Prueba de Duncan al 5% para la presencia o ausencia de carbón activado utilizado en los tratamientos para la germinación de semillas de Epidendrum schistochilum

Carbón activado	Medias (%)	Rangos
Presente	79,73	A
Ausente	63,53	B

Nota: Realizado por los autores (2016)

Se observa que los mejores tratamientos son en los que se incluye el carbón activado dentro de la composición del MS. La interacción más significativa fue la que se dio entre el volumen de MS y el carbón activado (Tabla 28). Esta generó 4 rangos de significancia. En el primero se encuentra la interacción de 9 mL de MS con carbón activado dentro de su composición con una media de 86,24%. En el segundo rango se encuentran las interacciones de 8 mL de MS y carbón activado con una media de

76,67% y la interacción de 7 mL y carbón activado, presentando una media de germinación de 76,29%. Las interacciones de los 2 primeros rangos son los tratamientos en los que se adicionó carbón activado.

Tabla 28.

Prueba de Duncan al 5% de la interacción Volumen de MS - Carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de Epidendrum schistochilum

Volumen de MS	Carbón activado	Medias (%)	Rangos
9 mL	Presente	86,24	A
8 mL	Presente	76,67	B
7 mL	Presente	76,29	B
9 mL	Ausente	65,19	C
8 mL	Ausente	65,00	C
7 mL	Ausente	60,40	D

Nota: Realizado por los autores (2016)

Los últimos 2 rangos de significancia fueron para los tratamientos en los que no se utilizó carbón activado, compartiendo el tercer rango los tratamientos con volúmenes de 9 y 8 mL, para dejar al final el rango en el que se usó 7 mL de MS sin carbón activado con una media de 60,40% de germinación.

Los resultados muestran que los medios de cultivo con carbón activado generan los mejores resultados además del volumen de MS empleado.

La fuente de variación con significancia (*) fue el tamaño del aserrín que se utilizó. La prueba de Duncan al 5% (Tabla 29) muestra 2 rangos de significancia en donde el aserrín de tamaño 710µm presenta una media de germinación de 72,29%, considerándose el mejor tamaño para realzar medios de cultivo. El tamaño de aserrín

850µm con una media de germinación de 70,98% ocupa el segundo rango de significancia.

Tabla 29.

Prueba de Duncan al 5% del tamaño de aserrín utilizado para la germinación de semillas de Epidendrum schistochilum

Tamaño de aserrín	Medias (%)	Rangos
710µm	72,29	A
850µm	70,98	B

Nota: Realizado por los autores (2016)

En la tabla 30 se muestra la prueba de Duncan al 5% para la interacción entre el tamaño de aserrín con el carbón activado. Se generan 3 rangos de significancia en donde se observa que el tamaño de aserrín 710µm con carbón activado presentó la mejor media de germinación con un 80,71%. En el segundo rango, con un porcentaje de germinación de 78,75% se encuentra el tamaño de aserrín 850µm con carbón activado. Finalmente ocupando el tercer rango se encuentran los tamaños de balsa 710µm y 850µm que no presentaron la adición de carbón activado.

Tabla 30.

Prueba de Duncan al 5% de la interacción entre tamaño de aserrín y carbón activado en los tratamientos para la germinación de semillas de Epidendrum schistochilum

Tamaño de aserrín	Carbón activado	Medias (%)	Rangos
710µm	Presente	80,71	A
850µm	Presente	78,75	B
710µm	Ausente	63,86	C
850µm	Ausente	63,20	C

Nota: Realizado por los autores (2016)

3.5.3 Discusión

En los estudios presentados por Cerna y Colaboradores (2014, pág. 14), se menciona que el tratamiento de MS con carbón activado, es un medio óptimo para la germinación de semillas presentando un porcentaje de germinación del 97% especialmente en las especies *Sobralia rosea* y *Epidendrum* sp. También en los trabajos presentados por Salazar-Mercado (2012, pág. 73) y Mosqueda y Colaboradores (2010, pág. 13) se muestra que los medios de cultivo que presentan mejores porcentajes de germinación en orquídeas son los que utilizan MS junto con carbón activo con resultados desde el 70 al 97,7% de germinación. En la presente investigación los tratamientos que incluyen MS y carbón, presentaron los porcentajes más elevados de germinación para las especies *Epidendrum schistochilum* 87,15% y *Sobralia rosea* 87,34% (Anexo 3). Como conclusión el medio MS junto con el carbón activo presentan altos porcentajes de germinación para la siembra *in vitro* como se evidencia también en nuestro estudio (anexo 4).

En el estudio presentado por Flores-Escobar y Colaboradores (2011, pág. 6) se menciona la utilización de agar como agente gelificante en el medio de cultivo MS con carbón activado, dando como resultado un porcentaje de germinación del 56,70%. En otra investigación realizada por Cerna y Colaboradores (2016), el medio de cultivo utilizado para la germinación *in vitro* de orquídeas fue de agar con MS y carbón activado presentando porcentajes del 57,22% de germinación. En la publicación presentada por Molina (2012, pág. 107), el medio Murashige y Skoog junto con agar presentó los mejores resultados con un 3,951% de semilla hinchada en 53 días desde la siembra. En el presente experimento, la balsa reemplazó al agar como parte sólida en el medio de

cultivo, dando resultados positivos con porcentajes de germinación que van desde el 59,70 al 87,54% en *Sobralia rosea* y 59,36 al 87,15% en *Epidendrum schistochilum*, debido a las distintas cualidades que presenta la balsa mencionadas por los autores Moreira (2013) y Balsebot International INC (2013), la balsa tiene una alta retención de humedad, tiene la capacidad de tener un buen soporte para las semillas y posteriores plántulas, además la hacen un sustrato para cultivo *in vitro* con un alto potencial de rendimiento, además de ser económico y accesible (Anexo 5).

3.6 Adaptación de plántulas de orquídeas a cultivos *ex vitro*

En esta experiencia se comprobó la factibilidad del uso de partículas de balsa para adaptar plántulas de orquídeas al ambiente *ex vitro*.

En la tabla 31 se muestran los porcentajes promedio de crecimiento en cada recipiente. Estos se obtuvieron de la diferencia entre las longitudes iniciales y finales de cada planta (Anexo 6 y Anexo 7). El análisis de varianza (ANOVA) indicado en la tabla 32, muestra que la fuente de variación, es decir cada tipo de sustrato utilizado, fue altamente significativo dentro de los resultados. Tuvieron una influencia directa, mientras que los resultados de las especies de orquídeas no presentan significancia alguna. El coeficiente de variación fue de 3,41.

Tabla 31.*Porcentaje promedio de crecimiento longitudinal del tallo especies de orquídeas*

Repetición	Tratamiento	Especie	Crecimiento longitudinal del tallo (mm)
R1	T1	<i>Epidendrum jamiesonis</i>	50,00
	T2		50,00
	T3		47,30
	T4	<i>Epidendrum schistochilum</i>	52,16
	T5		49,30
	T6		45,30
R2	T1	<i>Epidendrum jamiesonis</i>	51,30
	T2		51,30
	T3		50,20
	T4	<i>Epidendrum schistochilum</i>	49,40
	T5		48,16
	T6		48,00
R3	T1	<i>Epidendrum jamiesonis</i>	52,60
	T2		50,50
	T3		48,30
	T4	<i>Epidendrum schistochilum</i>	50,10
	T5		51,30
	T6		46,20
R4	T1	<i>Epidendrum jamiesonis</i>	51,30
	T2		50,90
	T3		48,60
	T4	<i>Epidendrum schistochilum</i>	50,90
	T5		52,00
	T6		51,20
R5	T1	<i>Epidendrum jamiesonis</i>	53,60
	T2		49,20
	T3		50,60
	T4	<i>Epidendrum schistochilum</i>	54,90
	T5		51,20
	T6		45,40

Nota: Realizado por los autores (2016)

Tabla 32.

Anova para el promedio de crecimiento longitudinal del tallo en Epidendrum jamiesonis y Epidendrum schistochilum.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Modelo	67,05	3	22,35	7,65	0,008 **
Sustratos	63,60	2	31,80	10,89	0,004**
Especies	3,45	1	3,45	1,18	0,2867 ns
Error	75,92	26	2,92		
Total	142,97	29			

CV= 3,41

**= altamente significativo al 5%

Ns= nada significativo

Nota: Realizado por los autores (2016)

La media de crecimiento del tallo en sustratos de fibra de coco fue de 51,63 mm mientras que en sustrato de balsa fue de 50,39 mm; estos no son significativamente diferentes. En el rango B se encuentran los sustratos comerciales de *Sphagnum* con un promedio de crecimiento longitudinal del tallo de 48,11 mm como se indica en la tabla 33 y el anexo 8.

Tabla 33.

Prueba de Duncan al 5% para tratamientos en el crecimiento longitudinal del tallo en plantas de orquídea

Sustrato	Medias	Rangos
Fibra de coco	51,63	A
Balsa	50,39	A
<i>Sphagnum</i>	48,11	B

Nota: Realizado por los autores (2016)

La prueba de Duncan al 5% para comparar los resultados obtenidos en el crecimiento longitudinal del tallo de dos especies de orquídeas (Tabla 34) presentó solo 1 rango significativo; no existe diferencia significativa entre los resultados de las 2 especies.

Tabla 34.

Prueba de Duncan al 5% para especies en el crecimiento longitudinal del tallo en plantas de orquídea

Especies	Medias	Rangos
<i>Epidendrum jamiesonis</i>	50,38	A
<i>Epidendrum schistochilum</i>	49,70	A

Nota: Realizado por los autores (2016)

Las plántulas que se mantuvieron en adaptación en sustratos de fibra de coco y de balsa presentaron un porcentaje de supervivencia del 100% tanto en *Epidendrum jamiesonis* como en *Epidendrum schistochilum*. Para el caso de los sustratos de *Sphagnum* se presentó un porcentaje de mortalidad del 8,33% que equivale a 5 plántulas que no sobrevivieron, 3 pertenecientes a la especie *Epidendrum schistochilum* y 2 a *Epidendrum jamiesonis* (Anexo 9).

3.6.1 Discusión

Según el estudio realizado por Rodríguez (2002, págs. 53-54) la fibra de coco utilizada como sustrato tiene un 99% de eficacia para la supervivencia de orquídeas. De igual manera Nogueira (2001) señala que la fibra de coco es un sustrato que posee las características físicas y químicas más cercanas al sustrato ideal y le confiere condiciones favorables para la utilización del mismo en el cultivo de muchas plantas. El trabajo presentado por Jiménez (2013, pág. 12) menciona que el mejor medio debe contemplar

un buen soporte a la planta y mantener la humedad y aireación recomendando como sustrato *Sphagnum*, árbol de helecho, fibra de Osmunda, tozos y fibra de coco, lava de roca, carbón vegetal, corcho, turba y lana de roca. Godoy (2013, pág. 13) describe al aserrín de madera como un sustrato ideal, ya que presenta una buena capacidad de retención de humedad, un bajo costo y la facilidad de desmoronarse al tacto. En este estudio el aserrín de balsa tomó un papel importante en el cultivo externo de orquídeas debido a su alta retención de humedad (44,44% en condiciones normales y 17,95% en condiciones extremas), además da un buen soporte a la planta al mezclar partículas de balsa de tamaño 1,18mm y 710µm, también proporciona buena aireación añadiendo piedra pómez, con este sustrato se obtuvo porcentajes de supervivencia del 100% al igual que la fibra de coco, mientras que el sustrato con base de *Sphagnum* que presentó un 91,67% de supervivencia. Estos resultados evidencian la capacidad de la balsa como sustrato externo, su fácil manejo y compactación permite una mejor superficie para la siembra y estabilidad.

Conclusiones

Se logró identificar la ubicación y distribución en el Ecuador de la balsa *Ochroma pyramidale* Urb. MALVACEAE. Esta especie tiene una amplia distribución, principalmente en la región Costa y Amazónica, siendo esta una especie única en el Ecuador su cultivo es principalmente destinado para la exportación.

El análisis físico realizado en la madera de balsa determina que esta especie presenta un porcentaje alto de retención de humedad en condiciones normales y extremas para el tamaño de aserrín >2mm siendo, de esta manera un medio adecuado para el cultivo externo y el cultivo *in vitro* de orquídeas. Los análisis químicos realizados permitieron demostrar que la balsa presenta componentes químicos (ceniza, lignina insoluble, holocelulosa, α -celulosa y hemicelulosa) similares a los presentados en México por Honorato-Salazar y Colaboradores en el año 2015.

Se logró comprobar que el uso de aserrín de balsa como base en medios de cultivo *in vitro* y externo de orquídeas presenta resultados positivos y resulta ser un medio económico y accesible. Los resultados fueron comparados con medios y sustratos comerciales y se demostró que la balsa tiene efectos similares en el cultivo de orquídeas.

En el caso del cultivo externo, el sustrato elaborado a partir de balsa presentó un 100% de supervivencia al igual que el tratamiento con fibra de coco, mientras que el tratamiento con *Sphagnum* tuvo un 8,33% de mortalidad.

En lo referente al crecimiento del tallo de las plántulas, los sustratos de fibra de coco y balsa son los que presentan mejores resultados en comparación al sustrato de *Sphagnum*.

Recomendaciones

Para el cultivo *in vitro* de orquídeas, el aserrín de balsa de tamaño 850µm y 710µm se puede utilizar como sustituto de los gelificantes de medios de cultivo *in vitro*. Además de ser un material muy económico es fácil de obtener ya que el aserrín de esta especie no se le ha dado un uso específico. Por lo que es recomendable la elaboración de sustratos comerciales con el uso de balsa añadiendo nutrientes específicos para cada etapa de desarrollo de las orquídeas.

Para mejorar la germinación en la siembra *in vitro* de orquídeas se recomienda usar carbón activo (2g/L) ya que de esta manera se agiliza y mejora la capacidad de las semillas para germinar obteniendo plántulas en menor tiempo.

En el caso de la elaboración de sustratos para cultivo de orquídeas, se recomienda usar partículas de balsa de 1,18 a 5 mm ya que retiene hasta un 40% de humedad, reduciendo la frecuencia del riego. Además sugerimos el uso de un 8% de balsa respecto al peso total del medio de cultivo.

Se debe tomar en cuenta el uso de un agente anti fúngico en el cultivo externo de orquídeas en sustratos de balsa, este elemento evitará la contaminación y reducirá el tiempo de adaptación de la plántula al medio externo.

Referencias bibliográficas

- Abdelnour, A., & Vincent, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de Tejidos Vegetales*. CATIE. Turrialba: Centro Agronómico Tropical De Investigación y Enseñanza.
- Acosta-Durán, C. M., Gallardo, C. S., Kämpf, A. N., & Becerra, F. C. (Octubre de 2008). Materiales regionales utilizados en latinoamérica para la preparación de sustratos . *PRODUCCIÓN AGRÍCOLA*, 5(2), 103.
- Asociación Costarricense de Orquideología. (2008). *Ticorquídeas*. San José: XXXVII Exposición Nacional de Orquídeas.
- Balsebot International INC. (2013). *Balsebot*. Recuperado el 2 de Febrero de 2017, de Balsebot: <http://balsebot.info/es/usos-de-madera-balsa/>
- Bastidas, D. F. (2009). *Evaluación de cinco sustratos en cultivo de orquídeas en el Cantón Puerto Quito, Provincia de Pichincha*. Tesis de Pregrado, Universidad De Las Américas, Quito.
- Berjon, M., Murray, P., & Carrión, C. (2004). *Los sustratos en los cultivos sin suelo* (Mundi Prensa ed.). Madrid: Urrestarazu-Gavilán.
- Bernabé-Santiago, R., Ávila-Calderón, L. A., & Rutiaga-Quñones, J. G. (2003). Componentes químicos de la madera de cinco especies de pino del municipio de Morelia, Michoacán. *Madera y Bosques*, 19(2), 21-35.
- Botánico online. (2016). *Botánico-online*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2016, de <http://www.botanical-online.com/medicinalsfibratipos.htm>
- Cabrera, R. (2002). VI. Manejo de sustratos para la producción de plantas ornamentales en maceta. Buenavista.
- Carrión, A. V., & García, C. R. (2010). Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica. 30. Cuenca, Ecuador.
- Cerna, M. (2016). Determinación del porcentaje de humedad. (A. Carlozama, & P. Salas, Entrevistadores) Quito, Pichincha, Ecuador.
- Cerna, M., Aucapiña, C., & López, P. (2016). Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel *in vitro*. (G. F. Olmedo, Ed.) *ESPE: Revista Congreso de Ciencia y Tecnología*, 11, 12-19.

- Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. (2014). Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez – Morona Santiago, Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 20(2), 5-19.
- Citroni, M. A., Marzocchi, V. A., Taleb, M. C., Fernández, E., Adell, A. M., Zanuttini, M. A., & Formento, J. C. (2007). Fundamentos de producción de pastas celulósicas. Argentina.
- Díaz, L., Medina, L., Lafite, J., Digonzelli, P., & Sosa, S. (2004). *Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz*. Buenos Aires.
- Díaz-Toribio, M. (2013). *Manual de cultivo de Orquídeas*. Veracruz.
- Ecuador forestal. (2012). Ficha Técnica N° 7 Balsa. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Ecured. (2012). *Ecured*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2016, de <https://www.ecured.cu/Ceniza>
- Ecured. (2013). *Ecured*. Recuperado el 13 de Octubre de 2016, de [https://www.ecured.cu/Balsa_\(Ochroma_pyramidale\)](https://www.ecured.cu/Balsa_(Ochroma_pyramidale))
- Everest Sociedad Anónima. (2014). *Tecnología industrial II*. España.
- Flores-Escobar, G., Gil-Vásquez, I., Colinas-León, M. T., & Mata-Rosas, M. (2011). Propagación in vitro de la orquídea *Brassia verrucosa* bateman ex. Lindl. *Chapingo Serie Horticultura*, 17(1), 5-8.
- Fonseca, M. R. (Mayo de 2006). *Determinación de la composición química de la madera de Pino Candelillo (Pinus maximinoi H. E. Moore) procedente de la finca Río Frío, TACTIC, ALTA VERAPAZ*. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ingeniería, San Carlos.
- Freuler, M. J. (2008). *Orquídeas* (Primera ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros SACI.
- GAD municipal de Limón Indanza. (2015). *GAD municipal de Limón Indanza*. Recuperado el 9 de Enero de 2017, de <http://www.limonindanza.gob.ec/limonindanza/index.php/10-inicio/238-floreCIMIENTO-de-la-orquidea-sobralia-rosea.html>
- Godoy, M. E. (2013). "Evaluación de cuatro tipos de sustratos orgánicos en la reproducción vegetativa de orquídeas cattleya en maceteros en el cantón Cayambe, Provincia de Pichincha". 13. El Ángel, Ecuador.
- González, B., Cervantes, X., Torres, E., Sánchez, C., & Simba, L. (2010). Caracterización del cultivo de balsa (*Ochroma pyramidale*) en la provincia de Los Ríos - Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 3(2), 7-11.

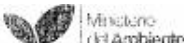
- Honorato-Salazar, J. A., Aburto, J., Apolinar-Hidalgo, F., & Colotl-Hernández, G. (2015). Principales componentes químicos de la madera de *Ceiba pentandra*, *Hevea brasiliensis* y *Ochroma pyramidale*. *Madera y Bosques*, 21(2), 131-146.
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. (2012). *PRO ECUADOR*. Recuperado el 01 de 12 de 2016, de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/02/PROECU_PPM2012_BALSA_CHINA.pdf
- Internet Orchid Species Photo Encyclopedia. (2017). *Internet Orchid Species Photo Encyclopedia*. Recuperado el 17 de Enero de 2017, de Internet Orchid Species Photo Encyclopedia
- Jiménez, N. (2013). Sustrato, soluciones nutritivas y concentración nutrimental de las orquídeas Epifitas amenazadas *Paphiopedilum insigne*. 12. Montecillo, Texcoco, México.
- Jorgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). *Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador* (Vol. 75). St. Louis Missouri: Department of Biology University of Missouri-St. Louis. Recuperado el 8 de Febrero de 2017
- Kuhns, L. (2016). *eHow en español*. Recuperado el 11 de Octubre de 2016, de http://www.ehowenespanol.com/habitat-natural-orquideas-sobre_138578/
- Machado-Neto, N., Custódio, C., Hosomi, S., Seaton, P., & Marks, T. (2012). *Protocolo para pruebas de Tetrazolium en semillas de orquídeas*.
- Maldonado, R. (2003). *Establecimiento de una composta comunitaria en San Andres Cholula y determinación del efecto de sus lixiviados en un cultivo de girasol (Helianthus annuus)*. Tesis Licenciatura. Biología con área en Ecología, Universidad de las Américas Puebla, Departamento de Química y Biología, Escuela de Ciencias, Cholula.
- Ministerio de Turismo del Ecuador. (2013). *Ministerio de Turismo*. Recuperado el 11 de Octubre de 2016, de <http://www.turismo.gob.ec/oficialmente-ecuador-es-el-pais-de-las-orquideas/>
- Molina, J. C. (2012). *"EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININA PARA LA GERMINACION DE SEMILLA EN Comparettia speciosa Rchb.f."*. Tesis, Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuenca.
- Morales, L., & Varón, T. (2006). Árboles Ornamentales en el Valle de Aburrá.
- Morcillo, G., Cortés, E., & García, J. L. (2013). *Biotecnología y alimentación*. Madrid: UNED cuadernos.

- Moreira, N. (2013). *Proyecto de factibilidad para la creación para la creación de una microempresa de siembra y aserrado de madera (balsa), ubicada en la provincia de Los Ríos, cantón buena-fe y su comercialización en la provincia del Guayas*. Loja.
- Mosqueda, A. M., Cázares, J. G., Lázaro, E. D., & Flores, A. (2010). Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. 1, 13. Villa Hermosa, Tabasco: Colección José N. Rovirosa, Biodiversidad, Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo.
- Muñoz, Z. D. (2007). Comparación del sustrato de fibra de coco con los sustratos de corteza de pino compostada, perlita y vermiculita en la producción de plantas de *Eucalyptus globulus* (Labill). 4. Valdivia, Chile.
- Nauray, W. (2013). *Manual de Orquídeas. Identificación y Origen*. Lima.
- Nogueira, V. (2001). *Comunicación personal*. Baracoa.
- Osorio, B. G., Molina, X. C., Navarrete, R. T., Fonseca, C. S., & Simba, L. (2010). Caracterización del cultivo de balsa (*Ochroma pyramidale*) en la provincia de Los Ríos-Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 3(2), 7-11.
- Pacheco, C. B. (Abril de 2002). *Síntesis de carboximetilcelulosa (CMC) a partir de pastas de plantas anuales*. UNIVERSIDAD ROVIRA I VIRGILI, Departamento de Ingeniería Química, Tarragona.
- Papinutti, V. L., Diorio, L. A., & Forchiassin, F. (2003). Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20, 16-20.
- Parra, P. (2016). La balsa, la apuesta del sector maderero. *Revista Gestión*, 42-44.
- Pérez, W. V. (2012). Proyecto de factibilidad agroforestal para siembra de balsa (*Ochroma pyramidale*) para la península de Santa Elena en la comunidad de Limoncito. Guayaquil, Ecuador.
- Quintero, M. F., González, C. A., & Guzmán, J. M. (2011). *Sustrato para cultivos hortícolas y flores de corte*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, L. (2002). *Micropropagación de orquídeas silvestres (Encyclia oxypetala (Lindl.) Acuña y Encyclia phoenicea (Lindl.) Neum)*. Universidad Central Martha Abreu De Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara: Instituto De Biotecnología de las Plantas.

- Rodríguez, S., & Torres, M. (1994). Análisis cuantitativo de componentes principales y secundarios en la corteza de diversas especies nativas y exóticas de la provincia de Llanquihue, X Región, Chile. Valdivia, Chile.
- Roig, F. A. (2011). *Madera: formación, composición química y estructura anatómica*.
- Rowell, R. M., Pettersen, J. S., Han, J. S., Rowell, & Tghabalala, M. A. (2005). Cell Wall Chemistry. *Handbook of wood chemistry and wood composites*, 35-74. Boca Ratón, Florida, EUA: CRC Press.
- Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 61(1), 69-78.
- Serrano, E. (2009). Guía para el cultivo y Mantenimiento de Orquídeas Amenazadas en Costa Rica. (ISBN: 978-9977-972-18-3), 1 ed, 62. San José, Costa Rica.
- Singer, R. B. (2009). Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta biológica colombiana*, 14, 337-348.
- TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry). (2006-2007). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T 222 om-02. *TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing*, 5. Atlanta, GA, EUA.
- TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry). (2006-2007). Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C, Test Method TAPPI/ANSI T 211 om-12. *TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing*, 5. Atlanta, GA, EUA.
- TecNALIA. (2016). *TecNALIA Inspiring Business*. Recuperado el 27 de Diciembre de 2016, de <http://www.tecnalia.com/es/servicios-tecnologicos/laboratorios/laboratorio-de-analisis-quimicos/laboratorio-de-analisis-quimicos.htm>
- The Plant List. (2013). *The Plant List*. Recuperado el 11 de Octubre de 2016, de <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/>
- Trópicos. (2017). *Trópicos.org. Missouri Botanical Garden*. Recuperado el 9 de Febrero de 2017, de <http://www.tropicos.org/Name/3900204?tab=distribution>
- Vctrac. (2016). *Real Academia de Ciencias Exactas*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2016, de Vctrac: <https://vctrac.es/index.php?title=holocelulosa>
- Vinueza, M. (2012). *Ecuaforestal*. Recuperado el 12 de Octubre de 2016, de <http://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-7-balsa/>

Anexos

Anexo 1. Patente del Jardín botánico de orquídeas de Sarina


Ministerio
del Ambiente

**PATENTE DE MANEJO DE VIDA SILVESTRE
2017**

Número: 005-2017-FLO-DPAP-MA	Lugar y Fecha: Quito, 14 de febrero de 2017
--	--







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:

1. Solicitud de renovación de patente presentada por: Sara Gloria Gutiérrez Torres, mediante oficio s/n de fecha 24 noviembre 2016.
2. Valoración del informe anual y proyectos: Ing. Diego Morillo
3. Complementos de manejo autorizados: Manejo de flora silvestre con fines comerciales y fines recreacionales.
4. Contraparte institucional y responsabilidad técnica delegada a: Unidad de Patrimonio Natural, Dirección Provincial del Ambiente Pichincha.
5. Duración: 14 de febrero de 2017 al 13 de febrero de 2018
6. Inspección realizada al vivero y a las instalaciones del laboratorio: 28 de diciembre del 2016 por el Ing. Diego Morillo G.
7. Obligaciones del beneficiario:
 - 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.


Lic. Rafael Mera Curi
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA, Encargado

Dirección Provincial del Ambiente Pichincha, Av. Amazonas N24 - 196 y calle Luis Cordero,
Edificio CONTEMPO, 3º piso, Quito - Ecuador
Teléfono: 0011 2244 2000

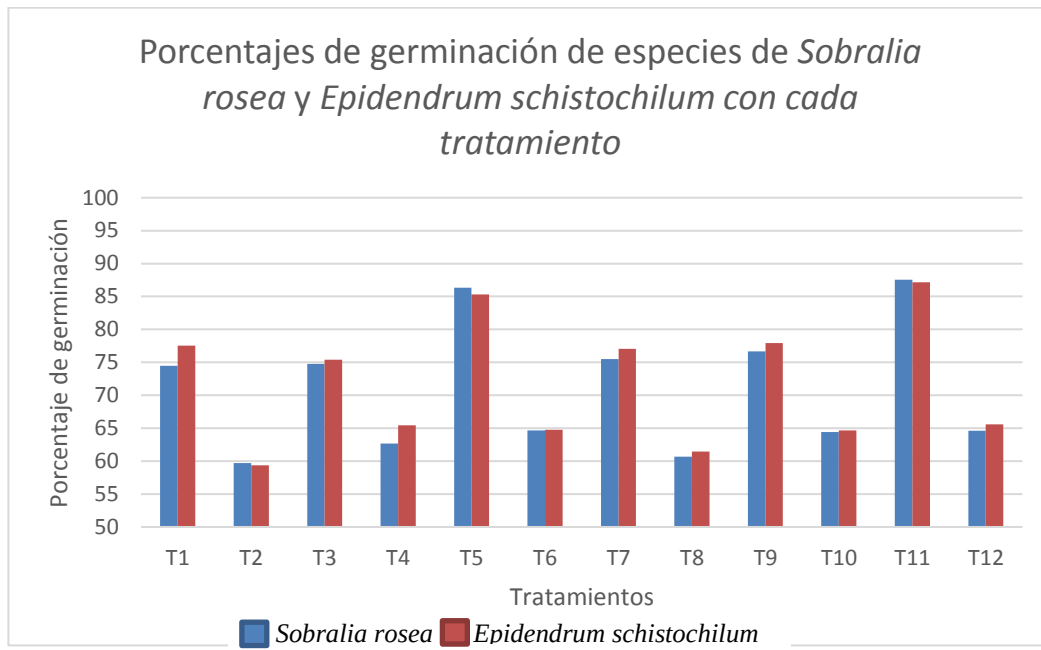
Anexo 2. Día de inicio de germinación para cada tratamiento

Tratamiento	Día de germinación					
	<i>Sobralia rosea</i>			<i>Epidendrum schistochilum</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T0	22	20	20	19	20	18
T1	28	25	28	26	27	27
T2	45	43	40	40	40	42
T3	25	23	25	24	25	25
T4	40	38	41	40	42	40
T5	25	22	23	21	23	22
T6	40	36	38	36	38	38
T7	27	25	26	25	26	25
T8	43	40	42	40	42	40
T9	26	24	25	26	27	25
T10	41	39	42	40	40	41
T11	20	20	21	22	20	23
T12	40	42	40	38	40	40

R= repetición

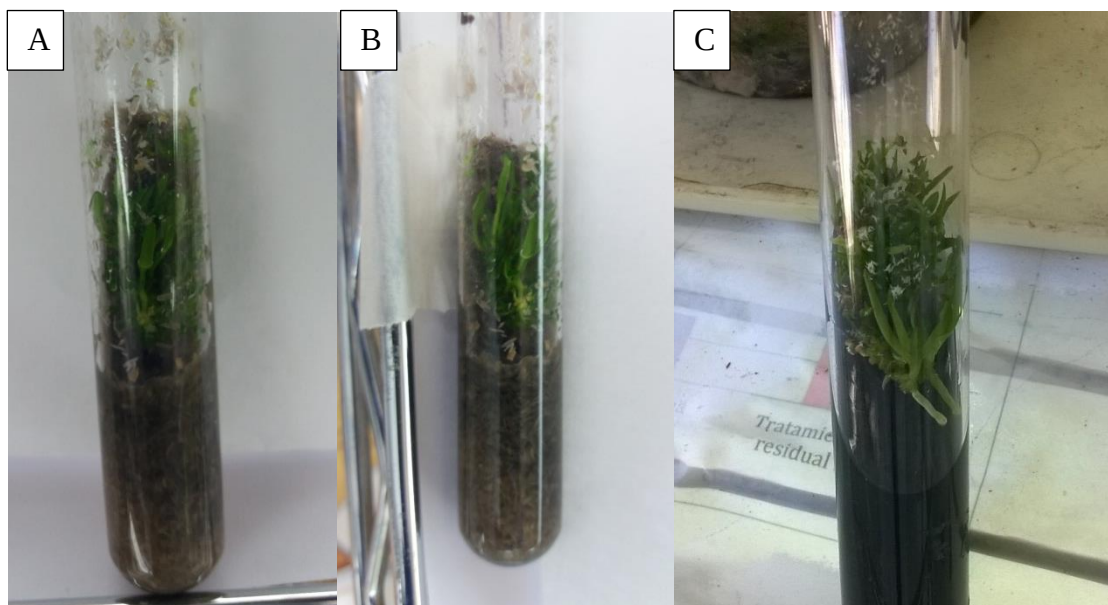
Nota: Realizado por los autores (2016)

Anexo 3. Porcentajes de germinación de *Sobralia rosea* y *Epidendrum schistochilum* en función del tratamiento sin el testigo



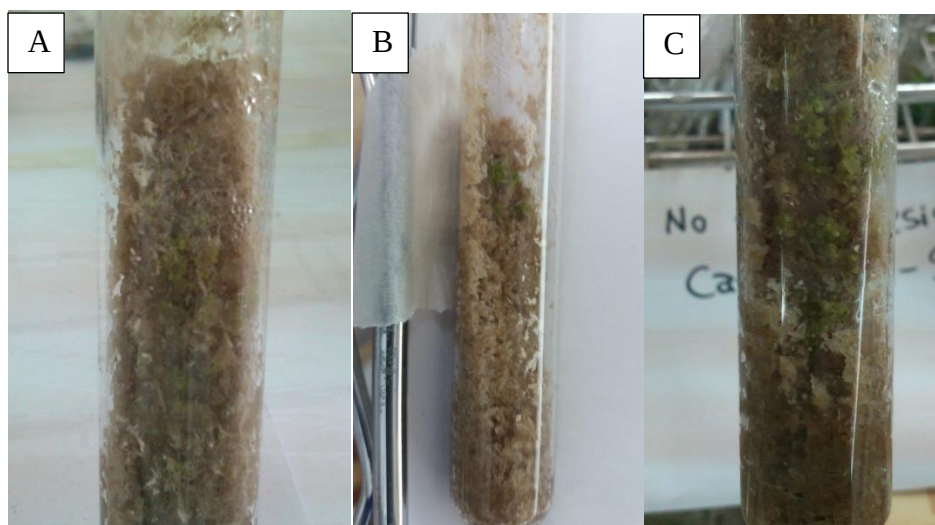
Nota: Realizado por los autores (2016)

Anexo 4. Formación de plántulas en medio de 9 mL de MS con carbón activo en balsa de 710µm junto con el testigo



Nota: Crecimiento de plántulas A) semillas de *Sobralia rosea*, B) semillas de *Epidendrum schistochilum*, y C) semillas en el testigo de *Sobralia rosea*
Realizado por los autores (2016)

Anexo 5. Germinación de las semillas de orquídeas



Nota: Germinación de las semillas de orquídeas en balsa con 7,8,9 mL de MS, sin carbón activo a los 25 días de experimentación A) Formación de protocormos, B) Germinación de semillas, C) Germinación de semillas y próxima formación de plántulas

Nota: Realizado por los autores (2016)

Anexo 6. Crecimiento durante 60 días del tallo de *Epidendrum jamiesonis* en milímetros

Repetición	Sustrato	Planta					
		P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	T1	47	49	52	58	36	58
	T2	49	52	45	48	53	53
	T3	48	49	49	45	50	43
2	T1	50	47	55	54	49	53
	T2	52	55	48	52	51	50
	T3	49	47	53	54	52	46,5
3	T1	56	48	53	53	54	49
	T2	51	53	54	48	49	48
	T3	45	50	52	50	48	45
4	T1	53	49	55	46	55	50
	T2	49	57,5	52	52	47	48
	T3	50	48	52,5	46	50	45
5	T1	56	49	57	56	51	53
	T2	48	50	45	53	50	49
	T3	48	55	54	55	47	45

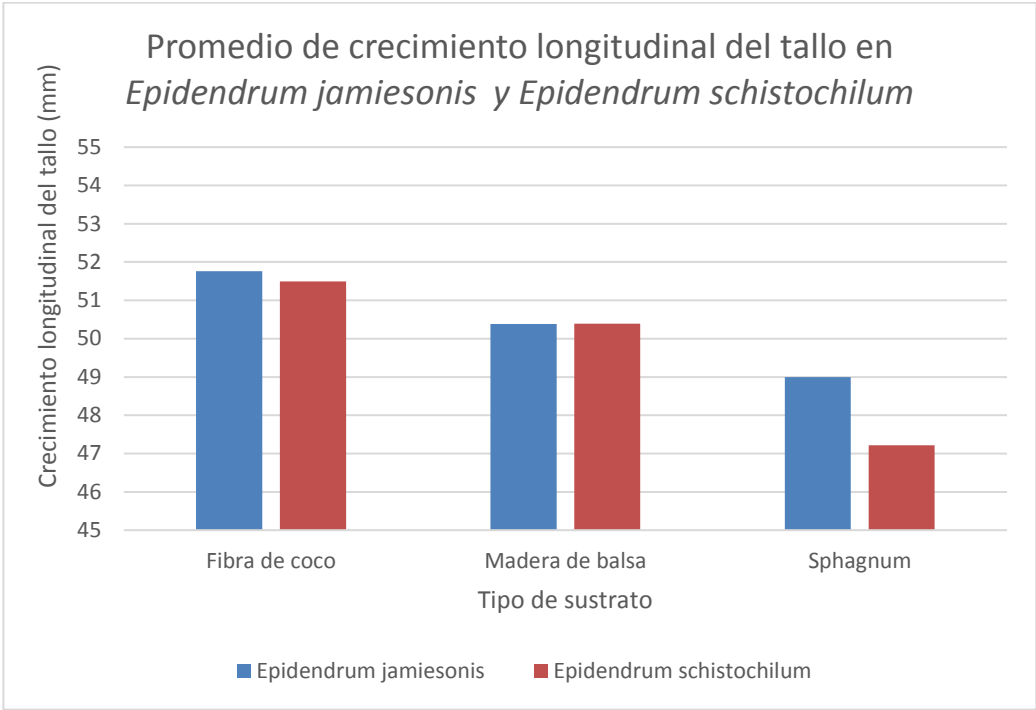
Nota: Realizado por los autores (2016)

Anexo 7. Crecimiento durante 60 días del tallo de *Epidendrum schistochilum* en milímetros

Repetición	Sustrato	Planta					
		P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	T4	53	56	48	50	52	54
	T5	49	47	53	52	50	45
	T6	44	42	46	46	47	47
2	T4	44	52,5	51	46	52	51
	T5	47	47	48	52	47	48
	T6	46	50	52	48	47	45
3	T4	55	46,5	51	50	49	49
	T5	52	53	57	48	53	51
	T6	47	50	44	44	47	45
4	T4	52	55	48	46	52,5	52
	T5	55	54	50	51	54	48
	T6	55	51	50	53	50	48
5	T4	56	53	51,5	56	55	58
	T5	50	56	48	50	57	46
	T6	44	48,5	46	47	44	43

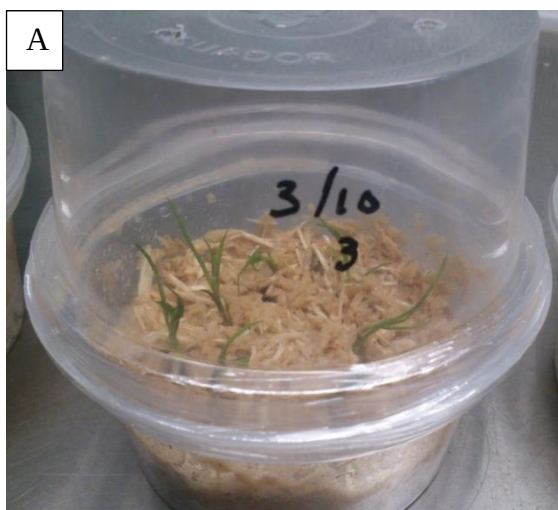
Nota: Realizado por los autores (2016)

Anexo 8. Promedio del crecimiento longitudinal del tallo de *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum* en función del tipo de sustrato

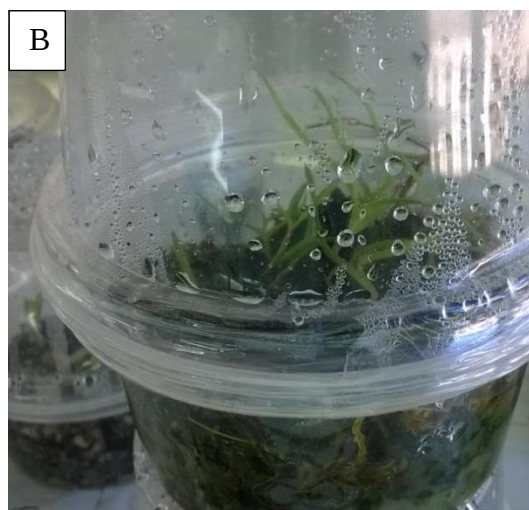


Nota: Realizado por los autores (2016)

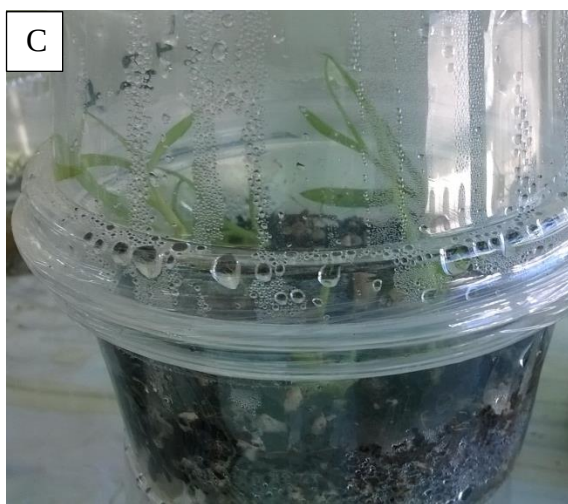
Anexo 9. Cultivo externo de orquídeas



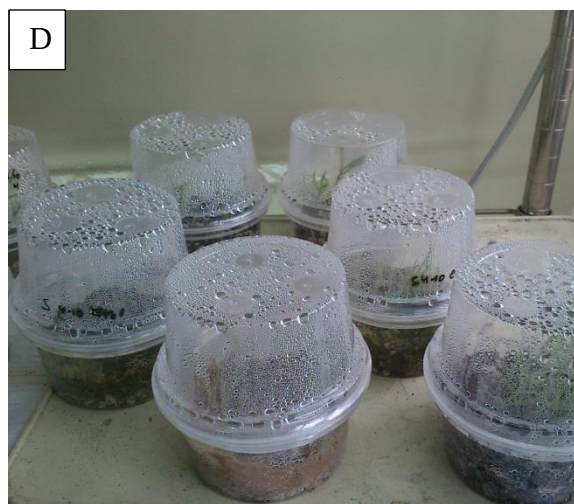
Balsa



Sphagnum



Fibra de coco



Adaptación de plántulas

Nota: Proceso de adaptación de plántulas en diferentes sustratos A) sustrato a base de balsa para *Epidendrum schistochilum*, B) sustrato a base de *Sphagnum* para *Epidendrum schistochilum*, C) sustrato a base de fibra de coco para *Epidendrum schistochilum*, D) Proceso de adaptación de plántulas en diversos sustratos en recipientes plásticos

Nota: Realizado por los autores (2016)