UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Tesis previa a la obtención del Título de:

Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales

TEMA:

"COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE LA FAMILIA *ORCHIDACEAE* DEL CANTÓN SANTIAGO DE MÉNDEZ - MORONA SANTIAGO"

AUTORAS:

NELLY SILVANA CÁRDENAS RODRÍGUEZ

ANDREA MERCEDES CRUZ ALDEÁN

DIRECTOR:

MARCO CERNA

Quito, Octubre del 2012

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Declaramos bajo juramento, que el presente trabajo de grado: **"Colección de Germoplasma de Orquídeas (*Orchidaceae*) del Cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago"** aquí descrito, es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de esta declaración, el contenido y el aporte científico que este representa, son de exclusiva responsabilidad de las autoras. Cedemos nuestros derechos de propiedad intelectual a la Universidad Politécnica Salesiana de Quito, bajo la Ley de propiedad intelectual y la normativa institucional vigente.

Quito, Octubre del 2012.

Cárdenas Rodríguez Nelly Silvana
1400730139

Cruz Aldeán Andrea Mercedes
1104724081

DEDICATORIA

A ti Dios, por ser dador de vida y salud para lograr mis objetivos. A mi madre Mafalda, por ser mi ángel terrenal, mi amiga y mi inspiración para salir adelante. A mi padre Aníbal, por todos sus consejos y valores inculcados. Gracias padres por toda su paciencia y amor, esto es especialmente para ustedes.

También dedico este trabajo con afecto a mis hermanas Caro y Nohe, la luz de mis ojos. A toda mi familia, por estar pendientes de mí, por sus palabras de cariño. A mis profesores, que confiaron en mí. A mis amigos que les considero hermanos, por su aprecio y respaldo. Al hombre de mi corazón. Para ustedes con amor.

Andrea Mercedes

Este trabajo de tesis de grado está dedicado a mis queridos Padres y Hermana: Jorge, Clarita y Paty, quienes han estado a mi lado ayudándome a cumplir una etapa más en mi vida; dándome cariño, ejemplo y apoyo incondicional, que han hecho de mi una persona con humanos valores, y así, poder desenvolverme como: Hija, Hermana y Profesional.

Me complace de sobre manera a través de este trabajo exteriorizar mi sincera gratitud y dedicatoria al *VolontariatoInternazionale per lo Sviluppo* (VIS), que bridándome una beca estudiantil durante dos años, me ayudaron con gran parte del financiamiento de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de Recursos Naturales en la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito.

A toda mi familia residente en la ciudad de Quito, que durante todo este tiempo debido a la distancia, han sabido darme acogida, apoyándome en el transcurso de mi estudio.

A mis amigos/as, conocidos/as por el cariño, respeto y la consideración que han sabido manifestarme dándome mensajes de aliento y aguante en etapas difíciles de la vida.

Nelly Silvana

AGRADECIMIENTO

Al Ministerio del Ambiente (MAE), especialmente al Zootecnista Víctor León, por su asistencia técnica y administrativa durante todo el proyecto.

A la Universidad Politécnica Salesiana, por su acogida, formación académica y su apoyo a través de los fondos concursables para investigación bajo el Proyecto "Banco de Germoplasma de especies de Orquídeas Endémicas del Ecuador, Fase 1".

Al Laboratorio CIVABI (Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad), de la Universidad Politécnica Salesiana, por toda su cooperación.

Al Doctor Marco Cerna, por su dirección en el desarrollo y culminación del presente trabajo; a la vez el agradecimiento a su esposa Lcda. Paulina Valdivieso.

A la Ing. Diana Calero, Directora de la carrera de Biotecnología, por haber respondido a todas nuestras consultas siempre que lo hemos necesitado.

A la Ing. Ivonne Vaca, el agradecimiento profundo, por su ayuda desinteresada en la redacción de este trabajo investigativo.

Al Sr. Gil Cabrera, la Sra. Leonor Tenesaca, quienes de forma amable y desinteresada nos permitieron el acceso a sus terrenos para realizar las colectas de orquídeas, brindándonos información de las zonas de estudio.

Al Sr. Jorge Cárdenas y la Sra. Clara Rodríguez, por su contribución permanente en el cuidado y labores culturales efectuadas en invernadero.

A nuestros amigos y compañeros, por su respaldo, aprecio y amistad sincera.

LAS AUTORAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, QUITO

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍADE LOS RECURSOS NATURALES

Tesis previa a la obtención del Título de: Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales

"Colección de Germoplasma de especies de la familia *Orchidaceae* del Cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago"

Cárdenas Rodríguez Nelly Silvana - Cruz Aldeán Andrea Mercedes

DIRECTOR: Dr. Marco Cerna
Quito, Octubre del 2012

RESUMEN

Las amenazas antrópicas que recibe el hábitat de las orquídeas, han promovido iniciativas en pro de su conservación. Por consiguiente, el almacenamiento de semillas de orquídeas en un banco de germoplasma, constituye una herramienta biotecnológica útil para la conservación de estas especies amenazadas. El presente estudio, tuvo dos fases, una en campo y otra en laboratorio. La recolección en campo, se realizó en tres zonas del Cantón Santiago de Méndez: Copal, Tres Ranchos y La Delicia, donde se obtuvieron 50 orquídeas de 15 géneros distintos en 600m2, las mismas que fueron conservadas ex situ en un invernadero en la ciudad de Macas, hasta que sus cápsulas maduraron. Posteriormente, en el laboratorio CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito, las semillas se extrajeron y desecaron en campanas con sílica gel por dos días; se almacenaron las semillas de 12 especies de orquídeas en vacuntainers, a través de dos métodos: a) en refrigeración a 4ºC, más oscuridad y b) a temperatura ambiente 20 ± 2 ºC, más luz. Determinándose que el almacenamiento a 4ºC con una humedad relativa del 6-10%, es el mejor método. Esto se evidenció con la prueba de viabilidad de tetrazolio 1%, presentando coloración roja para semillas viables y blancas para no viables; mediante conteo en microscopio, se comprobó que la especie *Sobralia rosea* presentó el mayor porcentaje con 90% de viabilidad y *Brassia arcuigera* el menor porcentaje con 75%. Para la germinación asimbiótica in vitro, se evaluaron cinco tratamientos: M&S (T1), M&S+ cinco veces vitaminas (T2), M&S + auxinas (T3), M&S + carbón activado 1% (T4) y Knudson C (T5), donde se estableció que los medios óptimos de germinación in vitro para todas las especies en estudio, fueron: M&S + carbón activado al 1% (T4), seguido de M&S (T1), y por último M&S + cinco veces vitaminas (T2). Las orquídeas, indistintamente del tratamiento, que presentaron mayor porcentaje de germinación in vitro ≥75%, fueron*: S. rosea* (90%), *Sievekingia marsupialis* (90%), *Maxillaria rufescens* y *Epidendrum sp*. (75%); finalmente, las especies con porcentaje ≤50%: *E. nocturna, Rodriguezia batemanii, Rodriguezia sp., Prosthechea vespa* y *Brassia arcuigera*. Actualmente *S. marsupialis*, está catalogada como casi amenazada (NT) en la Lista de Orquídeas Endémicas de Morona Santiago.

Palabras claves: conservación *ex situ*, germoplasma, orquídeas, germinación *in vitro*, viabilidad, almacenamiento, medios de cultivo.

SUMMARY

Anthropogenic threats received by the orchids habitat, have promoted initiatives for its conservation. Therefore, the storage of orchid seeds in a seed bank is a useful biotechnological tool for conservation of threatened species. The present study had two phases, on field and laboratory. The orchid's field collection was conducted in three areas of Cantón Santiago de Mendez: Copal, Tres Ranchos and La Delicia, there, were obtained 50 individuals, then, planted in a greenhouse in Macas city until capsules were matured. Later, in CIVABI laboratory of the Universidad Politécnica Salesiana de Quito, the seeds were removed and dried in silica gel for two days. 12 species of orchids were stored in vacuntainers through two methods: a) refrigerated at 4°C in darkness b) laboratory conditions: 20 ± 2°C with natural light. Storage at 4°C with a relative humidity of 6-10% was the best method. This was evidenced with tetrazolium viability test 1%; counting under microscope, it was found that the species *Sobralia rosea* presented the high percentage 90% viability, and in case of *Brassia arcuigera* the low, 75%. For *in vitro* asymbiotic germination, were evaluated five treatments: M&S (T1), M&S + 5x concentration of vitamins (T2), M&S + auxins (T3), M S+ activated carbon 1% (T4) and Knudson C (T5). It was established the optimal medium for *in vitro* germination for all studied species: M&S+activated carbon 1% (T4), followed by M&S (T1), and finally M&S + 5x concentration of vitamins (T2). In general, orchids showed high *in vitro* percentage germination ≥ 75%. *S. rosea* (90%), *Sievekingia marsupialis* (90%), followed by *Maxillaria rufescens* and *Epidendrum sp.* (75%), finally, species with percentage ≤ 50% were *E. nocturna*, *Rodriguezia batemanii*, *Rodriguezia sp.*, *Prosthechea vespa* and *B. arcuigera.* Currently, *S. marsupialis*, was listed as Near Threatened (NT) on the list of endemic orchids of Morona Santiago.

Keywords: *ex situ* conservation, germoplasm, storage, orchids, *in vitro* germination, viability, culture mediums.

Índice General

INTRODUCCIÓN 1
2. MARCO TEÓRICO 6
2.1 Generalidades de la Familia *Orchidaceae* 6
2.2 Distribución de las Orquídeas 6
2.3 División Taxonómica 6
2.4 Ecología 7
2.5 Las Orquídeas en el Ecuador 8
2.6 Endemismo de Orquídeas en Ecuador 8
2.6.1 Distribución de Orquídeas Endémicas en el Ecuador 9
2.6.2 Endemismo de Orquídeas en Morona Santiago 10
2.6.3 Categorías de Amenaza de la UICN 10
2.7 Estructuras Vegetativas de la Orquídea 11
2.7.1 Estructura Floral 11
2.7.2 Hojas 14
2.7.3 Tallos 15
2.7.4 Raíz 16
2.7.5 Fruto 16
2.7.6 Semillas 17
2.8 Reproducción de las Orquídeas 20
2.8.1 Reproducción Sexual 20
2.8.2 Reproducción Asexual 21
2.9 Cultivo *in vitro* de Orquídeas 27
2.9.1 Siembra Directa 27
2.9.2 Siembra Indirecta 28
2.10 Tipos de Crecimiento de las Orquídeas 29
2.11 Recolección de Orquídeas *in situ* 30
2.12 Mantenimiento de Orquídeas en invernadero 30
2.13 Caracterización y evaluación de Orquídeas 30
2.14 Tratamiento y almacenamiento de semillas en el Laboratorio 31
2.14.1 Registro de accesiones de cápsulas en el Laboratorio 31
2.14.2 Extracción, limpieza y secado de semillas 31
2.14.3 Viabilidad de semillas 32

2.14.4 Almacenamiento y empaque de semillas 34
2.14.5 Tipos de almacenamiento de semillas 35
2.14.6 Documentación final de registros 36
2.15 Conservación de semillas de Orquídeas 36
2.15.1 Conservación *ex situ* de semillas 36
2.16 Características generales de ciertos géneros de orquídeas 37
2.16.1 Género *Maxillaria* 37
2.16.2 Género *Sobralia* 38
2.16.3 Género *Sievekingia* 39
2.16.4 Género *Masdevallia* 39
2.16.6 Género *Pleurothallis* 40
2.16.5 Género *Epidendrum* 41
2.16.7 Género *Xylobium* 42
2.16.10 Género *Prosthechea* 43
2.16.11 Género *Brassia* 43
2.16.9 Género *Huntleya* 44
2.16.8 Género *Stelis* 45
2.16.12 Género *Rodriguezia* 45
2.17 Bancos de Germoplasma 46
2.17.1 Bancos de Germoplasma en América del Sur 46
2.17.2 Bancos de Germoplasma en Ecuador 46
3. METODOLOGÍA 47
4. RESULTADOS 64
5. DISCUSIÓN 100
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 104
7. BIBLIOGRAFÍA 107
ANEXOS 119

Índice Gráficos

Gráfico 1. Ejemplificación de la estructura floral de *Orchidaceae*. 11
Gráfico 2. Estructuras internas de la flor de orquídea. 13
Gráfico 3. Tipos de hojas de orquídeas..... 14
Gráfico 4. Tipos de tallos de orquídeas. 15
Gráfico 5. Fruto de orquídea..... 17
Gráfico 6. Semillas de orquídeas de varias especies. 18
Gráfico 7. Testa de orquídeas visualizadas en microscopio electrónico..... 19
Gráfico 8. Embriones de *Sobralia rosea*. 19
Gráfico 9. Etapas de germinación de las semillas de orquídeas epífitas. 22
Gráfico 10. Tipos de crecimiento en orquídeas. 29
Gráfico 11. a) Descripción Género *Maxillaria* b) Floración *Maxillaria rufescens*. 37
Gráfico 12. a) Desdcripción Género *Sobralia* b) Flor *Sobralia rosea*..... 38
Gráfico 13. a) Desdcripción Género *Sievekingia* b) Floración *S. reichenbachiana*. 39
Gráfico 14. a) Desdcripción Género *Masdevallia* b) Floración *M. strobellii*. 40
Gráfico 15. a) Descripción Género *Pleurothallis* b) Floración *P. dodsoni* 40
Gráfico 16. a) Descripción Género *Epidendrum* b) Floración de *Epidendrum sp*. 41
Gráfico 17. a) Descripción Género *Xylobium* b) Floración de *X. subpulchrum* L. 42
Gráfico 18. a) Descripción Género *Prosthechea* b) Floración de *P. vespa* 43
Gráfico 19. a) Descripción Género *Brassia* b) Floración de *B. arcuigera* 44
Gráfico 20. a) Descripción Género *Huntleya* b) Floración de *Huntleya sp*..... 44
Gráfico 21. a) Descripción Género *Stelis* b) Planta *Stelis itatiayae*. 45
Gráfico 22. a) Descripción Género *Rodriguezia* b) Floración *R. batemanii*. 45
Gráfico 23. Ubicación de las zonas de estudio en el mapa del Ecuador..... 48
Gráfico 24. Ubicación de las zonas de estudio en el Cantón Santiago de Méndez. 48
Gráfico 25. Fotografías del invernadero en la ciudad de Macas 49
Gráfico 26. Proceso de Recolección de Orquídeas..... 51
Gráfico 27. Proceso de siembra de orquídeas en el invernadero. 52
Gráfico 28. Cosecha de cápsulas de orquídeas en invernadero. 53
Gráfico 29. Cápsulas listas para empacarse y trasladarse al laboratorio. 53
Gráfico 30. Proceso de Desecación de semillas 55
Gráfico 31. Semillas almacenadas. 56
Gráfico 32. Procedimiento para realizar el Test de Tetrazolio..... 58
Gráfico 33. Escalas numéricas para evaluación de variables. 63

Gráfico 34. *Sievekingia marsupialis* en campo. 66
Gráfico 35. Identificación de *Sievekingia marsupialis*..... 67
Gráfico 36. Identificación de *Sobralia rosea*..... 68
Gráfico 37. Identificación de *Rodriguezia sp.* 69
Gráfico 38. Identificación de *Prosthechea sp.*..... 70
Gráfico 39. Identificación de *Maxillaria rufescens*..... 71
Gráfico 40. Identificación de *Epidendrum sp.*..... 71
Gráfico 41. Identificación de *Rodriguezia batemanii*. 72
Gráfico 42. Identificación de *Prosthechea vespa*. 72
Gráfico 43. Género de Orquídeeas presentes en inveernadero..... 73
Gráfico 44. Semillas almacenadas en vacuntainers, con sus datos de pasaporte 76
Gráfico 45. Fotografías de cápsulas y observación micróscopica..... 77
Gráfico 46. Fotografías de cápsulas y observación micróscopica..... 78
Gráfico 47. Fotografías de cápsulas y observación micróscopica..... 79
Gráfico 48. Estado de las orquídeas endémicas en Morona Santiago 80
Gráfico 49. Porcentaje de viabilida de semillas en la Prueba de Tetrazolio..... 82
Gráfico 50. Positivo tetrazolio *Sobralia rosea.* 4°C + oscuridad 83
Gráfico 51. Positivo tetrazolio *Sobralia rosea.* T^{o} ambiente 20 ± 2 ºC + luz..... 83
Gráfico 52. Positivo tetrazolio *Sievekingia marsupialis.* 4°C + oscuridad..... 84
Gráfico 53. Positivo tetrazolio *S. marsupialis*. T^{o} ambiente 20 ± 2 ºC + luz..... 84
Gráfico 54. Positivo tetrazolio *Epidendrum sp.* 4°C + oscuridad..... 85
Gráfico 55. Negativo tetrazolio *Epidendrum sp.* T^{o} ambiente 20 ± 2 ºC + luz.. 85
Gráfico 56. Positivo tetrazolio *Maxillaria rufescens.* 4°C+oscuridad..... 86
Gráfico 57. Negativo tetrazolio *M. rufescens.* T^{o} ambiente 20 ± 2 ºC + luz. 86
Gráfico 58. Positivo tetrazolio *Maxillaria guareimensis*. 4°C+oscuridad..... 87
Gráfico 59. Positivo tetrazolio *M. guareimensis.* T^{o} ambiente 20 ± 2 ºC + luz.……....87
Gráfico 60. Positivo tetrazolio *Epidendrum sp*. 4°C+oscuridad..... 88
Gráfico 61. Negativo tetrazolio *Epidendrum sp.* T^{o} ambiente 20 ± 2 ºC + luz 88
Gráfico 62. Positivo tetrazolio *Brassia arcuigera*. 4°C+oscuridad. 89
Gráfico 63. Negativo tetrazolio *B. arcuigera.* T^{o} ambiente 20 ± 2 ºC + luz..... 89
Gráfico 64. Porcentaje de germinación de semillas en estudio 90
Gráfico 65. Germinación *in vitro* de *Sievekingia marsupialis*..... 91
Gráfico 66. Germinación *in vitro* de *Sobralia rosea*. 91
Gráfico 67. Germinación *in vitro* de *Epidendrum sp*..... 92

Gráfico 68. Germinación *in vitro* de *Brassia arcuigera* 92
Gráfico 69. Germinación *in vitro* de *Maxillaria rufescens*..... 93
Gráfico 70. Etapas de germinación en distintos tratamientos..... 94
Gráfico 71. Test de Duncan en función a la variable Turgencia de brotes (TUR)..... 95
Gráfico 72. Test de Duncan aplicado en función de la variable Color (COL) 96
Gráfico 73. Escala para determinar coloración..... 96
Gráfico 74. Evaluación a los dos meses, de semillas en tratamientos ensayados 97
Gráfico 75. Resultados del ensayo de germinación en los tubos de ensayo..... 99

Índice de Tablas

Tabla 1. Evaluación estadística de las orquídeas del Ecuador, en tres años. 9
Tabla 2. Ficha empleada para anotar datos en la recolección en campo. 50
Tabla 3. Formulario de evaluación de características de las semillas almacenadas 56
Tabla 4. Cantidad y composición de soluciones Stock. 60
Tabla 5. Cantidad de vitaminas para preparación de medio M&S. 63
Tabla 6. Formulario de control de variables del proceso de germinación 63
Tabla 7. Ficha de evaluación de tratamienos. 69
Tabla 8. Códigos de orquídeas recolectas e identificación 65
Tabla 9. Cápsulas obtenidas en campo vs. Cosechadas en invernadero. 74
Tabla 10. Tiempo de maduración de cápsulas en invernadero. 74
Tabla 11. Características de las semillas almacenadas en el Banco de Germoplasma. .. 75
Tabla 12. Viabilidad en semillas almacenadas: a 4°C+oscuridad vs. T^{o} ambiente 81
Tabla 13. Mejores tratamientos para germinación *in vitro*, por especie 98

INTRODUCCIÓN

Ecuador, es el país con mayor biodiversidad del mundo en función al número de especies por km^2, está botánicamente bien explorado y cuenta con una lista preliminar de especies en peligro (Endara, 2008). Se ha determinado, que una de cada cinco plantas es orquídea (Jørgensen y León-Yánez, 1999). La Ley de Agrobiodiversidad, Semillas y Fomento Agroecológico del Ecuador, destaca el rol que la naturaleza y el ser humano han jugado en la recombinación del germoplasma para obtener la gran diversidad de genotipos actuales (MAGAP, 2012). En la constitución ecuatoriana, se declara de interés público la conservación de los ecosistemas e integridad del patrimonio genético del país (Asamblea Constituyente del Ecuador, 2008).

La actual profusión de bancos de germoplasma con vocación de preservar plantas silvestres exóticas o en riesgo de extinción a mediano y largo plazo, es consecuencia de los acuerdos y obligaciones adoptados tras la "Cumbre de la Tierra", celebrada en Río de Janeiro en 1992, para evitar la pérdida de diversidad biológica y que quedó materializado en el Convenio de Diversidad Biológica (CDB) (Bachetta y otros, 2008).

En los últimos años, se ha demostrado la necesidad de conservar poblaciones distintivas que permitan conservar el mayor número de representatividad genética en el menor número posible de accesiones en los bancos de germoplasma. Las semillas que se almacenan, son un recurso vital, una herencia que se debe conservar para proveer recursos a futuro, en un mundo que afronta el cambio climático y otros desafíos. Seguir los procedimientos adecuados en el manejo de semillas, para que sean de calidad, es fundamental para conservar los recursos a largo plazo (Rao y otros, 2007).

En este sentido, se realizó la presente investigación con el objetivo de coleccionar semillas de orquídeas del cantón Santiago de Méndez para almacenarlas en el Banco de germoplasma de especies endémicas de la Universidad Politécnica Salesiana. Previo a su almacenamiento, se realizaron pruebas de germinación *in vitro* y viabilidad mediante las cuales se asegura la calidad y longevidad de las semillas. Finalmente, se realizó su almacenamiento en condiciones de temperatura y luz adecuadas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la Amazonía ecuatoriana, gran parte del desarrollo económico ha estado basado en actividades de extracción de especies maderables a pequeña y gran escala, minería, actividades agropecuarias, ampliación de la frontera agrícola, urbanización, agricultura itinerante, entre otros; lo cual se realiza previo a la tala y quema de vegetación, que causa la pérdida del macro y micro hábitat de flora y fauna que albergan (Rioseco, 2010)

En las parroquias: Copal, Tres Ranchos y La Delicia del cantón Santiago de Méndez (Morona Santiago), se ha observado poca participación social en las decisiones concernientes al manejo, utilización y conservación del recurso orquídeas, lo cual, sumado al desconocimiento de su importancia ecológica, económica y social, ha causado el saqueo indiscriminado de especies de interés comercial y ornamental por parte de propios y extraños.

Desde el gobierno se impulsa la conservación de la biodiversidad mediante el Ministerio del Ambiente. Aunque logran existir proyectos de manejo y conservación de orquídeas a través de instituciones particulares nacionales e internacionales, llegan a desinteresarse o incluso a desaparecer, lo que ha provocado erosión genética de la familia *Orchidaceae* en zonas altamente diversas de la provincia de Morona Santiago que encierran un gran valor ecológico.

Las especies objeto de esta investigación, actualmente no se hallan almacenadas en ningún banco de germoplasma del país, por lo que es conveniente realizar el manejo y conservación de su germoplasma en forma de semillas, debido a la información genética que estas contienen. A futuro, se espera que mediante otras investigaciones se complete el Proyecto “Banco de Germoplasma de Especies de Orquídeas Endémicas del Ecuador, Fase 1”, de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, campus Girón.

1.1 JUSTIFICACIÓN

En Ecuador, se estima que anualmente se pierden entre 140 000 - 300 000 hectáreas de bosques, de las cuales el 80% pertenecen a la Amazonía. El 90% de las orquídeas son de hábito epífito, siendo éstas las más afectadas, porque la condición para su desarrollo es la conservación misma de los árboles (Rioseco, 2010).

La explotación de estas especies, ha puesto en alerta a los miembros de la Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES), que situó en la categoría I: la de más alta protección, a una gran cantidad de orquídeas, aunque la familia *Orchidaceae* está en la lista de riesgo desde 1975 (Portilla, 2007). Además, en el Libro Rojo de las Especies Endémicas del Ecuador, se cita a la provincia de Morona Santiago con más del 65% de orquídeas endémicas "vulnerables" (VU), bajo la clasificación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), esto significa que la población está disminuyendo en estado silvestre y el riesgo de extinción es alto. Asimismo, más del 85% de orquídeas endémicas de Morona Santiago no están confirmadas dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), es decir, gran parte de las mismas, está siendo alteradas, haciendo necesario enfocar mayores esfuerzos de conservación (León-Yánez y otros, 2011).

Una alternativa a este problema, es la conservación de germoplasma en forma de semillas dentro de bancos de germoplasma, herramienta útil en la conservación de recursos genéticos a mediano y largo plazo, lo que permitirá en un futuro revegetar sitios degradados ecológicamente. Esto requiere experimentación biotecnológica con protocolos de la ciencia moderna (INTA, 2012).

El presente trabajo aporta con información sobre botánica, morfología, germinación *in vitro,* viabilidad de orquídeas y bancos de germoplasma. En el aspecto práctico, se contribuirá con semillas de orquídeas de Morona Santiago al Banco de germoplasma de la Universidad Politécnica Salesiana para conservar su diversidad biológica.

1.2 OBJETIVOS

General:

- Coleccionar germoplasma de orquídeas del cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago, para su conservación en un banco de germoplasma.

Específicos:

1. Recolectar, identificar y conservar en invernadero orquídeas de las zonas de Copal, Tres Ranchos y La Delicia del Cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago.

2. Almacenar las semillas en el banco de germoplasma de la Universidad Politécnica Salesiana, y determinar su viabilidad.

3. Determinar un medio óptimo de germinación *in vitro* para las semillas de las orquídeas en investigación.

1.3 Hipótesis

Hipótesis Central (H_{i1}): es factible recolectar, identificar y conservar las orquídeas procedentes de las zonas de estudio en un invernadero, aplicando la técnica de conservación *ex situ.*

Hipótesis Alternativa (H_{A2}): es factible recolectar, identificar y mantener las colecciones de orquídea en cada zona de estudio, con la técnica de conservación *in situ.*

Hipótesis Nula (H_{O3}): no es factible recolectar, identificar y conservar las orquídeas procedentes de las zonas de estudio en un invernadero, aplicando la técnica de conservación *ex situ.*

***Hipótesis Central (H_{i2})*:** el protocolo de almacenamiento de semillas en *vacuntainers* a 4°C en oscuridad, es un método óptimo de conservación de germoplasma de las orquídeas en estudio.

Hipótesis Alternativa (H_{A2}): el protocolo de almacenamiento de semillas en *vacuntainers* a temperatura ambiente 20 ± 2 ºC más luz, es un óptimo método de conservación del germoplasma.

Hipótesis Nula (H_{O2}): el protocolo de almacenamiento de semillas en *vacuntainers*, no es un método óptimo de conservación de germoplasma de orquídeas en estudio.

***Hipótesis Central (H_{i3})*:** se puede determinar un medio óptimo de germinación *in vitro* para las semillas de orquídeas en investigación, con un porcentaje de germinación mayor al 60%.

Hipótesis Alternativa (H_{A3}): se puede determinar un medio óptimo de germinación *in vitro* para las semillas de orquídeas en investigación, con un porcentaje de germinación entre el 33% - 60%.

Hipótesis Nula (H_{O3}): no se puede determinar un medio óptimo de germinación *in vitro* para las semillas de orquídeas en investigación, con un porcentaje de germinación mayor al 33%.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de la Familia Orchidaceae: la familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas del planeta. Existen aproximadamente 25 000 a 35 000 *spp*., agrupadas en 700 a 800 géneros (Arditti y otros, 1979). Latinoamérica es hogar de más de 20 000 spp., sin embargo cada año se descubren y describen nuevas orquídeas, siendo difícil tener una idea exacta de su dimensión actual (Lara y otros, 2009). Las orquídeas, tanto las tropicales como las de zonas templadas tienen un ancestro común; es decir, son monofiléticas, lo que determina que en términos botánicos se considere su pertenencia a una única familia, esta es Orchidaceae (Sahuquillo, 2008). Esta es una de las familias más evolucionadas entre las monocotiledóneas, en su mayoría presentan flores atractivas y en algunos casos aunque no presenten flores cautivadoras, tienen importancia desde el punto de vista ecológico, son flores exóticas (Mayo y otros, 2010).

2.2 Distribución de las Orquídeas: están distribuidas en los 72º norte hasta 52º sur, entre el 80 y el 90% se concentra cerca del Ecuador, en la zona tropical o subtropical. La mayoría se localiza entre el sureste de Asia hasta Indonesia y Australia, en segundo lugar, está la zona comprendida entre África y Madagascar y una tercera zona que va desde México hasta Brasil. Por sus diversos procesos adaptivos, las orquídeas han colonizado casi cualquier región del planeta (Kuan y González, 1993).

2.3 División Taxonómica: la clasificación botánica más utilizada es la escala jerárquica de Cronquist. Esta escala describe que las orquídeas pertenecen al Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Liliopsida*, Orden *Orchidales* y Familia *Orchidaceae*. Por su amplia distribución, ha sido necesario dividirla en subfamilias; a continuación, se citan aquellas presentes en Ecuador: *Cyprepidioideae, Spiranthoideae, Orchidoideae, Epidendroideae* y *Vandoideae* (Lara y otros, 2009).

2.4 Ecología: las Orquídeas presentan varios hábitos de crecimiento debido a su gran variabilidad morfológica. Crecen sobre los árboles (epífitas), sobre las rocas (litófitas), en humus (humícolas) o en el suelo (terrestres) (Dressler, 1994), existiendo inclusive una especie que habita en el subsuelo (subterránea) (*Rhizanthella gardneri*), que crece en Australia (Cavero y otros, 2009).

El epifitismo, es un fenómeno básicamente tropical, el 90% de las especies de América son epífitas y sólo el 10% restantes son terrestres. Además una característica importante que deben presentar las epífitas, es la capacidad de resistir condiciones de desecación, por esta razón también presentan adaptaciones como las hemiepífitas, que germinan y comienzan su desarrollo en la rama de un árbol pero después llegan sus raíces al suelo para su posterior desarrollo. La mayor parte de las orquídeas son verdes por tener clorofila y capaces por esa misma razón de producir sus propios alimentos (autótrofas). Sin embargo, algunas son incapaces del autotrofismo, dependen de una relación simbiótica con ciertos tipos de hongos (la mayoría del género *Rhizoctonia*) para absorber nutrientes de la descomposición de materia orgánica, denominadas así como saprófitas (Walter, 1979).

Equívocamente, se piensa que las orquídeas son parásitas por el hecho de crecer sobre otras plantas, pero en realidad lo único que buscan es alcanzar el máximo de luz posible ubicándose en las partes altas de los árboles; además, estas se alimentan del humus producido por la descomposición de las hojas de los árboles y de los nutrientes que pueden captar del agua de lluvia, nunca de su hospedero (Cavero y otros, 2009).

Algunas especies de orquídeas son abundantes y están ampliamente distribuidas en bosques, mientras que existen otras especies que se desarrollan en lugares pequeños y restringidos que les proporcionan humedad, nutrientes y sombra. Otro grupo aparecen distribuidas en áreas como taludes y carreteras. Otras toleran el área intervenida por el hombre (Valencia y Buitrago, 2003).

2.5 Las Orquídeas en el Ecuador: el Ecuador, a pesar de que abarca menos del 0,2% de la superficie del planeta, es considerado uno de los países con mayor diversidad de plantas en el mundo, éste alberga mayor cantidad de especies por km^2 que el resto de países (Vázquez y Saltos, 2009). Dentro de esta diversidad, se destaca la familia *Orchidaceae,* como una de las más numerosas, se han catalogado 228 géneros. La razón principal para que Ecuador sea tan diverso, es su ubicación geográfica en la zona ecuatorial y la presencia de la cordillera de los Andes que corre longitudinalmente de norte a sur. Por este singular fenómeno orográfico, Ecuador tiene una topografía irregular, infinidad de microclimas y consecuentemente diversidad de hábitats y tipos de vegetación, aspecto que marca la distribución de las orquídeas (Lara y otros, 2009).

Las estrategias para la conservación de orquídeas en un país megadiverso como el Ecuador, son un reto; sin embargo, este cuenta con varias herramientas importantes, por ejemplo ha sido un país botánicamente bien explorado, cuenta con una lista preliminar de especies en peligro, tiene varios herbarios activos y bien mantenidos (Endara, 2008). En adición, la FAO (2009) corrobora que la mayoría de especies endémicas del Ecuador están amenazadas en algún grado y se puede observar que en general la situación no ha mejorado, esto no sorprende si se considera que la destrucción del hábitat es la principal amenaza para la supervivencia de la plantas endémicas y la deforestación en el Ecuador continua y es la más alta en Sudamérica.

2.6 Endemismo de Orquídeas en Ecuador: las listas rojas de especies endémicas de flora han sido herramientas útiles en las que se evalúan principalmente el estado de conservación. En Ecuador, gracias a esta iniciativa se ha centralizado la información de las plantas endémicas y se ha asignado categorías de amenaza a cada una de ellas. El presente proyecto de investigación utiliza la información de la Lista Roja de Especies Endémicas del Ecuador del 2011, con el objetivo de guiar los esfuerzos de conservación. La importancia de este estudio es que las orquídeas aportan con el 20% (4023 *spp*.), a la riqueza florística del Ecuador y significativamente al fitoendemismo en el país, con aproximadamente el 42% (1707 *spp*.) (León-Yánez y otros, 2011).

Las áreas de endemismo adquieren un valor ecológico acrecentado, por ser reservorios de especies únicas, es decir combinaciones genéticas vivas únicas resultantes de un proceso evolutivo en aislamiento. En la Tabla 1, se muestra el progresivo número de especies de orquídeas encontradas en el Ecuador y el fluctuante porcentaje de orquídeas endémicas en investigación.

Tabla 1. Evaluación estadística de las orquídeas del Ecuador, en tres años

	AÑO		
	2000	**2008**	**2011**
No. de especies de orquídeas	3290 *spp.*	4016 *spp.*	4023 *spp.*
No. de especies de orquídeas endémicas	1318 *spp.*	1714 *spp.*	1707 *spp.*
Porcentaje de orquídeas endémicas	40%	43%	42%

Fuente: Endara y otros, 2011.

2.6.1 Distribución de Orquídeas Endémicas en el Ecuador: en el Ecuador, existen orquídeas endémicas en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 y 4500 msnm, los análisis lo indican así; tanto en la Amazonía como en la Costa ecuatoriana, la diversidad de orquídeas endémicas está concentrada en los bosques montano bajo y aumenta abruptamente en los bosques siempreverde piemontanos comprendidos entre los 300 y 1300 msnm (León-Yánez y otros 2011). Del total de orquídeas endémicas, aproximadamente 1455 *spp*., poseen algún tipo de amenaza. Existe más del 13% de especies de orquídeas que se encuentran fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Endara, 2008). A pesar de existir Jardínes Botánicos de colecciones de orquídeas *ex situ* y plantas exóticas representantes de la diversidad ecuatoriana, es significativo mencionar que el mantenimiento de los materiales en campo implica un costo adicional para los bancos de germoplasma que a pesar de que estén dentro de los programas de Fitogenéticos de interés para la Agricultura y la Alimentación (RFAA) no existe un presupuesto especialmente asignado para el mantenimiento de colecciones *ex situ*. Esta situación naturalmente no favorece la planificación eficiente de las actividades y pone en peligro la conservación durable y sostenible de nuestro patrimonio filogenético, así como también limita fuertemente su aprovechamiento (INIAP, 2008).

2.6.2 Endemismo de Orquídeas en Morona Santiago: el endemismo más representativo de orquídeas en el Ecuador se encuentra distribuido en este orden: Morona Santiago (15%), Zamora Chinchipe (13%), Pichincha (10%), Napo (9%), Loja (7%) y el 46% restante se reparte en otras provincias (León-Yánez y otros, 2011). Evidentemente la provincia de Morona Santiago con 439 *spp.*, contiene el porcentaje más alto de endemismo del país, tal cita, el Libro Rojo de las Especies Endémicas del Ecuador 2011 (Endara y otros, 2011).

2.6.3 Categorías de Amenaza de la UICN: la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), reúne el conocimiento más reciente sobre la biodiversidad y su contribución al bienestar humano (UICN, 2012).

Una subdivisión de este organismo es la Comisión Mundial de Áreas Protegidas (WCPA, por sus siglas en inglés), la red más importante del mundo con experiencia en áreas protegidas, que utiliza una nomenclatura específica para cada grupo de especies clasificadas bajo el nombre de "Categorías de Amenaza de la UICN", tal como se muestra a continuación:

En peligro (EN): se enfrenta un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre.

Vulnerable (VU): la población está disminuyendo rápidamente en estado silvestre y el riesgo de extinción es alto.

Casi amenazado (NT): las especies están disminuyendo y en un futuro serán especies vulnerables.

Preocupación menor (LC): las especies empiezan a disminuir, pero todavía es común.

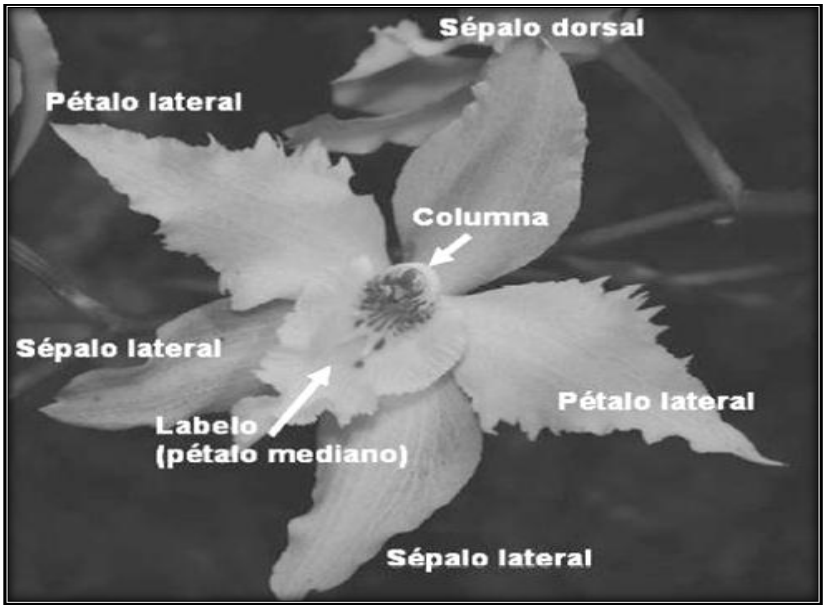
Datos Insuficientes (DD): las especies no poseen datos suficientes.

No Evaluado (NE): las especies están por investigarse (León-Yánez y otros, 2011).

2.7 Estructuras Vegetativas de la Orquídea

2.7.1 Estructura Floral: están formadas por un ovario, sépalos, pétalos, estambre y estigma (estructuras florales) (Gráfico 1); los dos últimos, están fusionados en una estructura denominada columna o ginostemo (Lara y otros, 2009). Como en la mayoría de monocotiledóneas, las flor de orquídea está construida en series de tres partes cada uno: tres sépalos, tres pétalos (uno se modifica para formar el labelo), seis estambres (3 ó 5 de ellos eliminados durante la evolución) y 3 carpelos unidos (Walter, 1979).

Gráfico 1. Ejemplificación de la estructura floral de *Orchidaceae*



Fuente: Singer, 2009.

Las flores son bisexuales o perfectas. Son notables las excepciones en que las flores son unisexuales (ejemplo *Catasetum* y *Cynoche*s) (Kuan y González, 1993). Las flores presentan simetría bilateral, es decir sólo un plano (plano sagital) corta el cuerpo en dos imágenes especulares (derecha e izquierda) (Navarro y Pizarro, 2009). Otro aspecto variable de las orquídeas, es el de las fragancias de sus flores, que son complejas mezclas de sustancias químicas, se pueden producir en diferentes partes de la flor y en algunos casos, una misma flor puede producir diferentes aromas en distintas horas del día o la noche. Aparentemente, esto sucede para atraer un mayor número y espectro de polinizadores (Walter, 1979).

Ovario: es la estructura de la flor que contiene los óvulos, es ínfero, es decir situado debajo de todas las demás estructuras florales. En la mayoría de casos, los ovarios se unen a la vara de floración llamado pedicelo o pedúnculo. El ovario puede contener miles o millones de óvulos, hasta cuatro millones en algunos casos, cada uno dará origen a una semilla una vez que haya ocurrido la polinización (Lara y otros, 2009).

Pétalos: al igual que los sépalos, las orquídeas poseen tres pétalos: dos laterales y uno dorsal, al cual se denomina labio o *labellum*. Los pétalos, son frecuentemente más delgados que los sépalos (en algunos casos iguales o más grandes) (Dressler, 1973).

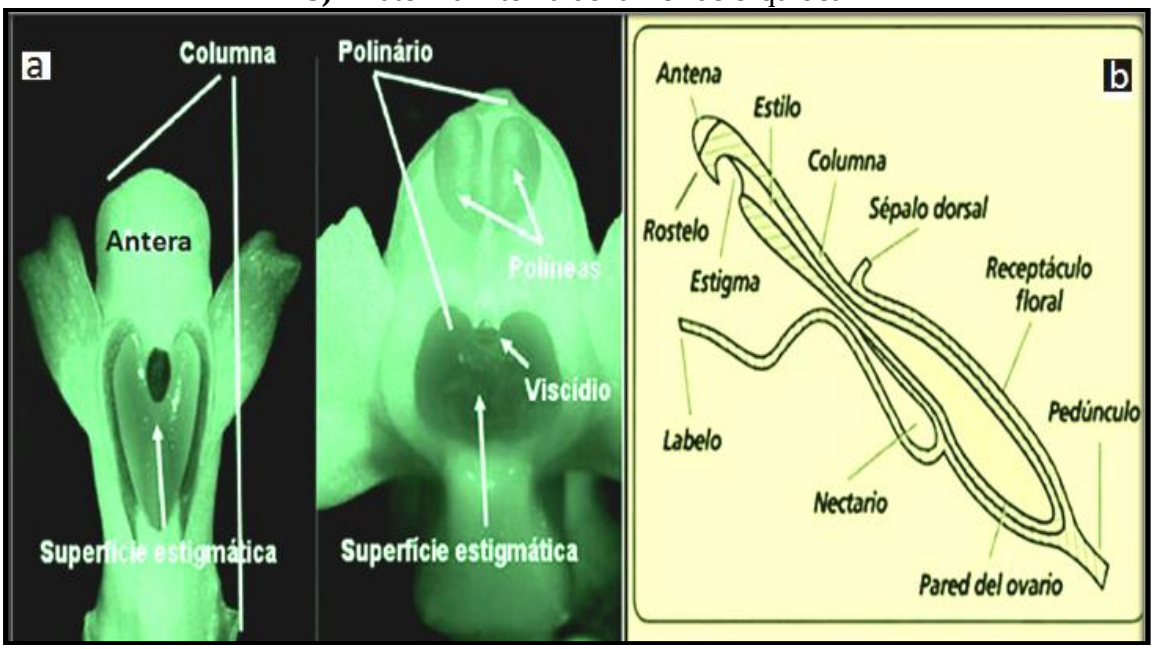
Labelo o *labellum*: es el pétalo que está en sentido opuesto a la columna, es diferente de los otros dos pétalos en tamaño, forma y ocasionalmente en color, y es especializado para la atracción y manipulación de los polinizadores. En el labelo, pueden estar presentes: carnosas protuberancias, surcos, láminas, pubescencias, entre otras; a éstas se las conoce con el nombre de callo (Lara y otros, 2009).

Sépalos: todas las orquídeas poseen tres sépalos: uno dorsal y dos laterales. En algunos casos, los sépalos laterales pueden estar parcial o totalmente unidos; a esto se lo denomina sin-sépalo; en otros casos, los tres se encuentran fusionados formando una especie de embudo. En casi todas las flores, los sépalos tienen una función protectora durante el desarrollo de la flor; además, en algunos casos como el género *Masdevallia*, tienen mucha importancia en la atracción de los polinizadores (Lara y otros, 2009).

Antera: es una estructura parecida a una capucha localizada en el ápice de la columna (Lara y otros, 2009). Las anteras, son las terminaciones de los estambres que contienen polen, es decir, aquí se desarrollan los polinarios, que son masas más o menos compactas de polen que se adhieren al polinizador mediante un viscidio (plataforma pegajosa del estigma) (Portilla, 2007).

Columna: en las orquídeas, existe algún grado de unión entre estambre y estigma; en muchas orquídeas, están completamente unidas (Gráfico 2). Al producto de la combinación de las partes sexuales se llama columna, ginostemo (Portilla, 2007).

Gráfico 2. Estructuras internas de la flor de orquídea. **a)** Columna y polinario de la flor. **b)** Anatomía interna de la flor de orquídea



Fuente: a) Singer, 2009. **b)** Freuler, 2008.

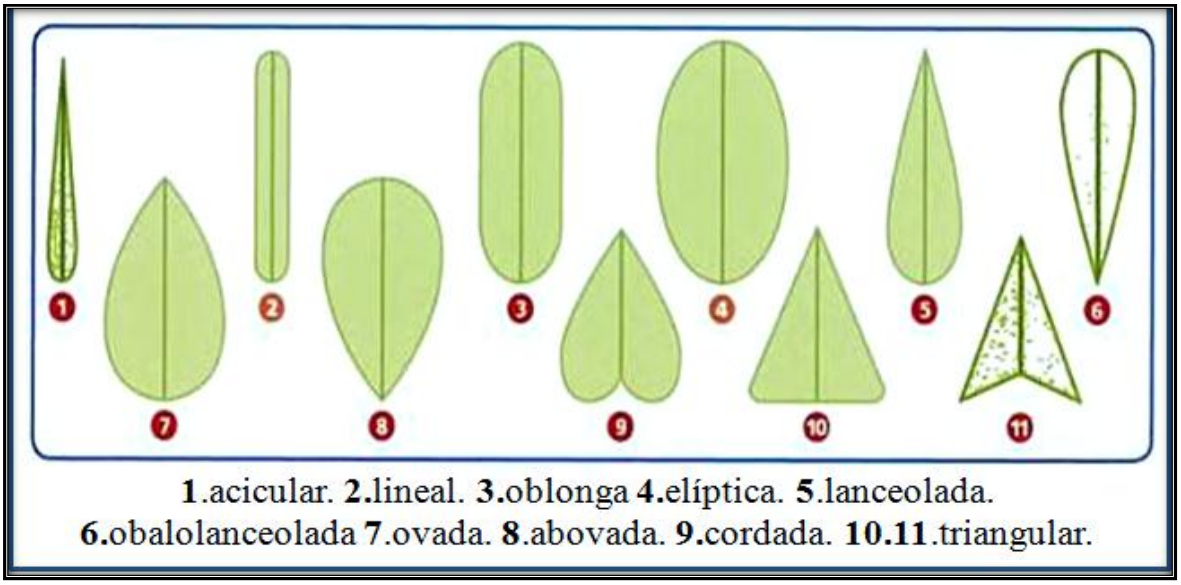
Estigma: es la parte terminal del pistilo, corresponde a la estructura sexual femenina que sirve para el depósito y conducción del polen hacia los óvulos en el ovario. Está compuesto por tres lóbulos y produce una pegajosa y azucarada solución, en la cual son depositados los polinarios; los lóbulos laterales, frecuentemente se cierran después de que la polinización ha ocurrido. La posición y forma del estigma puede ser muy variada, y depende en gran medida de la adaptación al polinizador (Lara y otros, 2009).

Inflorescencias: son el conjunto de flores producido por un brote o tallo. Las flores de orquídeas, son por lo general pediceladas; es decir, tienen una pequeña estructura que une al ovario de la flor con el raquis de la inflorescencia; están distribuidas a lo largo de una vara (raquis) y toman el nombre de racimos (Portilla, 2007).

En algunos casos, las inflorescencias pueden ser ramificadas a las cuales se las denomina panículas, pueden ser uniflorales, es decir que las flores nacen una a la vez o cada flor aparece sobre un tallo separado; pueden estar agrupadas en umbelas o racimos, o pueden emerger de inflorescencias condensadas (Lara y otros, 2009). En las orquídeas de crecimiento simpodial, las inflorescencias pueden ser terminales (cuando las flores nacen en la parte final del tallo), o axilares (cuando emergen en la base de las hojas) y, en el caso de las orquídeas monopodiales las inflorescencias siempre serán axilares (Dressler, 1994).

2.7.2 Hojas: las hojas de orquídeas tienen normalmente venación paralela, característica de las monocotiledóneas (Gráfico 3). Predominan las formas ovaladas y lanceoladas, algunas son articuladas en la base, lo que permite que se desprendan, otras no lo son, simplemente se pudren en su lugar (Portilla, 2007). Las hojas de las orquídeas siempre son simples, sus márgenes son enteros (no tienen espinas, ni son aserrados), y por lo general son angostas y alargadas. En las epífitas, la regla general es la de tener hojas gruesas, con una cutícula de cierto espesor y encerada, que les permite resistir no sólo la depredación por insectos, sino también los fuertes vientos de los trópicos y subtrópicos (Kuan y González, 1993).

Gráfico 3. Tipos de hojas de orquídeas



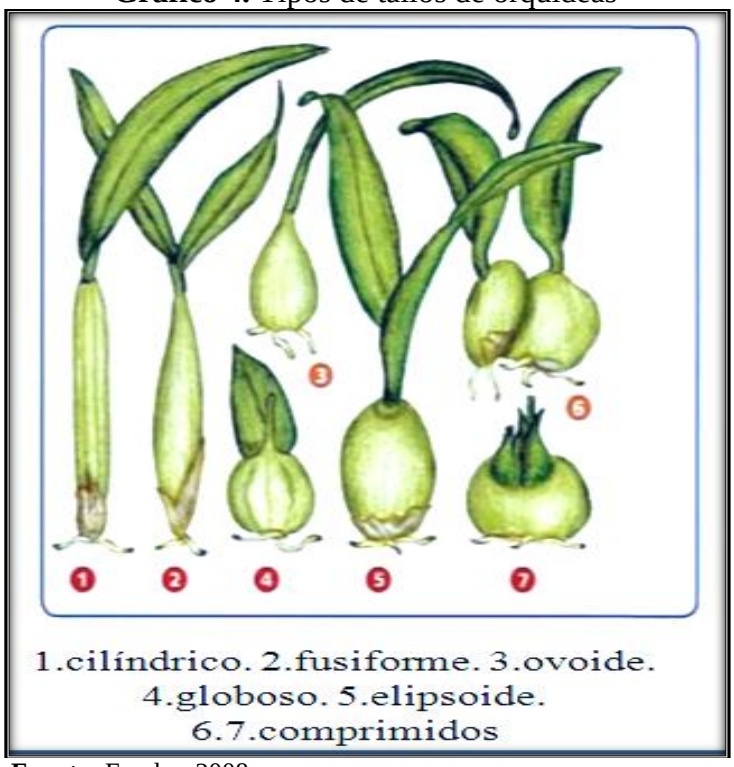
Fuente: Freuler, 2008.

Lara y otros (2009), indican que las hojas en la mayoría de las orquídeas epífitas son persistentes, pero en algunas especies principalmente las de climas secos así como en casi todas las orquídeas terrestres, las hojas son deciduas; es decir, caen en determinada época del año como mecanismo para evitar la deshidratación. En algunos casos, como en los géneros *Dendrobium*, la floración está relacionada con la pérdida de las hojas (Portilla, 2007).

2.7.3 Tallos: las orquídeas presentan muchos tipos de tallos (Gráfico 4), los cuales varían significativamente de un grupo a otro, entre los principales tipos de tallos están:

Rizoma: el término rizoma es usado para cualquier tallo horizontal dentro o fuera del sustrato (Dressler, 1994). En la mayoría de orquídeas simpodiales, el rizoma es un complejo órgano formado de la parte basal de tallos sucesivos y del cual brotan las raíces (Lara y otros, 2009).

Gráfico 4. Tipos de tallos de orquídeas



Fuente: Freuler, 2008.

Cormos: el tallo de las orquídeas también puede servir como órgano de reserva, el término es utilizado para referirse a un tallo subterráneo, el cual sirve de depósito de alimento para el desarrollo del nuevo brote (Lara y otros, 2009).

Pseudobulbo: el término pseudobulbo, corresponde a tallos engrosados, muchas veces globosos que sirven como fuente de almacenamiento de alimento, para la planta. Los tipos de pseudobulbos, por lo general ayudan a relacionar con el típico concepto de orquídea, por la forma que estos tienen, además poseen clorofila (Lara y otros, 2009).

2.7.4 Raíz: el sistema radicular, está formado por raíces secundarias que emergen del tallo, las cuales varían en grosor y sirven como órganos de almacenamiento, en especial en las orquídeas terrestres. Una de las características de la mayoría de raíces de estas especies, es el velamen, una especializada epidermis de una o muchas capas de células que van muriendo paulatinamente a medida que la raíz madura (Portilla, 2007).

2.7.5 Fruto: el fruto o también llamada cápsula, se abre mediante tres o seis ranuras longitudinales (a veces sólo una). El tegumento es crustoso o membranoso, sin fitomelaninas, con sólo la capa externa persistente y los tejidos internos colapsados (Rojas y otros, 2009). Luego de la polinización, los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática y los tubos polínicos se extienden hasta el ovario formándose un tipo de fruto seco dehiscente (es decir, que se abre al madurar para liberar las semillas). La cápsula está compuesta de al menos dos carpelos (hojas modificadas) y puede contener miles y hasta millones de semillas de tamaño muy reducido (Gráfico 5), si la fertilización ocurre, en la cápsula o el fruto se desarrollan las semillas y por ende los embriones (Kuan y González, 1993). El grado de maduración apropiado para la selección de cápsulas es 4/5 partes del tiempo de su maduración, este tiempo varía según la especie; sin embargo, de forma general se observa un cambio de color de la cápsula de verde a amarillo o café, y el tegumento es suave y elástico (Ossenbach y otros, 2006 a).

Gráfico 5. Fruto de orquídea

Fuente: Singer, 2009.

2.7.6 Semillas: las semillas de orquídeas son muy pequeñas, su medida oscila entre 1 a 2 milímetros de largo y de 0,5 a 1 milímetro de ancho. Se producen en cantidades elevadas por cápsula: de 1 300 a 4 000 000 de semillas; estas constan de una testa gruesa, que encierra un embrión de alrededor de 200 células. La mayor parte de las semillas de orquídeas están escasamente diferenciadas, en el extremo distal del embrión, existe un punto de crecimiento potencial, no identificable en el estado de semilla (Walter, 1979).

Las semillas son muchas veces membranosas y aladas, lo que les permite ser dispersadas por el viento (Gráfico 6). El embrión es muy pequeño y no se halla acompañado por endospermo, ya que este tejido aborta muy temprano en el desarrollo embrionario (Rojas y otros, 2009). Las semillas tienen un peso entre 0,3 a 14 microgramos, según la especie; hacen que a simple vista en conjunto, tengan aspecto de arenilla muy fina, de ahí el nombre de “semillas polvo” (Mendoza, 2010).

La identificación y caracterización de semillas puede presentar dificultad en función del tamaño y las diferencias morfológicas. El análisis físico-botánico, a pesar de ser casi exclusivamente visual, contiene algunos elementos que mejoran la interpretación, pero la observación tiene un valor restringido como herramienta única (Arriagada, 2000).

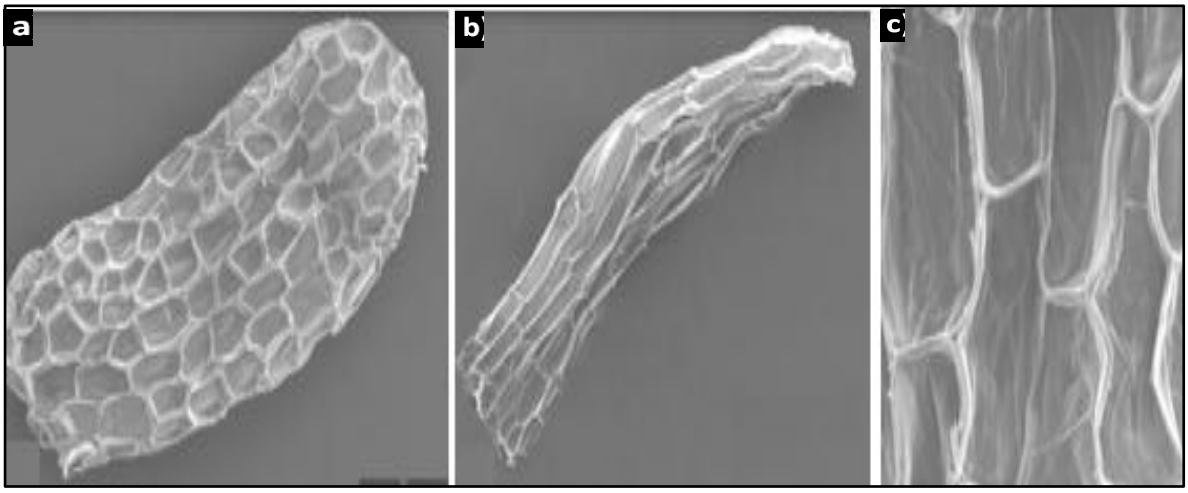
Gráfico 6. Semillas de orquídeas de varias especies

Fuente: Arditti y Ernets, 1993.

Testa: la testa (parte externa del embrión) está compuesta hasta por un 96% de aire, de tal forma que cada semilla puede considerarse como un auténtico globo (Sahoo y otros, 2000).

La testa está formada por células muertas en forma de red con sus correspondientes polos micropilar y calazal, cuya morfología puede ser más o menos homogénea en el conjunto de la semilla no puede mostrar notables diferencias entre las células apicales, medias o basales. La visión de la testa al microscopio electrónico (Gráfico 7), permite distinguir las paredes anticlinales que separan unas células de otras, y las periclinales en las que se aprecia el desarrollo de las estructuras primaria y secundaria (Arriagada, 2000).

Gráfico 7. Testa de orquídeas visualizadas en microscopio electrónico. **a)** Testa parte central de semilla, **b)** Polo calazal **c)** Células periclinales de la estructura de la pared de la testa



Fuente: Freuler, 2008.

Embrión: dependiendo de los géneros, está constituido por 8 a 200 células. Requiere de fuentes de nutrición externas hasta desarrollarse lo suficiente como para sobrevivir de una forma autótrofa. En condiciones naturales, estas fuentes de alimento las obtienen de la asociación con hongos micorrizógenos (Kuan y González, 1993). El embrión (Gráfico 8), tiene aspecto ovoide, y en general, se sitúa en el centro o hacia el polo calazal de la semilla (Arditti y otros, 1979).

Gráfico 8. Embriones de *Sobralia rosea*

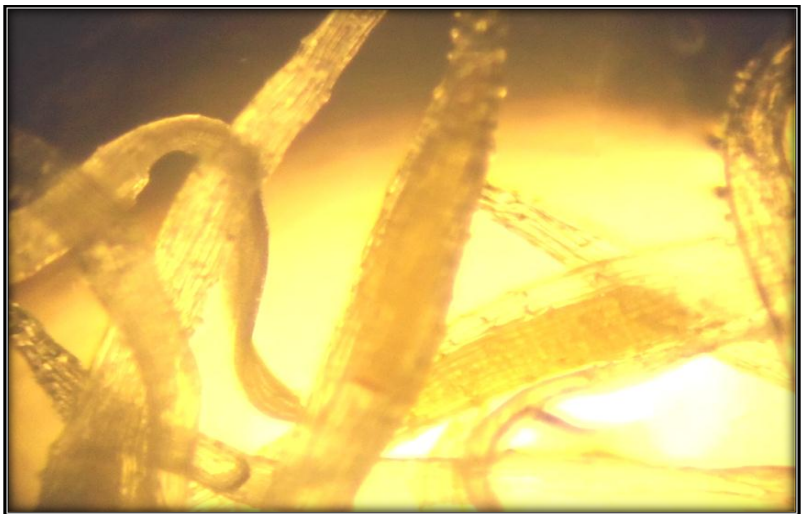


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

2.8 Reproducción de las Orquídeas

2.8.1 Reproducción Sexual

Polinización: es uno de los aspectos más interesantes de las orquídeas, debido a los mecanismos que éstas han desarrollado para atraer y manipular a sus polinizadores (Lara y otros, 2009).

Charles Darwin (1862) se dio cuenta de este fenómeno y no podía dar crédito a lo que vio: resultaba para él increíble que los insectos no reaccionaran negativamente a este engaño, dejando pronto de lado las flores de las cuales no había nada que esperar. Sin embargo, fruto de sus dedicados experimentos, llegó a la siguiente conclusión: las especies que efectivamente poseen néctar, tienen a la vez, los polinarios más pegajosos, es decir, no requieren que los polinizadores estén un tiempo prolongado en la flor. En estos casos, los insectos deben entretenerse por más tiempo en la flor, y muchos de ellos se demoran haciendo perforaciones en los nectarios, para poder obtener el néctar desde los espacios intercelulares. La atracción que ejercen las orquídeas sobre los insectos, favorece la polinización cruzada, promoviéndole la diversidad genética al interior de las poblaciones (Moreira-Muñoz, 2010). En el proceso de polinización, hay dos etapas básicas: primero, antes de visitar la flor, el polinizador necesita ser advertido y para esto la flor utiliza formas, colores o fragancias atrayentes; segundo, muchas orquídeas "premian" a sus polinizadores con néctar, cera o perfumes, otras no dan ninguna recompensa a su polinizador; es por esto, que han desarrollado mecanismos seductores para obligar al polinizador a visitar el mismo tipo de flor (Lara y otros, 2009). Luego de la polinización, los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática y los tubos polínicos se extienden hasta el ovario (Kuan y González, 1993).

Algunas flores son autocompatibles, el polen producido por las anteras puede generar en el estigma de la misma flor; ocurriendo, así la autopolinización (autogamia), lo que conlleva a la reducción de la variabilidad genética, mientras que la polinización cruzada (alogamia) aumenta la variabilidad genética (Ossenbach y otros, 2006 a).

2.8.2 Reproducción Asexual

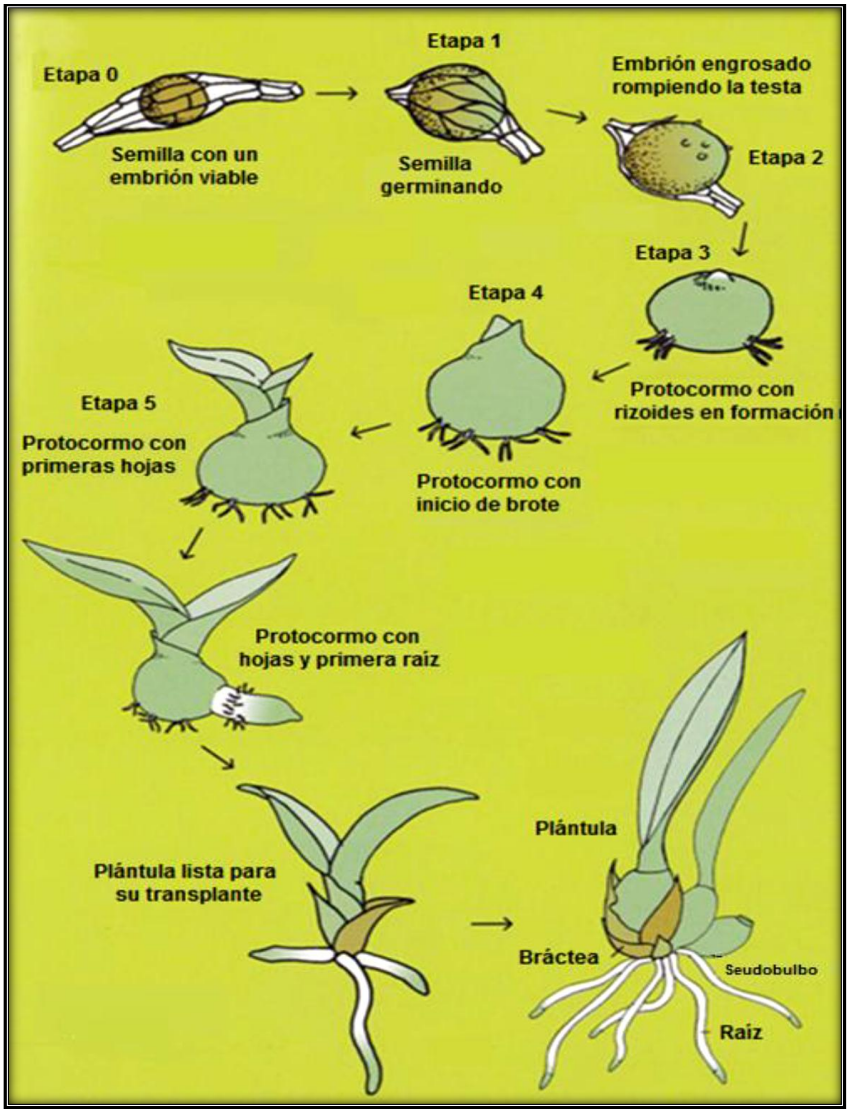
La reproducción vegetativa: es la reproducción mediante el empleo de plantas madres y la división de estas para obtener hijos. Es relativamente fácil, lo que constituye una ventaja; no obstante, en ocasiones pueden quedar pequeños fragmentos, corrientemente llamados "colas", los cuales si son atados fijamente a pequeños trozos de árboles (tronquitos) y colgados donde reciban suficiente aire y humedad, podrán producir nuevos brotes. Aunque en estos casos, se tardará a veces varios años en lograr una planta que produzca flores (Montero, 2011).

Reproducción generativa: la reproducción generativa de las orquídeas requiere una cooperación activa de ciertos tipos de hongos de las semillas para germinar. Pero estos hongos no pueden ser cultivados con éxito. Por tal razón, en las últimas décadas, la ciencia ha logrado sustituirlos por lo que hoy se conoce como "siembra *in vitro*" (Montero, 2011).

Proceso de Germinación Natural: las semillas de orquídeas carecen de endospermo, tejido nutritivo que sirve en el caso de otras especies para el desarrollo de embrión y la semilla, por lo tanto, en el caso de las orquídeas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorriza formando una relación simbiótica, en el cual, el hongo abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento (McKendrick, 2000).

Cuando la semilla germina, produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales de laboratorio, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas (Gráfico 9), meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas (McKendrick, 2000).

Gráfico 9. Etapas de germinación de las semillas de orquídeas epífitas



Fuente: Seaton, 2000.

Las orquídeas pasan por un estado de semillero prolongado durante el cual son incapaces de fotosintetizar, además que éstas tienen escasas reservas de almidones y lípidos. En condiciones naturales, estos requerimientos son suplidos por el hongo micorrizógeno. La planta es colonizada en la germinación, y el hongo suple el carbono y las vitaminas para el desarrollo del embrión hasta cuando se forman las hojas y se inicia la fotosíntesis, es decir se espera que alimente al protocormo sólo hasta que éste produzca hojas y se vuelva autotrófico (Seaton, 2000).

Los hongos que participan en la simbiosis son basidiomicetos, algunos patógenos como *Armillaria*, *Fomes*, *Marasmius* y *Rhizoctonia* (*R. solani* y *R. repens*), por lo tanto en condiciones naturales el hongo digiere la materia orgánica y transfieren los carbohidratos al embrión de la orquídea (Seaton, 2000).

El tiempo que transcurre entre la germinación de la semilla y la maduración de la planta es de varios años, pero en algunas especies el ciclo de vida puede transcurrir rápidamente (Hodgson y otros, 1991). Según Mitchell (1989), en el proceso de germinación de las orquídeas epífitas (tropicales) existen cinco etapas bien definidas las cuales se describen a continuación:

Etapa 0.- Las semillas se encuentran sin germinar.

Etapa 1: la semilla comienza a hincharse debido a la absorción de agua produciendo el crecimiento del embrión.

Etapa 2: engrosamiento del embrión (protocormo) y ruptura de testa.

Etapa 3: promueve el desarrollo del protocormo y aparición de rizoides.

Etapa 4: se produce crecimiento rápido del protocormo y desarrollo de yema apical.

Etapa 5: aparición de hojas y el desarrollo de raíces que permiten el establecimiento de las plántulas, esto seguido por un cambio en el color de la semilla ya que al comienzo puede parecer pálido su color pero finalmente se torna de un color verde porque es el comienzo de producción de clorofila, por ende el inicio de la fotosíntesis (Seaton, 2000).

Requisitos para que ocurra la germinación: asumiendo que no existen mecanismos de latencia que impidan germinación, se requiere de la concurrencia de varios factores para que el embrión contenido en la semilla reinicie su desarrollo, a continuación, se menciona dichos factores:

La embibición (absorción de agua): es un caso especial de un fenómeno físico denominado difusión, y como tal, se da sí existe una gradiente de difusión. Se caracteriza por un aumento de volumen del cuerpo que embibe y está íntimamente relacionada con las propiedades de materiales coloidales. Las partículas coloidales en la semilla forman una red miscelar, medianamente rígida, en la que las cargas eléctricas de signos opuestos están orientadas en una manera definida. Cuando el agua penetra en la semilla, una fracción ocupa los espacios libres y otra se une químicamente a las sustancias de que están compuestas las semillas. El volumen de las semillas aumenta con la embibición, pero el volumen final del sistema (semilla + agua) es menor que la suma de los volúmenes individuales iniciales de semillas y agua; esta contracción del sistema es prueba de la ocupación de los espacios libres dentro de la semilla y de la absorción de agua en la matriz coloidal. La tasa de embibición se ve afectada por varios factores que pueden determinar la respuesta a germinación de las semillas. La permeabilidad de la cubierta seminal es el caso más evidente en las semillas cuyas cubiertas son totalmente impermeables. Sin embargo, también se dan ejemplos en que la penetración de agua no es impedida. La concentración del agua en general, la embibición es más rápida cuando la semilla está en contacto con agua pura que cuando el agua contiene solutos, el principio que opera es el de presión de difusión del agua. De aquí que las semillas absorben agua más lentamente en suelos secos o salinos, no solo porque hay menos agua, sino que también es causa de una menor presión de difusión del agua. En el caso de la temperatura ocurre en forma de energía. Cuando se calienta el agua que está en contacto con la semilla, parte de la energía suministrada se invierte en aumentar la difusión de agua, por lo tanto, aumenta la tasa de absorción de agua, dentro de ciertos límites. Se ha encontrado experimentalmente que un aumento de 10°C en la temperatura duplica la tasa de absorción al inicio del proceso de embibición. En cuanto a la presión hidrostática, conforme el agua penetra en las semillas, ésta provoca un aumento de volumen y presión en las membranas celulares. Igualmente, las membranas celulares oponen resistencia de igual magnitud, la que resulta en un aumento de la presión de difusión del agua interna, aumentando su difusión hacia afuera y por lo tanto disminuyendo la tasa de absorción de la semilla (Besnier, 1990).

Área de la semilla en contacto con agua: considerando otros factores constantes, la tasa de absorción de agua es proporcional a la magnitud del área de las semillas en contacto con el agua. En algunas clases de semilla, ciertas regiones son más permeables que otras (Besnier, 1990).

Latencia de las semillas: en cuanto a la latencia de las semillas, hasta el momento se han descrito las condiciones ambientales necesarias para que ocurra la germinación de las semillas. A menudo sucede que algunas semillas rodeadas de lo que podría llamarse un ambiente óptimo para germinación, temperatura y agua, favorables, buena disponibilidad de oxígeno, no logran germinar. Este fenómeno se denomina latencia. Debe distinguirse este término del que se utiliza para describir semillas que no germinan por carencia de condiciones ambientales adecuadas; estas semillas se denominan quiescentes. Los tipos de latencia: a) en la inmadurez del embrión, este tipo de latencia comprende casos que van desde semillas con embriones totalmente indiferenciados hasta otras con embriones diferenciados pero que continúan su desarrollo después de que la semilla se desprende de la planta madre y b) en la impermeabilidad de la cubierta seminal al agua, se las denomina "semillas duras". La testa actúa como barrera al agua; la simple ruptura de cubierta permite la penetración del agua y la germinación ocurre sin contratiempos (Besnier, 1990).

Siembra *in vitro*: se realiza en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido (semilla, raíz, yemas), es posible regenerar en poco tiempo plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas o químicas controladas en un medio de cultivo. Esta técnica posee las siguientes ventajas: a) permite obtener plantas libres de enfermedades (hongos, bacterias, micoplasmas, virus), b) propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria, c) optimizar el uso de factores ambientales y nutricionales, d) facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña, y e) puede conservar material biológico por periodo de tiempo prolongados (INIA, 2009).

Originalmente, la siembra o cultivo *in vitro* se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación de plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas. La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se producen pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva, siendo este procedimiento una herramienta fundamental para la conservación de especies. Se conoce como "*in vitro*" por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también en otros materiales). Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales, se remontan a 1902, pero recién en 1922 se logra el primer experimento exitoso: precisamente la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas (Segretín, 2007).

Inducción de germinación *in vitro* de semillas: al disponer de semillas (independientemente del origen) se deben cultivar a una temperatura de 27 °C ± 2, con iluminación difusa, y se debe eliminar aquellos cultivos contaminados o que presenten problemas de fenolización (Mayo y otros, 2010). Por otro lado la germinación asimbiótica es usualmente usada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes provenientes de zonas templadas. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea, puesto que ya no existe la intermediación del hongo micorriza (Mckendrick, 2000).

Knudson en 1922, demostró que era posible la germinación sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares, sin la presencia de hongos. La investigación desarrollada por Knudson, supuso una conmoción en el mundo de las orquídeas, al demostrar que las semillas de *Cattleya, Epidendrum* y otras, eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro*. A pesar del descubrimiento de Knudson, se comprobó que no siempre es posible hacer un medio en el que una determinada especie de orquídea pueda germinar y desarrollar. Se han descrito medios nutritivos, para muchos géneros y especies diferentes (Arditti y Ernest, 1993).

La conservación *in vitro* implica el mantenimiento de explantes en un ambiente estéril y libre de agentes patógenos. Para el almacenamiento a corto plazo y a mediano plazo, el objetivo es prolongar los intervalos entre los subcultivos por medio de un crecimiento reducido. Esta reducción se logra modificando las condiciones ambientales, entre ellas el medio de cultivo para obtener la denominada conservación de crecimiento lento (Rao y otros, 2007). El crecimiento y emisión de raíces se da una vez que se ha presentado la germinación, se sugiere realizar una transferencia de las plántulas a un medio de cultivo renovado. En caso de no presentar problemas, puede ser en el mismo medio que el primero; o bien, realizar un cambio a medio Knudson C. En esta etapa algunos autores recomiendan la utilización de sustancias indefinidas como pulpa de banano (Lo y otros, 2004) o agua de coco (Arias y otros, 2006), entre otras. Dependiendo del desarrollo del cultivo, se deben utilizar contenedores de cultivo de acuerdo al tamaño de las plántulas, para permitir un adecuado desarrollo. De igual forma debe considerarse la utilización de una mayor intensidad lumínica, para permitir que se adapten con mayor facilidad a condiciones naturales (Mayo y otros, 2010).

2.9 Cultivo in vitro de Orquídeas

2.9.1 Siembra Directa: el cultivo a partir de cápsulas verdes o también llamada siembra directa, consiste en abrir el interior de las cápsulas de orquídeas que se mantiene estéril si las cápsulas están intactas. Entonces al esterilizar la parte exterior de las mismas, donde hongos y bacterias pueden desarrollarse, se abre las cápsulas bajo condiciones de esterilización, las semillas podrán mantenerse desinfectadas. La ventaja de este método, es que no se requiere de la esterilización directa de las semillas, lo que podría provocar su deterioro. Además, algunas semillas tomadas de cápsulas casi maduras pueden germinar más rápido que las provenientes de cápsulas maduras a causa de los mecanismos de dormancia. La desventaja de este método, es que al abrir la cápsula todas las semillas en ella deben ser utilizadas o eliminadas (algunas semillas maduras podrían secarse y ser almacenadas) y bien podrían germinar lentamente o simplemente no germinar (McKendrick, 2000).

Lucke (1971) afirmó que en principio, las semillas de orquídea se pueden sembrar cuando se encuentra en el estadío intermedio entre la fertilización y la maduración de la cápsula. El mismo autor recomienda que las semillas no se siembren *in vitro*, antes de que la cápsula haya llegado a los dos tercios de su madurez.

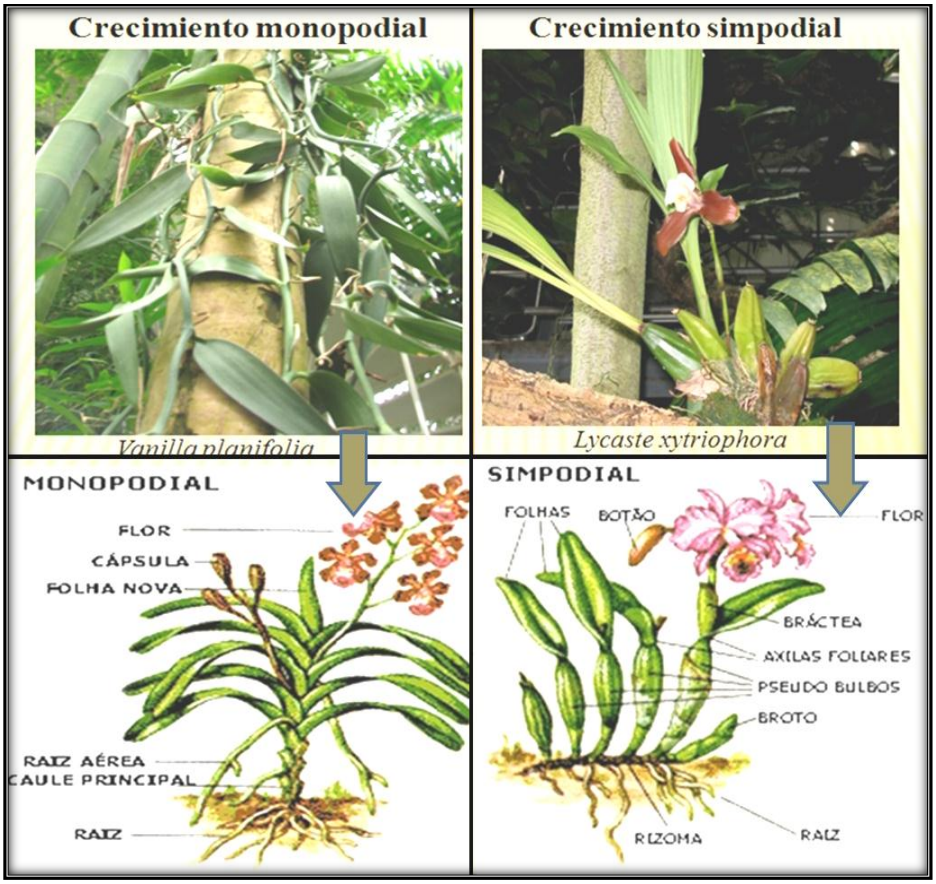
2.9.2 Siembra Indirecta: una vez que la cápsula está abierta, las semillas dejan de ser estériles y requieren de un proceso de esterilización. Comúnmente, se utiliza una solución de hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio o peróxido de hidrógeno. Las semillas se agitan dentro de la solución que además contiene una gota de detergente para "humedecerlas", luego se las enjuaga con agua destilada y se las siembra en el medio preparado. La propiedad de este método es que las semillas pueden ser colectadas, secadas al aire, almacenadas por varios meses en el refrigerador y utilizadas cuando sea necesario. Se debe considerar que lo que se siembra está determinado por la disposición de cualquiera de las dos formas de encontrar las semillas de acuerdo a la época en que se colectan (McKendrick, 2000).

Por otro lado, es importante considerar que existen dos tipos básicos de germinación *in vitro*: simbiótica y no simbiótica; el medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, repasando que ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo (McKendrick, 2000).

En el cultivo de explantes por primera vez y en ocasiones también ocurre en los subcultivos sucesivos, pueden aparecer pardeamientos, como consecuencia de la producción de polifenoles, taninos o peroxidación de lípidos durante la escisión del explanto o el proceso de esterilización aplicado. Estas reacciones pueden provocar una reducción de la viabilidad de los explantes o incluso la muerte de las células. El pardeamiento se puede prevenir añadiendo al medio de cultivo soluciones antioxidantes, carbón activo, etc. Una alternativa sencilla y asequible se basa en mantener los explantes creciendo en condiciones de baja intensidad luminosa u oscuridad durante tres a siete días tras el inicio del cultivo (Bachetta y otros, 2008).

2.10 Tipos de Crecimiento de las Orquídeas: las orquídeas tienen dos tipos básicos de crecimiento: simpodial, el de las orquídeas que poseen tallos o pseudobulbos de crecimiento definido; una vez que han florecido no pueden seguir creciendo; los tallos dan origen a nuevos brotes a partir de una yema localizada en la base del tallo, por ejemplo: *Cattleya, Cymbidium, Dendrobium, Miltonia, Oncidium, Lycaste*, entre otros. Por otra parte, el crecimiento monopodial, donde el brote o tallo tiene la posibilidad de crecer apicalmente, es decir, en dirección longitudinal de forma indefinida, esto se debe a que nuevas hojas se desarrollan continuamente a partir de un punto de crecimiento en la parte superior de la planta (Gráfico 10). Ejemplo de este crecimiento son los géneros: *Epidendrum Phalaenopsis, Vanda, Aeride*s. El tallo de estas orquídeas, está provisto de raíces en toda su longitud y las inflorescencias nacen en la axila de las hojas (Lara y otros, 2009).

Gráfico 10. Tipos de crecimiento en orquídeas



Fuente: Morales, 2008.

2.11 Recolección de Orquídeas in situ: la información necesaria para la recolección, debe centrarse en la determinación de los lugares donde se puede encontrar una determinada especie (se planifica detalladamente los sitios de muestreo), mayor diversidad intraespecífica o encontrar recursos genéticos (variabilidad genética) con una determinada adaptación. Las respuestas a estas cuestiones permiten la organización de la recolección más productivas y con resultados más satisfactorios. El número de muestras a recolectar, dependerá de los objetivos concretos de la recolección y de los recursos disponibles; también debe ajustarse a las características biológicas de la especie, como su ciclo vital o su biología reproductiva (Bachetta y otros, 2008).

2.12 Mantenimiento de Orquídeas en invernadero: se debe construir un invernadero para mantener las orquídeas hasta que sus cápsulas maduren, se adapten a condiciones fuera del hábitat natural y no perezcan. Para elegir la ubicación del invernadero se debe tener en cuenta: exposición al sol y duración del fotoperiodo, vientos predominantes, se debe lograr la exposición mínima, suelo con profundidad efectiva, área libre de anegamientos (inundaciones) estacionales, accesibilidad vehicular, cercanía a fuente de agua y energía eléctrica (Alvarado y Urrutia, 2003). Un balance perfecto entre factores ambientales primordiales: luz, temperatura, humedad y ventilación, hace que el cultivo de orquídeas sea bueno, sin olvidar que las labores culturales son también factores que inciden (Portilla, 2007).

2.13 Caracterización y evaluación de Orquídeas: la caracterización de orquídeas se debe realizar a través de identificación bibliográfica, o en los diferentes herbarios del país. Es importante tener disponibilidad de información biológica suficiente, para lo cual, surge la necesidad de obtener un listado de las orquídeas del lugar, como base para la toma de decisiones sobre los posibles taxones a los que puedan pertenecer. En la evaluación de las orquídeas, los factores que condicionan la calidad de las semillas figuran: la edad, las condiciones climáticas y fisiológicas de la planta madre durante la formación de la semilla, el grado de madurez en el momento de la recolección, la técnica de recolección y los métodos de conservación (Bachetta y otros, 2008).

2.14 Tratamiento y almacenamiento de semillas en el Laboratorio

2.14.1 Registro de accesiones de cápsulas en el Laboratorio: el procedimiento para integrar una accesión (entrada de semillas nuevas) a un banco de germoplasma implica realizar una ficha-registro de cada una de las cápsulas que ingresan al laboratorio para su posterior organización en la base de datos. Para elaborar adecuadamente las fichas dentro de las accesiones y las etiquetas se puede seguir lo siguiente: no usar abreviaturas en nombres, escribir de forma clara y preferiblemente en mayúsculas usando bolígrafos indelebles, evitar realizar tachones que dificulten la lectura y su comprensión (Rao y otros, 2007). El banco le atribuirá un número o código que reconocerá ese lote, identificando cada "entrada" o "accesión". Por lo tanto, al efectuar la recogida del material, es muy importante indicar claramente en las etiquetas o fichas los datos fundamentales para facilitar el reconocimiento de la muestra y reducir las dudas de identificación que puedan surgir (Bachetta y otros, 2008).

2.14.2 Extracción, limpieza y secado de semillas: una vez registradas las cápsulas, se debe realizar limpieza - desinfección, posterior abertura de cápsulas para obtención de las semillas. La limpieza, es la eliminación de material inerte, lavado, descarte de semillas dañadas, con el fin de mejorar la calidad y pureza de las muestras. Por otra parte, el secado de semillas debe empezar lo más pronto posible después de que llegan al banco de germoplasma, para evitar se deterioren. Inmediatamente lleguen, se debe verificar se almacenen en un ambiente fresco y bien ventilado (con una humedad relativa baja). Si se las deja en un cuarto con humedad relativa alta, se requerirá un equipo deshumidificador para eliminar la humedad. El principio de esta humidificación, es que las semillas son higroscópicas y absorben o liberan humedad, dependiendo de la humedad relativa del aire circundante y del gradiente de potencial de agua entre la semilla. Si la presión de vapor de agua de la semilla es mayor que la del aire circundante, la semilla perderá humedad y se tornará más seca (desorción). Si la presión de vapor de agua de una semilla es menor que la del aire circundante, la semilla ganará humedad por absorción. El secado se realiza en campana para desecación con sílica gel por 2 o máximo 4 días (Rao y otros, 2007).

2.14.3 Viabilidad de semillas: una vez obtenidas las semillas se deben realizar pruebas de viabilidad, es importante que las semillas almacenadas en un banco de germoplasma puedan producir plantas cuando se deseen cultivar. Por tanto, las semillas deben tener una viabilidad alta al inicio del almacenamiento y mantenerla durante mucho tiempo. Las semillas con una viabilidad inicial alta sobrevivirán también más tiempo en almacenamiento. La viabilidad de las semillas se reduce lentamente al comienzo y luego rápidamente a medida que la semilla envejece. Es importante saber cuándo ocurre esta reducción para tomar acciones conducentes a regenerar la accesión. La viabilidad de las accesiones se debe determinar antes de empacar las semillas y almacenarlas en el banco de germoplasma; y a intervalos regulares durante el almacenamiento. De ser posible, los resultados de las pruebas de viabilidad deben estar listos antes de que las semillas se empaquen y se lleven a almacenamiento en el banco de germoplasma, de manera que las semillas de calidad deficiente se puedan identificar. Mientras se esperan los resultados de las pruebas de viabilidad, o si existe alguna demora las semillas se deben ubicar en un ambiente fresco. La viabilidad no debe ser confundida con la capacidad germinativa, de hecho las semillas viables durmientes no necesariamente germinan. La utilización paralela de ensayos de germinación y de ensayos de viabilidad nos aporta información más fiable sobre el estado de las semillas que se pretende conservar (Rao y otros, 2007).

El color de las semillas es un factor muy importante, indicativo y determinante de la viabilidad, pero durante el proceso de evaluación de las semillas, también deben tenerse en cuenta otros aspectos que ayudan a la interpretación y clasificación de las semillas en los distintos niveles de viabilidad, estos aspectos son: a) homogeneidad del color, b) turgencia de los tejidos, c) naturaleza de los daños, d) localización de los daños, e) extensión y f) profundidad de los daños. La viabilidad es claramente independiente de la realización de la prueba de germinación (ISTA, 2006). Existen cuatro métodos utilizados para analizar viabilidad: tetrazolio, catalasa, sustancias reductoras y electrolitos. Los dos primeros son los más fáciles de ejecutar en cualquier laboratorio y no representan costes elevados siendo por ello los más generalizados (Bachetta y otros, 2008). Principalmente, la Prueba de tetratozolio, es el más utilizado en viabilidad de semillas (Colbry y otros, 1986).

Prueba de Tetrazolio: el método fue propuesto por Sing en 1981, quien demostró que puede ser utilizado para determinar la viabilidad de las semillas de orquídeas tropicales epífitas (Lallana y García, 2010). Es una de las pruebas bioquímicas utilizadas para la evaluación de viabilidad en semillas, esta prueba, permite estimar de forma rápida la condición biológica de las semillas en cuanto a viabilidad y vigor, además es útil para el análisis de semillas latentes, así como para complementar los datos de los ensayos de germinación, y en el diagnóstico de las causas de deterioro de las semillas. Se denomina tejido vivo o semillas viables a aquellas que son completamente coloreadas y tejido muerto a aquellas semillas no coloreadas (muertas), pueden aparecer semillas parcialmente coloreadas que son catalogadas como no viables (ISTA, 2006).

Luego que la solución de tetrazolio es embebida por la semilla, en las células vivas de los tejidos se lleva a cabo una reacción química de óxido-reducción en la cual participan las enzimas deshidrogenasas presentes en los tejidos vivos. En esta reacción, los protones hidrógeno liberados en el proceso de respiración reducen a la sal de tetrazolio a un compuesto llamado formazan, sustancia estable, de coloración rojiza, que permite distinguir las áreas vivas de las semillas de las zonas muertas (ISTA, 2006). La actividad de los procesos enzimáticos de las semillas, decrecen paralelamente con su viabilidad, por lo tanto, una coloración roja intensa, es indicadora de la presencia de células vivas en el embrión; en cambio, la no coloración o la coloración rosa pálido, son indicativas de muerte o poca viabilidad de las células embrionarias (Moreno, 1984).

La viabilidad medida a través de la Prueba de Tetrazolio es una característica única y distintiva de una semilla latente. La viabilidad es claramente independiente de la realización de la prueba de germinación. Sin embargo, no habrá diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad y germinación solamente en los casos donde las semillas: a) no están dormidas, no están duras o se ha tratado apropiadamente con tratamientos de ruptura de dormición, b) no están infectadas o se han desinfectado apropiadamente, c) no han sido recubiertas durante el procesamiento o no han sido fumigadas con productos químicos dañinos durante el almacenamiento, d) no han rebrotado no se han deteriorado durante la prueba de germinación en su duración normal o en su extensión, e) han germinado bajo condiciones óptimas (ISTA, 2006).

2.14.4 Almacenamiento y empaque de semillas: el almacenamiento, es la preservación de las semillas en condiciones ambientales controladas para que mantengan la viabilidad durante períodos prolongados. La longevidad de las semillas, depende de su calidad inicial, contenido de humedad y temperatura durante el almacenamiento (Rao y otros, 2007). Por esto, en algunas investigaciones se evalúan las condiciones que puedan generar una mayor estabilidad metabólica en las semillas (Ossenbach y otros, 2006 b).

El proceso de empaque se realiza mejor en un cuarto con aire acondicionado y humedad relativa controlada. Después de sacar las semillas del cuarto de secado, hay que tener cuidado de exponerlas al aire durante el menor tiempo posible para evitar que reabsorban agua (Rao y otros, 2007). El empaque de las semillas se realiza en sobres individuales de papel dentro de un contenedor cerrado que contenga en una esquina un frasco de boca grande con una solución saturada de cloruro de calcio y agua, lo cual proveerá a 4°C un 30 % de humedad relativa. El papel permite una mayor respiración de la semilla, por lo que se puede controlar mejor la humedad (Hicks, 2000). Otros autores, prefieren secar las semillas con cloruro de calcio o cloruro de litio entre 3 a 4 días a temperatura ambiente y posteriormente guardarlas en viales o "*vacuntainers*" (contenedor al vacío) herméticos en refrigeración o congelación. De esta manera se evita el intercambio gaseoso y la humedad se mantiene constante si el vial se conserva cerrado (Seaton, 2000). Los rótulos para almacenamiento de semillas, debe contener información: número de la accesión, género de la especie, número del recipiente, peso de las semillas y fecha de almacenamiento. El número de semillas que se debe empacar para almacenamiento dependerá de la especie que se esté conservando y de la frecuencia con que se retirarán las semillas para monitoreo o regeneración (Rao y otros, 2007).

En cuanto a las semillas de cápsulas inmaduras, no se debe almacenar, con excepción de aquellos casos en los que las semillas maduras son difíciles de germinar. Sin embargo, se asegura que en especies de más de una cápsula, una manera de averiguar si la semilla dentro de una cápsula cerrada ya está madura, es abriendo una cápsula en la parte superior de la inflorescencia, ya que éstas son las últimas en madurar al ser las últimas en abrir, y por lo tanto, las últimas en ser polinizadas (Ossenbach y otros, 2006 b).

En el caso de las semillas con coloración café pueden ser removidas fácilmente de la placenta, están listas para ser cosechadas; si son blancas y no se despegan con facilidad, éstas no son aprovechables; pero si son blancas, y sí se desprenden fácilmente, germinarán, pero deberán sembrarse antes de los 5 días, imposibilitando su conservación. A pesar de las dificultades de almacenar semilla inmadura, tradicionalmente se ha acostumbrado sembrar precisamente, este tipo de semilla, ya que ésta se supone que presenta un porcentaje de germinación mayor, y más rápido que las semillas maduras (Ossenbach y otros, 2006 b). Cuando se dispone de suficiente material y no es posible sembrar la totalidad, se sugiere extraer las semillas en un área estéril y deshidratarlas con sílica gel en un desecador por dos días. Posteriormente, se colectan las semillas en tubos de vidrio con tapa hermética y se pueden almacenar en un refrigerador a 4°C por varios meses, siempre y cuando no se abra el contenedor (Mayo y otros, 2010).

2.14.5 Tipos de almacenamiento de semillas: existen dos modalidades de conservación de los recursos genéticos almacenados en forma de semilla: colecciones base, que conservan las muestras de semilla a largo plazo para seguridad; y las colecciones activas, que mantienen muestras de semillas para el uso inmediato (Rao y otros, 2007).

Colecciones base: es un conjunto de acciones únicas, cuya integridad genética es lo más cercana posible a la muestra original. Cuando la conservación es a largo plazo y su finalidad es evitar pérdidas y conservar para un futuro más o menos lejano (González-Meneses, 2007). Las semillas de una colección base, por lo general no se distribuyen directamente a los usuarios; sólo se utilizan para regenerar colecciones activas (FAO/IPGRI, 1994).

Colecciones activas: se componen de acciones que están disponibles para distribución inmediata. Cuando la conservación es a medio plazo y desde ella se realizan envíos de semillas para mejoradores, científicos, agricultores, entre otros (González-Meneses, 2007). Estas acciones son de acceso frecuente y se mantienen en condiciones que garanticen una viabilidad de por lo menos de 65% durante 10 años (FAO/IPGRI, 1994).

2.14.6 Documentación final de registros: una base de datos digital va a permitir acceder rápidamente a muestras nuevas, responder a inquietudes sobre el germoplasma conservado, monitorear la calidad, la cantidad del material almacenado para regenerar y distribuir. Los descriptores que se sugieren incluyen los siguientes: condiciones de almacenamiento-tipo de colección, tipo de recipiente, número de recipientes, cantidad total de semillas almacenadas (por peso o número), fecha de almacenamiento, ubicación en el banco de germoplasma, entre otros (Rao y otros, 2007).

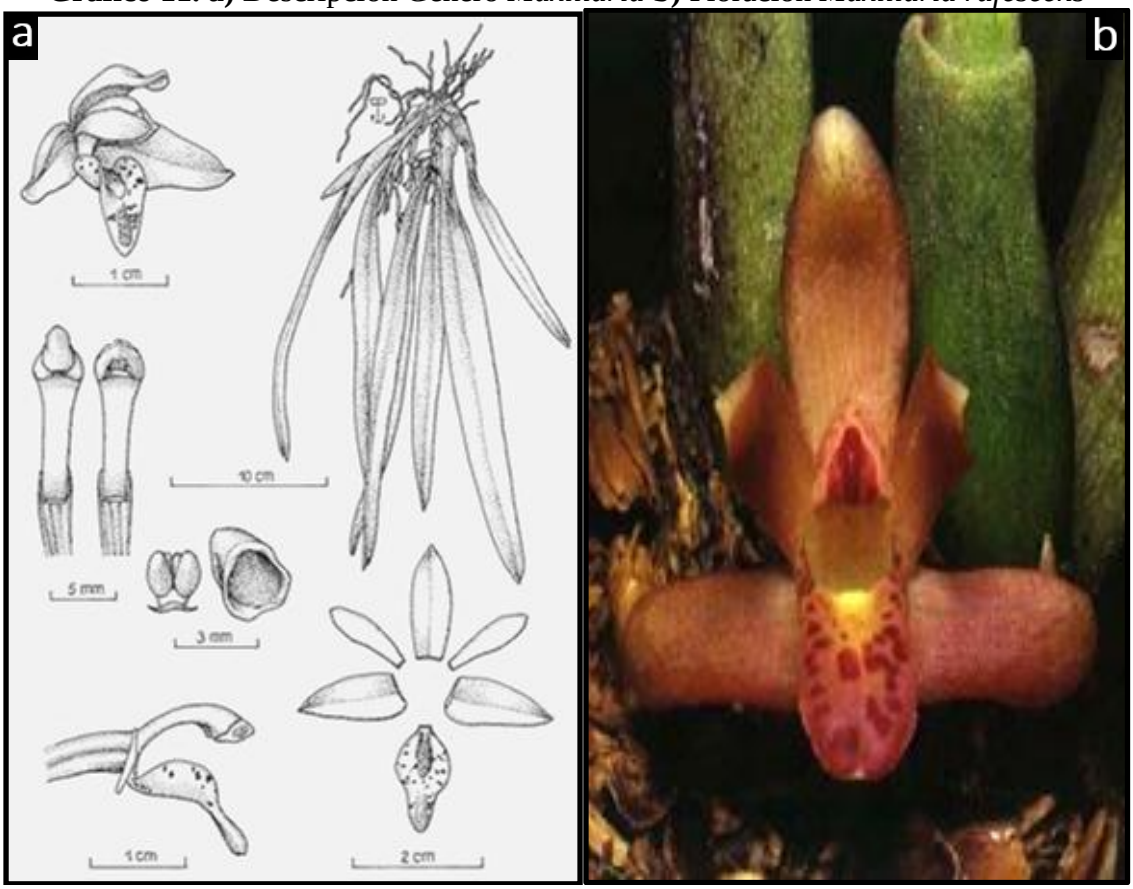
2.15 Conservación de semillas de Orquídeas: la conservación integrada, es decir, la combinación de conservación "*ex situ*" e "*in situ*" de orquídeas, constituye una herramienta importante en la preservación de la diversidad biológica, además de un modo de aprovechar mejor los conocimientos, experiencia y recursos de diversas organizaciones (INTA, 2012).

2.15.1 Conservación ex situ de semillas: la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales se puede lograr mediante el almacenamiento *in vitro*. Esta técnica ofrece la oportunidad de conservar germoplasma selecto a corto y mediano plazo. El germoplasma conservado debe ser regenerado a plantas y para ello se necesita establecer protocolos de micropropagación antes de la conservación. La conservación *ex situ*, se realiza en repositorios especiales (en sitios fuera del centro de origen), que proveen las condiciones adecuadas para la conservación de material propagativo por largo tiempo. Estos métodos incluyen el almacenamiento de semillas, bancos de genes en campo, colecciones *in vitro* y jardines botánicos. Las colecciones *in vitro*, ubicadas en los bancos de germoplasma, son sitios para la conservación de los recursos genéticos en condiciones controladas de laboratorio y que involucran diversas técnicas de cultivo y almacenamiento *in vitro*. Esto, permite mantener una alta diversidad en espacios reducidos, en condiciones asépticas y a salvo de los riesgos ambientales que podrían provocar su pérdida. La unidad de colección que se mantiene en condiciones controladas puede ser la semilla botánica o explantes vegetativos, dependiendo principalmente del hábito de crecimiento de la especie (Mayo y otros 2010).

2.16 Características generales de ciertos géneros de orquídeas

2.16.1 Género Maxillaria: en Ecuador se citan 200 especies, distribuidas a una altura hasta 3500 msnm. **Hábitat:** pueden ser epífitas, litófitas. **Hojas:** sésiles o cortamente pecioladas, lámina angostamente elíptica, coriácea, de 5-30 cm de largo, de 1-4 hojas en el ápicea agudo. **Flores:** flor única (Gráfico 11), emerge desde la base del pseudobulbo de 4 cm de longitud, comúnmente amarilla o naranja con rojo, labelo con puntos púrpuras (Cavero y otros, 2009), las flores también pueden estar agrupadas densamente en las axilas de las hojas, el mentón que forma la base del pie de la columna con los sépalos y el labelo, así como la columna arqueada son las características más distintivas del género. **Pseudobulbos:** cilíndricos y unifoliados. **Rizoma:** rastrero, más o menos alargado (Lara y otros, 2009).

Gráfico 11. a) Descripción Género *Maxillaria* **b)** Floración *Maxillaria rufescens*



Fuente: Pupulin, 1998. **Foto:** Cavero y otros, 2009.

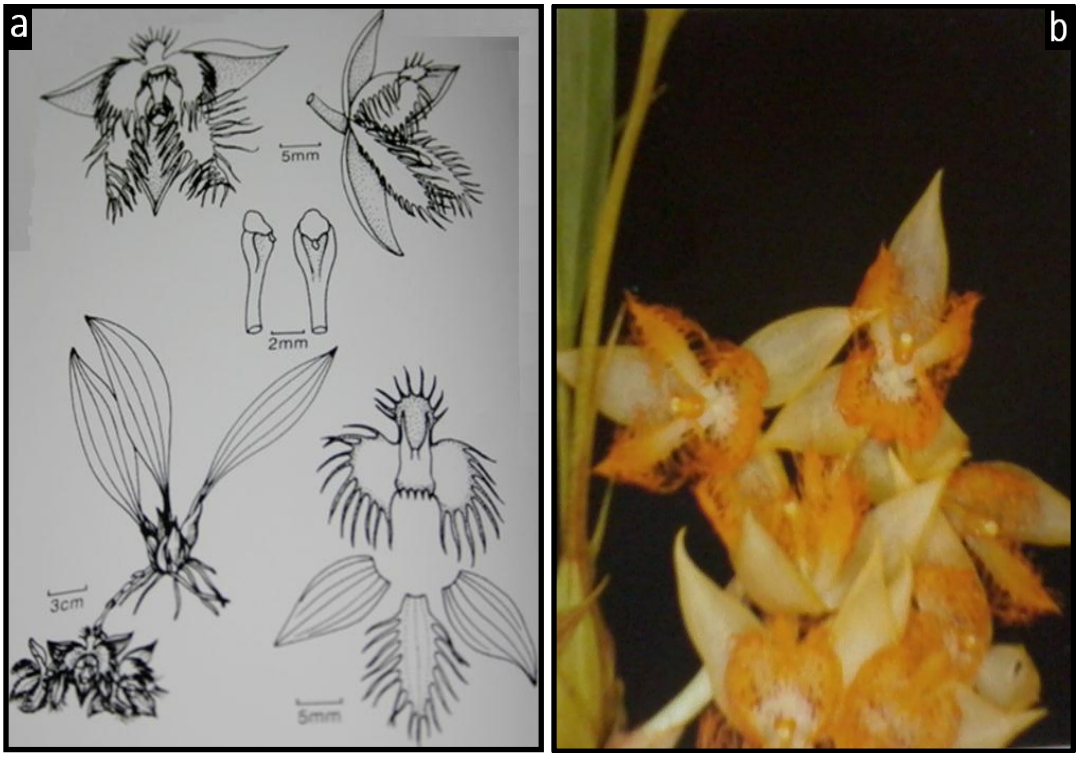
2.16.2 Género Sobralia: en Ecuador se citan 43 especies, a una altura hasta 2000 msnm. **Hábitat:** terrestres en taludes (zonas alteradas). **Hojas:** largas grandes, coriáceos, elípticolanceoladas, venas prominentes, acuminadas y color verde oscuro. **Tallos:** cubiertos con brácteas tubulares, tipo caña. **Inflorescencias:** simple inflorescencia. **Flores:** las flores presenta los sépalos y pétalos libre y abiertos; el labelo rodea la columna, y suele estar provisto de quillas o crestas longitudinales, la columna alargada y estrechamente alada, con una proyección a cada lado de la antera (Gráfico 12), con pliegues, el callo con varias hileras de lóbulos laciniados conspicuos (Lara y otros, 2009).

Gráfico 12. a) Descripción Género *Sobralia* b) Floración *Sobralia rosea.*

Fuente: Dodson C. y P. Dodson, 1980. **Foto:** Aguirre y otros 2011.

2.16.3 Género Sievekingia: en Ecuador se citan 6 especies, distribuidas a una altura de 400 a 1200 msnm. **Hábito:** epífitas y requieren mucha humedad, generalmente están en los árboles en los bordes de ríos. **Pseudobulbos:** ovoides con una sola hoja peciolada y profundamente nervada. **Inflorescencias:** pendulares con un grupo de flores (Gráfico 13), agrupadas en la puntas; los sépalos y pétalos son libres, el labelo es trilobado con un callo que presenta excrecencias y en algunos casos bordes ciliados (Lara y otros, 2009).

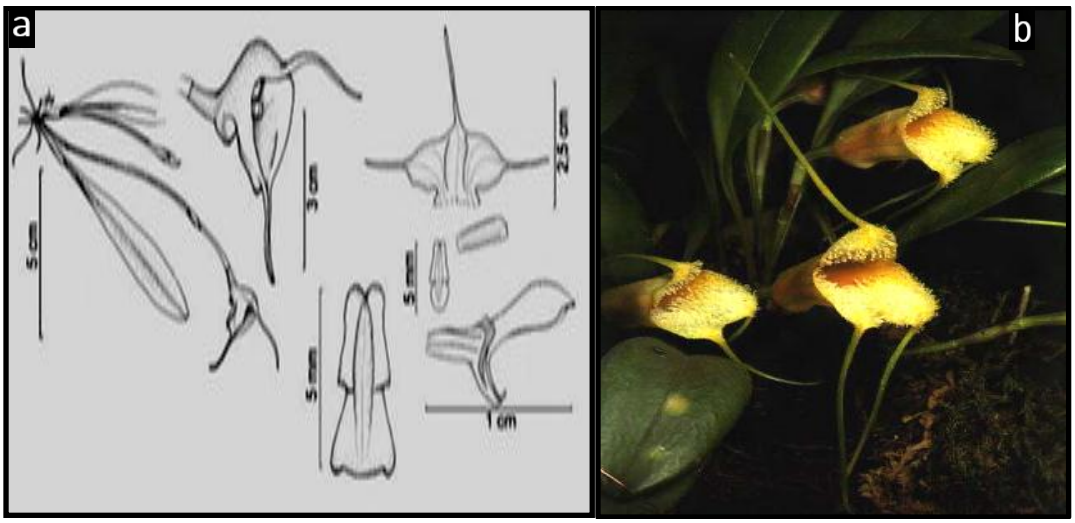
Gráfico 13. a) Descripción Género *Sievekingia* **b)** Floración *Sievekingia reichenbachiana.*



Fuente: Lara y otros, 2011. **Foto:** Lara y otros, 2011.

2.16.4 Género Masdevallia: en Ecuador se citan más 230 especies, a una altura de 600 a 3000 msnm. **Hábito:** terrestre o litófita y raramente epífita. **Hojas:** erectas a dobladas con frecuencia coriáceas, elíptica-obovada, sub-aguda, presencia de ramicaulo (tallos en forma de pecíolos), los cuales son menos largos que las hojas. **Inflorescencias:** nace cerca de la base del ramicaulo y pueden dar origen a una o varias flores con los sépalos fusionados en la base y los ápices largos y delgados en forma de una cola (Gráfico 14), los pétalos son imperceptibles. **Flores:** pétalos blancos, oblongos, pubescencia, capitada púrpura cubre la superficie interna de los sépalos (Lara y otros, 2009).

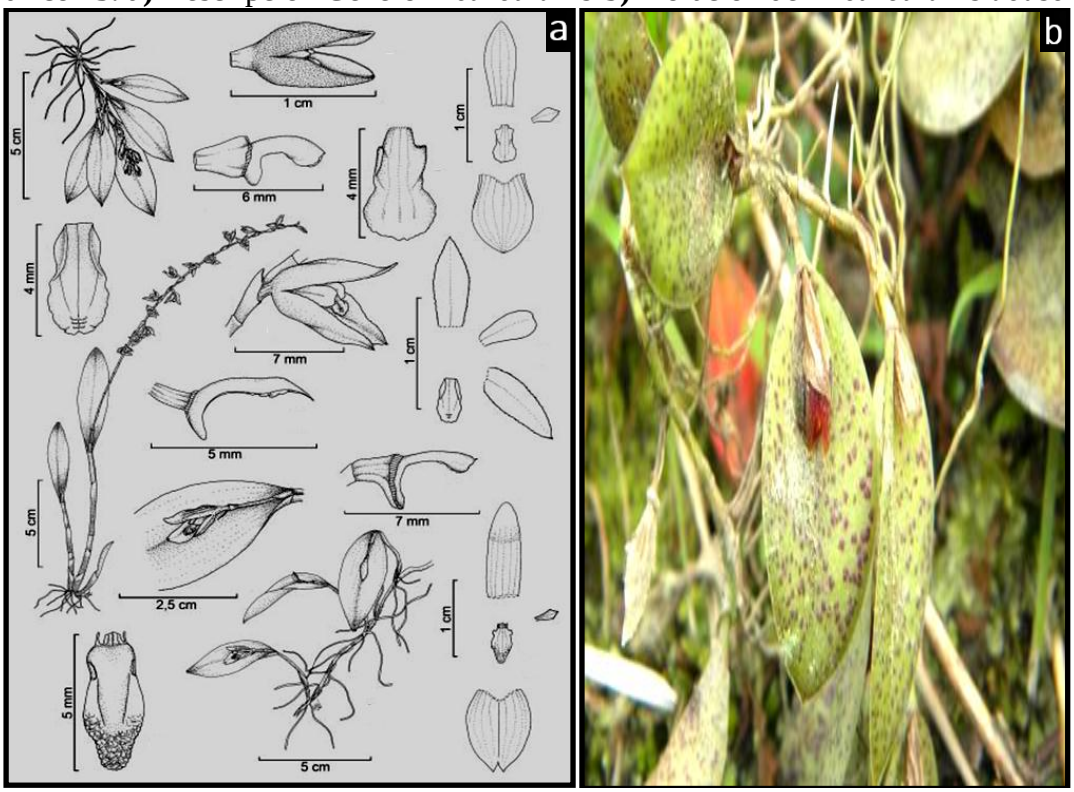
Gráfico 14. a) Descripción Género *Masdevallia* **b)** Floración *Masdevallia strobellii*.



Fuente: Menini y otros, 2007. **Foto:** Cavero y otros, 2009.

2.16.5 Género Pleurothallis: en Ecuador de citan 421 especies, a una altura hasta 3500 msnm. **Hábito:** en bosques húmedos. Género muy heterogéneo (Gráfico 15), las características florales así como vegetativas difieren unas de otras (Lara y otros, 2009).

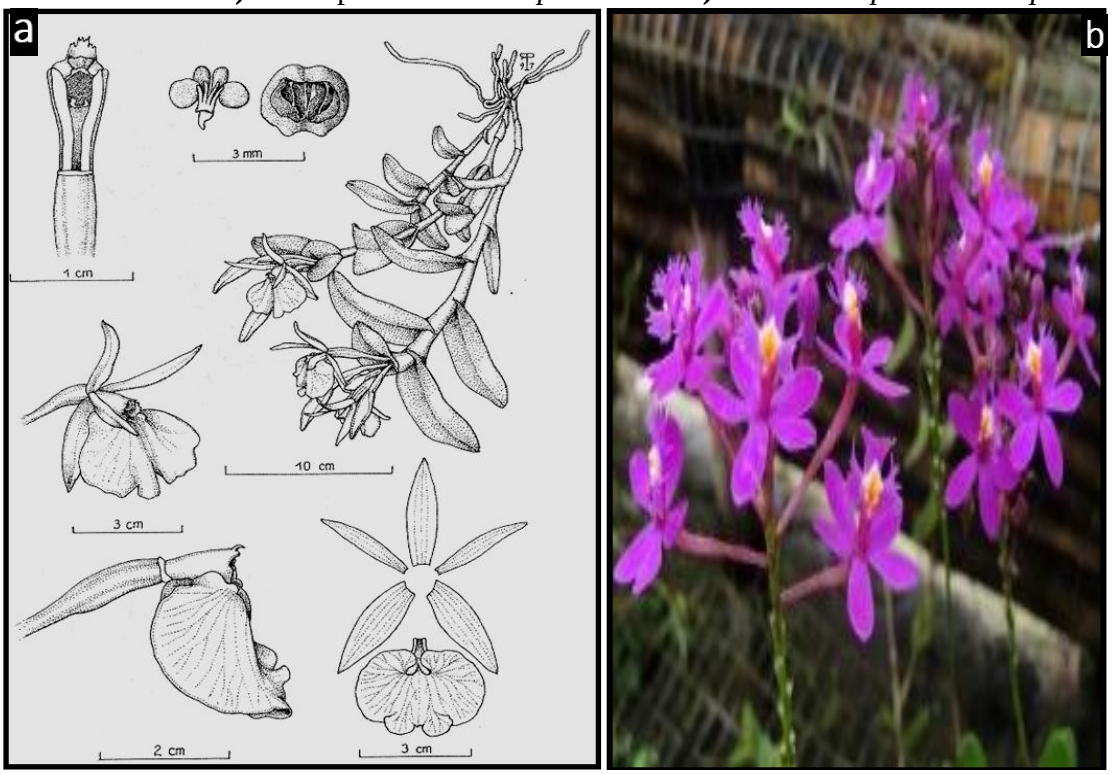
Gráfico 15. a) Descripción Género *Pleurothallis* **b)** Floración de *Pleurothallis dodsoni*.



Fuente: Menini y otros, 2007. **Foto:** Aguirre y otros 2011.

2.16.6 Género Epidendrum: en Ecuador se citan 150 especies, distribuidas a una altura menor a 3500 msnm. **Hábito:** ocupa casi cualquier ecosistema. Crecen en zonas secas como los valles interandinos o en los bosques nublados más húmedos**. Tallos:** hasta 2 m de altura. Carencia de pseudobulbos y tallos alargados tipo caña, hojas alargadas (Gráfico 16). **Inflorescencia:** en forma de estrella. El labelo está unido a la columna para formar un nectario interno en forma de tubo. Llevan docenas de flores diminutas, pero muy organizadas (Lara y otros, 2009).

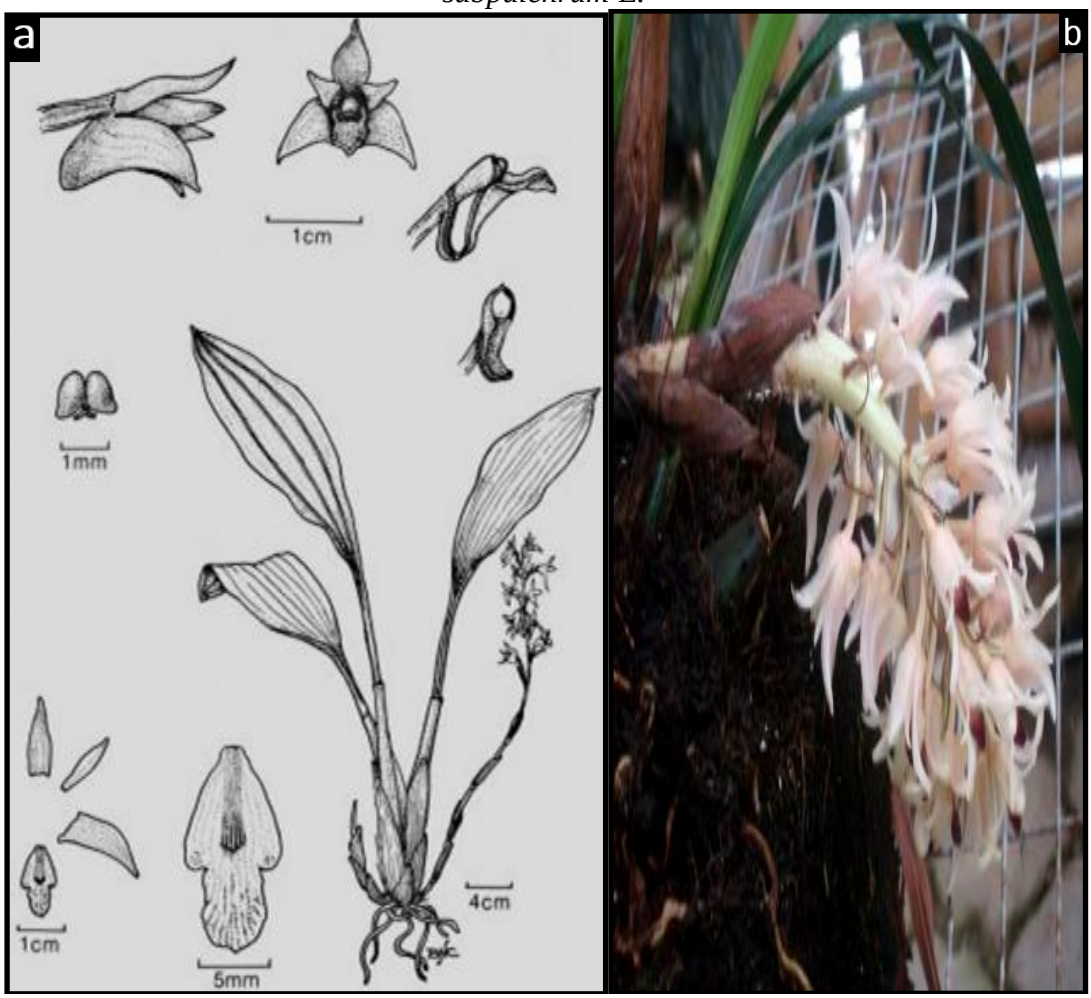
Gráfico 16. a) Descripción Género *Epidendrum* **b)** Floración *Epidendrum sp.*



Fuente: Leopardi y otros, 2009. **Foto:** Aguirre y otros 2011.

2.16.7 Género Xylobium: en Ecuador se citan 11 especies, distribuidas a una altura hasta 2500 msnm. **Hábito:** epífitas, terrestres. **Pseudobulbo:** ovoides o cilíndricos, con una o tres hojas. **Inflorescencia:** es un racimo de múltiples flores, con el sépalo dorsal y los pétalos libres y los sépalos dorsales están unidos a un pie de columna prominente, formando un mentón (Gráfico 17). **Hojas:** delgadas y nervadas al final del tallo (Lara y otros, 2009).

Gráfico 17. a) Descripción Género *Xylobium* **b)** Floración de la planta de *Xylobium subpulchrum* L.



Fuente: Dodson C. y P. Dodson, 1980. **Foto:** Aguirre y otros 2011.

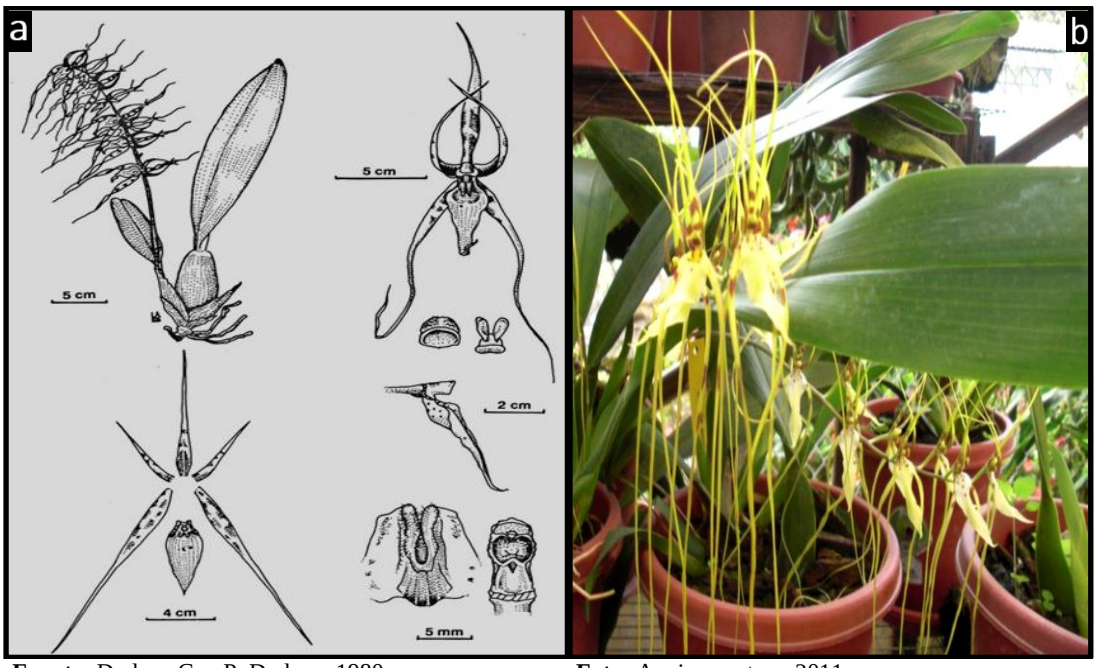
2.16.8 Género Prosthechea: en Ecuador se citan alrededor de 100 especies, distribuidas a una altura menor a 1500 msnm. **Hábito:** se encuentra en los Neotrópicos. **Flores:** las flores forman una inflorescencia apical, paniculada en racimo con una espata en la base. **Frutos:** poseen forma de huevo, 1-locular, con tres cápsulas aladas (Gráfico 18) (Lara y otros 2011). **Tallos:** erguidos de forma aplanada. Engrosamiento en el pseudobulbo. **Raíces:** poseen velamen diferenciado; el epivelamen es grueso y el endovelamen delgado. Los cristales de flavonoides se pueden observar en las raíces y hojas (Cavero y otros, 2009).

Gráfico 18. a) Descripción Género ***Prosthechea*** **b)** Floración de *Prosthechea vespa*.

Fuente: Dodson C. y P. Dodson, 1980. **Foto:** Biocromática, 2001.

2.16.9 Género Brassia: en el Ecuador se citan alrededor de 30 especies, distribuidas a una altura de hasta 1500 msnm. Este género fue dedicado a William Brass, ilustrador botánico, contemporáneo de Robert Brown. Este se encuentra considerablemente distribuido desde Florida hasta América del sur. **Hábito:** suelen ser epífitas, terrestres prefieren zonas húmedas o cálidas, no es raro encontrarlas en zonas secas. **Pseudobulbo:** oblongo-elíptico, aplanados. **Hojas:** tiene una sola hoja en la parte posterior del bulbo. **Inflorescencia:** una inflorescencia basal (Gráfico 19), bracteada de 60 cm de largo, con varias flores. **Flores:** poseen pétalos y sépalos delgados alargados, pueden medir hasta de 10 a 30 cm; la coloración cambia según el grado de madurez de las flores (Lara y otros 2011).

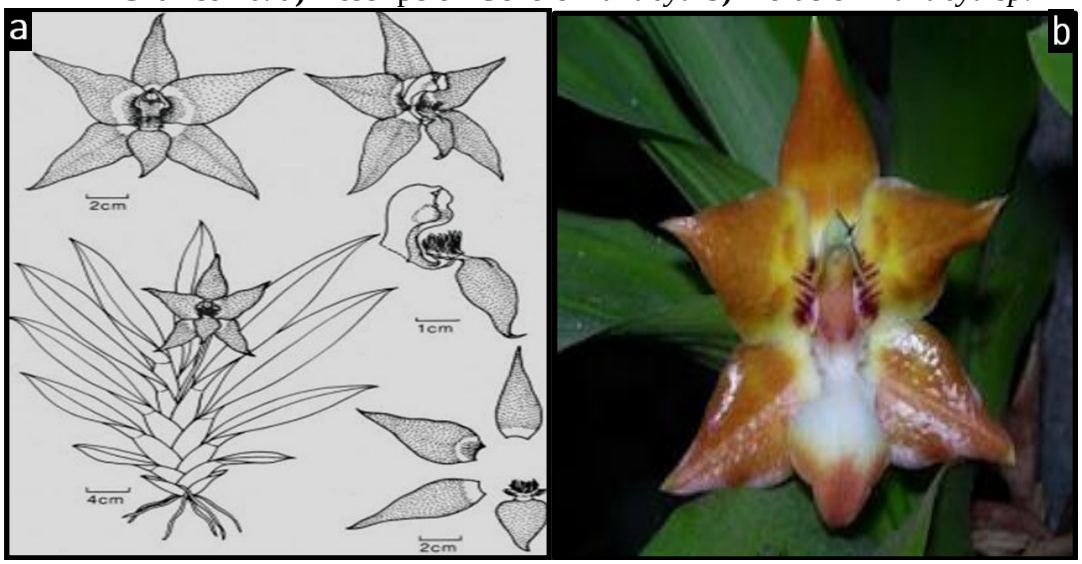
Gráfico 19. a) Descripción Género *Brassia* **b)** Floración de *Brassia arcuigera.*



Fuente: Dodson C. y P. Dodson, 1980. **Foto:** Aguirre y otros, 2011.

2.16.10 Género Huntleya: en Ecuador se citan 6 especies, a una altura de 200 a 1000 msnm. **Hábitat:** epífitas. **Hojas:** grandes nervadas y dispuestas en abanico. **Flores:** solitarias, apariencia de estrella (Gráfico 20), el labio no rodea la columna, está paralelo a ella y un callo imbriado. **Pseudobulbo**: no presente (Cavero y otros, 2009).

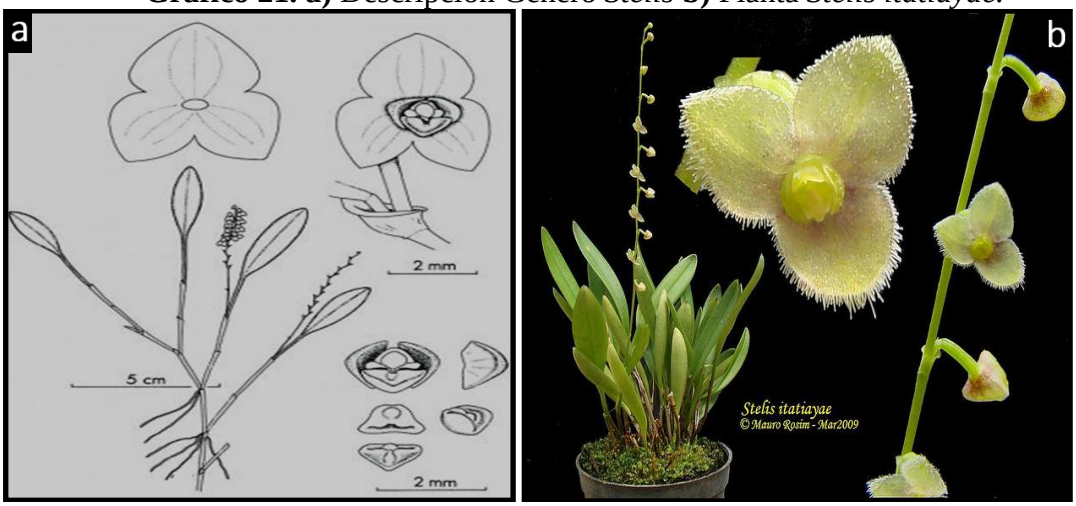
Gráfico 20. a) Descripción Género *Huntleya* **b)** Floración *Huntleya sp.*



Fuente: Dodson C. y P. Dodson, 1980. **Foto:** Biocromática, 2001.

2.16.11 Género Stelis: en Ecuador se citan 428 especies, a una altura de hasta 3600 msnm. **Hábito:** epífitas, terrestres o litófitas. **Hojas:** hojas coriáceas o carnosas (Gráfico 21). **Tallos:** secundarios cortos cubiertos con brácteas. **Flores:** inflorescencia en racimo, con diminutas flores, sépalos grandes y de igual tamaño; los pétalos pequeños en relación a los sépalos, columna reducida con prominente estigma (Lara y otros, 2011).

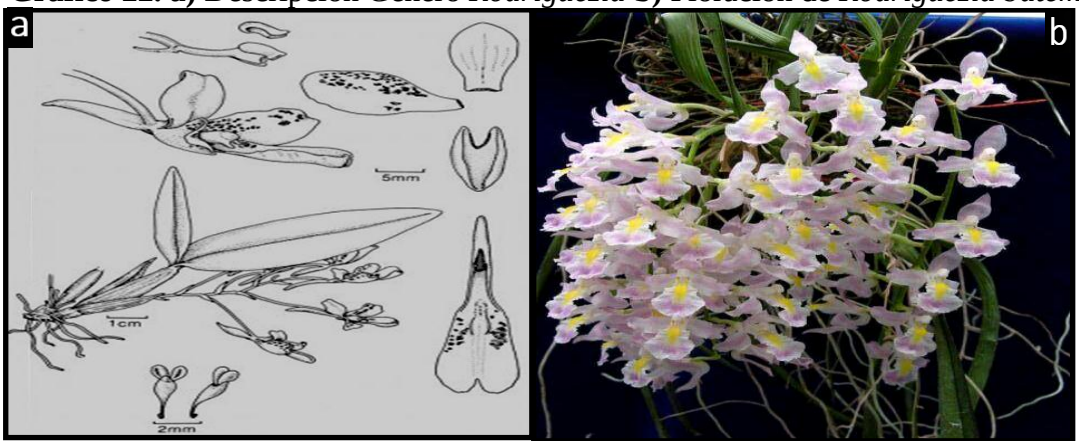
Gráfico 21. a) Descripción Género *Stelis* **b)** Planta *Stelis itatiayae.*



Fuente: Dodson C. y P. Dodson, 1980. **Foto:** Rosim, 2009.

2.16.12 Género Rodriguezia: **Rizoma:** largo, con raíces adventicias. **Pseudobulbos:** ovalados, espaciosos (Gráfico 22), visibles en parte, con pocas envolturas de hojas, carnosas. **Flores:** pétalos y sépalos dorsales grandes, con racimo pedunculado erecto con algunas flores en el final, el labio es simple, por lo general tiene el mismo color que los pétalos y sépalos, con lóbulo medio de final bilobulado (Portilla, 2007).

Gráfico 22. a) Descripción Género *Rodriguezia* **b)** Floración de *Rodriguezia batemanii.*



Fuente: Dodson C. y P. Dodson, 1980. **Foto:** Portilla, 2007.

2.17 Bancos de Germoplasma: el término germoplasma está formado por la palabra germen (“inicio” u “origen”) y plasma (“formación”), definiéndose como todo “material genético capaz de regenerar otra materia viva igual o similar a la original” (Perrino y Terzi, 2003). Los bancos de germoplasma al ser depósitos de recursos fitogenéticos, proporcionan materia vegetal para el mejoramiento o propagación de cultivos. Las semillas almacenadas, son un recurso vital e irreemplazable, que se debe conservar para proveer recursos en el futuro, en un mundo que afronta el cambio climático y otros desafíos. Seguir procedimientos adecuados en el manejo de semillas es fundamental (Rao y otros, 2007). Según las técnicas de conservación empleadas, los bancos pueden ser: bancos de semillas, bancos con colecciones en campo, bancos de colecciones *in vitro*, bancos por crioconservación, bancos de conservación de polen y bancos de conservación directa de ADN (Iriondo, 2001).

2.17.1 Bancos de Germoplasma en América del Sur: los bancos de semillas en el continente americano, crecieron desde la década de los setenta (WIEWS, 2007; (SINGER, 2006). Salvo algunos bancos de importancia mundial, poco se sabe de la diversidad real que conservan los bancos de la región, del flujo de germoplasma y la disponibilidad de estos materiales para el mejoramiento genético. La escasa información, indica que el intercambio de germoplasma en Latinoamérica es limitado debido a los diversos problemas que enfrentan (Franco, 2007).

2.17.2 Bancos de Germoplasma en Ecuador: la creación de los bancos de Germoplasma en nuestro país, tiene la finalidad de contrarrestar el grave problema de la degradación de recursos fitogenéticos ecuatorianos. Los bancos en el Ecuador, manejan el germoplasma bajo técnicas de laboratorio apropiadas para su conservación a largo plazo, establecimiento de parámetros que permitan la propagación efectiva de especies que se encuentran en peligro e intercambio de semillas. Actualmente, los bancos que existen, se encargan de conservar especies vegetales de interés comestible, medicinal, silvestre y forestal (UTPL, 2010).

3. METODOLOGÍA

3.1 Recolección, identificación y conservación en invernadero de orquídeas de Copal, Tres Ranchos y La Delicia del Cantón Santiago

3.1.1 Recolección e identificación de Orquídeas en el Cantón Santiago

Materiales: podadora de mano, podadora de extensión, piola de 200m, cubeta plástica grande, fundas grandes transparentes, libro de campo, cinta *masking*, marcadores permanentes, lápices, paraguas, cámara fotográfica, navaja, tijeras, machete y mapa.

Procedimiento: el primer paso para la recolección de orquídeas, fue determinar el área a muestrear, esto fue realizado a través de una investigación bibliográfica sobre las provincias con presencia de endemismo de orquídeas en el Ecuador, esta investigación, constató que el mayor endemismo de orquídeas del país; está en la provincia de Morona Santiago (Gráfico 23), con 439*spp* (Endara y otros, 2011).

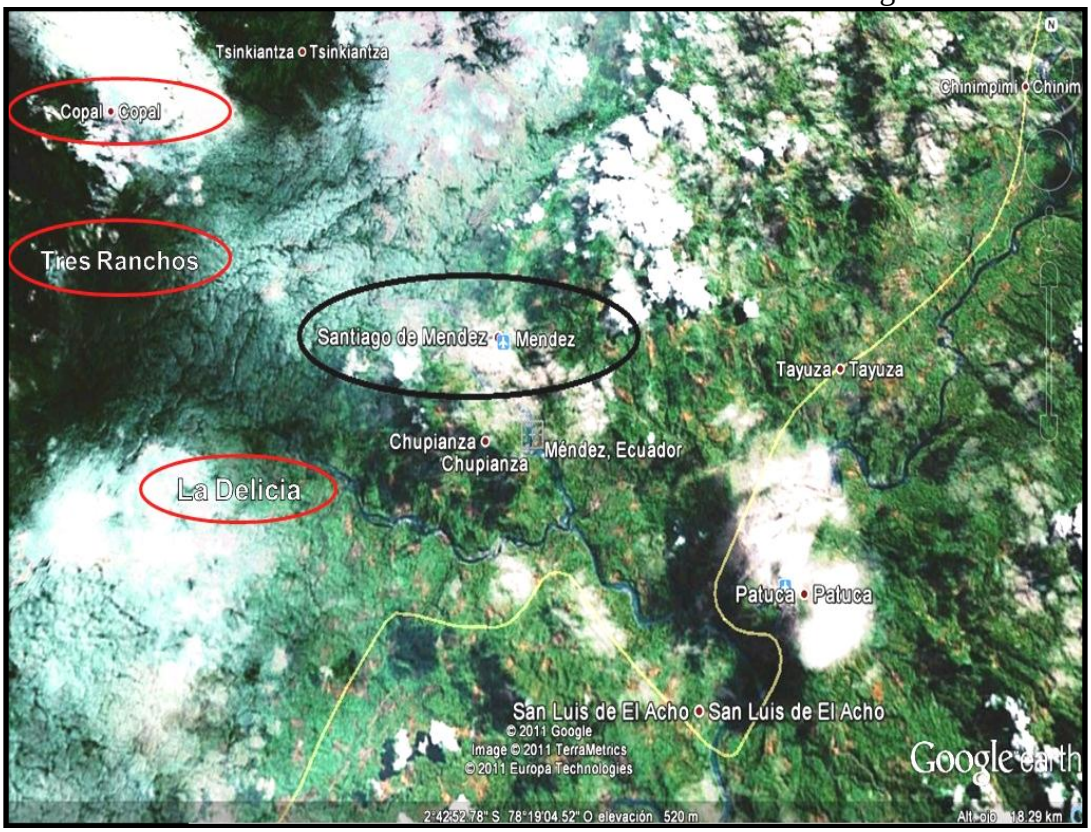
En el mes de Diciembre de 2011, se presentó todos los documentos requeridos para obtener el permiso legal de investigación con flora de Ecuador, en el Ministerio del Ambiente (MAE). Este trámite, se realizó en la Dirección Provincial del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago (DPMS/MAE), institución ubicada en la ciudad de Macas. El permiso fue otorgado y designado como: "Autorización de Investigación Científica No. 17-2011 –Investigación – B –DPMS / MAE, Flora X" (Anexo 1) y tiene una vigencia de un año bajo el cumplimiento de ciertas condiciones (Anexo 2).

Ubicación del Área de estudio: el área de estudio seleccionada, fue el cantón Santiago (Gráfico 24), que está ubicado en el centro geográfico de la provincia de Morona Santiago, en el valle del río Upano; corresponde a una formación vegetal de bosque amazónico siempreverde piemontano (León-Yánez y otros, 2011) y está a una altura entre 650 y 1400 msnm. El invernadero se ubicó en la ciudad de Macas, las misma que posee una temperatura media anual de 25°C y está a una altura de 1000 msnm (Gobierno Provincial de Morona Santiago, 2012).

Gráfico 23. Ubicación de las zonas de estudio en el mapa del Ecuador

Fuente: Mapas del Instituto Geográfico Militar (IGM), 2008.

Gráfico 24. Ubicación de las zonas de estudio en el Cantón Santiago de Méndez



Fuente: Mapa del Gobierno Provincial de Morona Santiago, 2012.

Población: se estableció como población a 50 individuos de orquídeas del cantón Santiago de Méndez, específicamente de tres zonas, con su correspondiente denominación: Sector A - Copal, Sector B - Tres Ranchos y el Sector C - La Delicia.

A continuación, se construyó un invernadero en la ciudad de Macas del cantón Morona, en la provincia de Morona Santiago (Gráfico 25).

Gráfico 25. Fotografías del invernadero en la ciudad de Macas. **a)** Invernadero acabado **b)** Vista interior **c)** Vista posterior **d)** Estanterías terminadas

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

El siguiente paso, fue seleccionar el sustrato para el cultivo de las orquídeas en invernadero; en este caso, se eligió la fibra de raíz de la especie arborescente denominada "helecho macho", encontrada en la Amazonía ecuatoriana. La fibra fue desinfectada con agua a 70°C y posteriormente adaptada en forma de macetas con una moto-sierra. Estas macetas se organizaron en los estantes dentro del invernadero. Consecutivamente, se dispuso de los formularios del libro de campo (Tabla 2) y de los materiales a emplear en el trabajo de campo posterior.

Tabla 2. Ficha empleada para anotar datos en la recolección en campo

Ficha para descripción de especies recolectadas en el libro de campo	
Fecha de Recolección:	
Recolector:	
Código:	**Familia:**
Especie:	
Características de la Especie:	
Características del Lugar:	
Horas Luz:	

Fuente: Cerón, 2003.

Una vez en campo, se delimitó el área a muestrear utilizando la técnica de transectos, puntualizada por Cerón (2003), que describe utilizar una piola para marcar las áreas a muestrear. Para determinar estas áreas, se recorrió varios lugares de las zonas, seleccionando las zonas más accesibles para el ingresó del equipo investigativo. Se definieron dos transectos lineales de 100m² en cada sector, distribuidos en franjas de 50 x 2 m, un total de 600m² de área total muestreada.

Posteriormente para obtener las especies, se utilizó el método directo de recolección, es decir, el uso de la podadora de mano para extraer orquídeas sobre ramales, y el usó de la podadora de extensión para aquellas orquídeas sobre los árboles no mayores a 10 o 12 m de alto. Luego, con cinta masking y marcador indeleble, se etiquetó cada individuo con los códigos correspondientes (Gráfico 26), con referencia al libro de campo de la base de datos de Cerna (2012), las especies recolectadas, fueron almacenadas en bolsas plásticas transparentes y trasladadas en cubetas hacia el invernadero (Anexo 6).

La identificación de las orquídeas, se realizó con la ubicación de los dos taxones más importantes: género y epíteto, a través de fotografías en el internet y libros sobre orquídeas, como “Ecuador país de Orquídeas” (Lara y otros, 2009), “Manual de Cultivo de las Orquídeas” (Portilla, 2007), entre otros.

Gráfico 26. Proceso de Recolección de Orquídeas. **a)** Delimitación del área a muestrear **b y c)** Método directo de recolección con el uso de podadora de mano **d y e)** Uso de la podadora de extensión **f)** Etiquetado de cada individuo con el códigos correspondiente

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

3.1.2 Conservación en invernadero de orquídeas del Cantón Santiago de Méndez

Materiales: termómetro, bomba a presión para riego, malla sarán 50 y 75%**,** podadoras de mano, tijeras, cinta *masking*, cinta de plástico roja, baldes, registro del invernadero, bolígrafos, lápices, costales y pala.

Procedimiento: en el invernadero, se esterilizó las herramientas con alcohol potable al 70% v/v, para el corte de las plantas. Se limpió manualmente de la hojarasca y raíces extrañas. Se añadió el material del helecho macho troceado, el musgo y las mazorcas de maíz dentro de la maceta elaborada. Se ubicó la planta en la maceta con presión hasta que quedó estable. Finalmente cada orquídea fue etiquetada según el código fijado en campo, con cinta plástica de color rojo (Gráfico 27). Las labores culturales que se realizaron en invernadero, fueron poda y limpieza de hojas.

Gráfico 27. Proceso de siembra de orquídeas en el invernadero. **a)** Limpieza y desinfección total de la planta **b)** Selección y cultivo de la planta **c)** Presión al medio hasta que la planta quede totalmente fija **d)** Ubicación de la planta en Invernadero

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Las cápsulas maduras obtenidas de la polinización natural y cruzada, se realizó en algunas especies, con la finalidad de determinar el tiempo de maduración de la cápsulas. Estas fueron cosechadas (Gráfico 28), dentro del invernadero entre los meses de abril y julio del año 2012. El criterio utilizado para diferenciar las cápsulas maduras de las inmaduras, fue la transición de color verde a verde-amarillo y dureza al presionar, metodología descrita por Kitsaki y otros, (2004).

Gráfico 28. Cosecha de cápsulas de orquídeas en invernadero

Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Las cápsulas en el invernadero se envolvieron en papel reciclado (Anexo 7), rotuladas con las siguientes características: número de cápsula, código, lugar de recolección, fecha de recolección, características de la planta y de la flor (Gráfico 29). Luego de esto se llevaron las cápsulas hacia el laboratorio del CIVABI (Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad) de la Universidad Politécnica Salesiana en Quito, para el transporte fueron puestas en cartón con sobres de sílica gel para reducir la humedad.

Gráfico 29. Cápsulas listas para empacarse y trasladarse al laboratorio

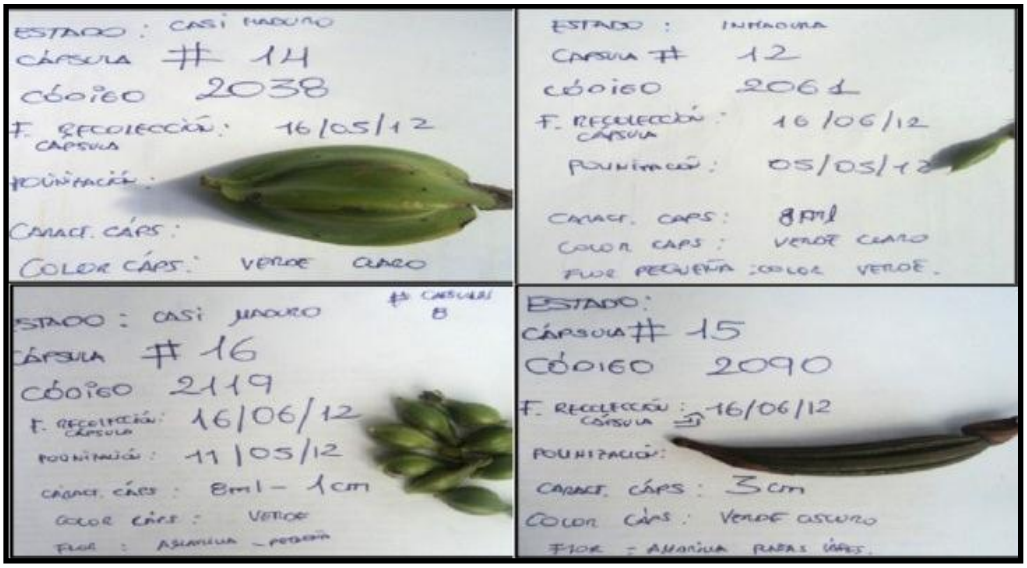


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

3.2 Almacenamiento de semillas en el Banco de germoplasma de la Universidad Politécnica Salesiana y determinación de viabilidad

3.2.1 Almacenamiento de semillas de las cápsulas cosechadas en el invernadero

Materiales: servilletas estériles, pinzas largas, mango y bisturí No. 4, pipetas volumétricas, papel aluminio, jeringuilla, frascos de vidrio, lápiz, cajas petri de vidrio, papel toalla, fósforos, tubos de ensayo, *rollopac*. ***Equipos:*** cámara de flujo laminar, refrigerador, balanza analítica, microscopio con cámara marca Micros®, campana de desecación, cámara marca Nikon Coolpix P500 12.1 MP 36X Optical Zoom. ***Reactivos:*** Agua destilada estéril, hipoclorito de sodio 3%, alcohol 70% y 96%.

Procedimiento: al receptar las cápsulas cerradas desde el invernadero, en el laboratorio (Anexo 8) recibieron limpieza y desinfección a través de varios lavados con hipoclorito de sodio al 3% por cinco minutos y varios enjuagues con agua destilada estéril. En la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, se rociaron las cápsulas con alcohol 70% (Gráfico 30), y se flamearon en el mechero por un minuto (Mayo y otros, 2010).

El procedimiento se realizó en cámara, sobre servilletas y con bisturí esterilizado, se realizaron varios cortes en las ranuras de las cápsulas, con desinfección constante de las herramientas en alcohol 70%, luego se rasparon delicadamente las semillas para extraerlas y colocarlas en tubos de ensayo para el proceso de secado.

El proceso de secado se realizó por dos días en la campana de desecación con sílica gel. Luego de esto, se tomó una porción de semillas y fueron observadas al microscopio, se realizó el pesaje, el cálculo del número de semillas en un miligramo y se determinó varias características morfológicas como dimensiones de área, largo y ancho.

Gráfico 30. Proceso de Desecación de semillas. **a)** Corte de Cápsulas. **b)** Desinfección de cápsulas **c)** Extracción y colocación de semillas en tubos **d)** Secado de semillas

Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Las semillas desecadas, fueron colocadas en tubos estériles *vacuntainers*, con los respectivos datos de pasaporte, término usado en los Bancos de germoplasma para describir la etiqueta de los contenedores de semillas. Los datos de pasaporte utilizados fueron: código del individuo, lugar de recolección, fecha de recolección y nombre del proyecto al que van destinadas. El proceso se realizó en la cámara de flujo laminar para evitar la diseminación de semillas al ambiente.

Una vez almacenadas las semillas en los tubos *vacuntainers*, se utilizó una bomba manual para extraer el aire y luego se almacenaron en dos lugares distintos, según lo planificado: 1) sobre una plancha de espuma flex a temperatura ambiente 20 ± 2 ºC más luz, y 2) en un frasco de vidrio dentro del refrigerador 4°C, en ausencia de luz, durante ocho semanas (Gráfico 31).

Gráfico 31. Semillas almacenadas: **a)** a 4°C en oscuridad y **b)** en temperatura ambiente 20 ± 2 ºC con luz

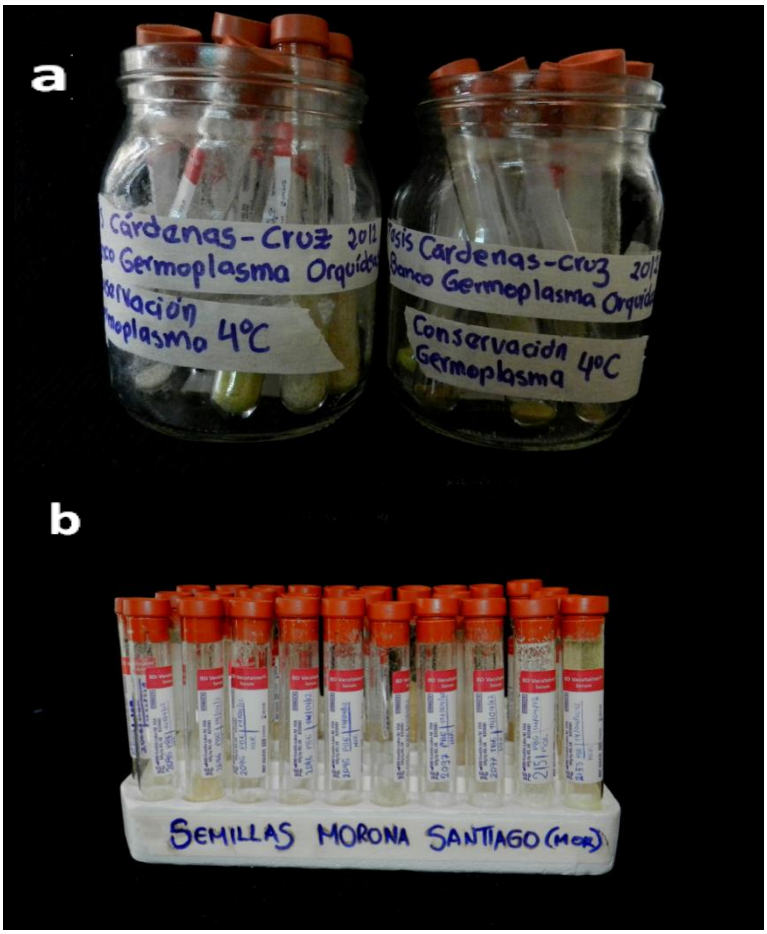


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

El comportamiento de las semillas almacenadas, fue registrado continuamente en el cuaderno de trabajo de laboratorio, para determinar cambios de coloración y otras anomalías morfológicas. En la Tabla 3, se muestra las variables que se realizó para la medición a través, del microscopio con cámara, se consideró: longitud, ancho, área y peso de las semillas almacenadas.

Tabla 3. Formulario de evaluación de características de las semillas almacenadas

No	Código	Fecha de recolección	Longitud promedio	Ancho promedio	Área Promedio	Peso almacenado	Almacenadas a 4º C en oscuridad	Almacenadas a temperatura ambiente 20º C ± 2º C + luz

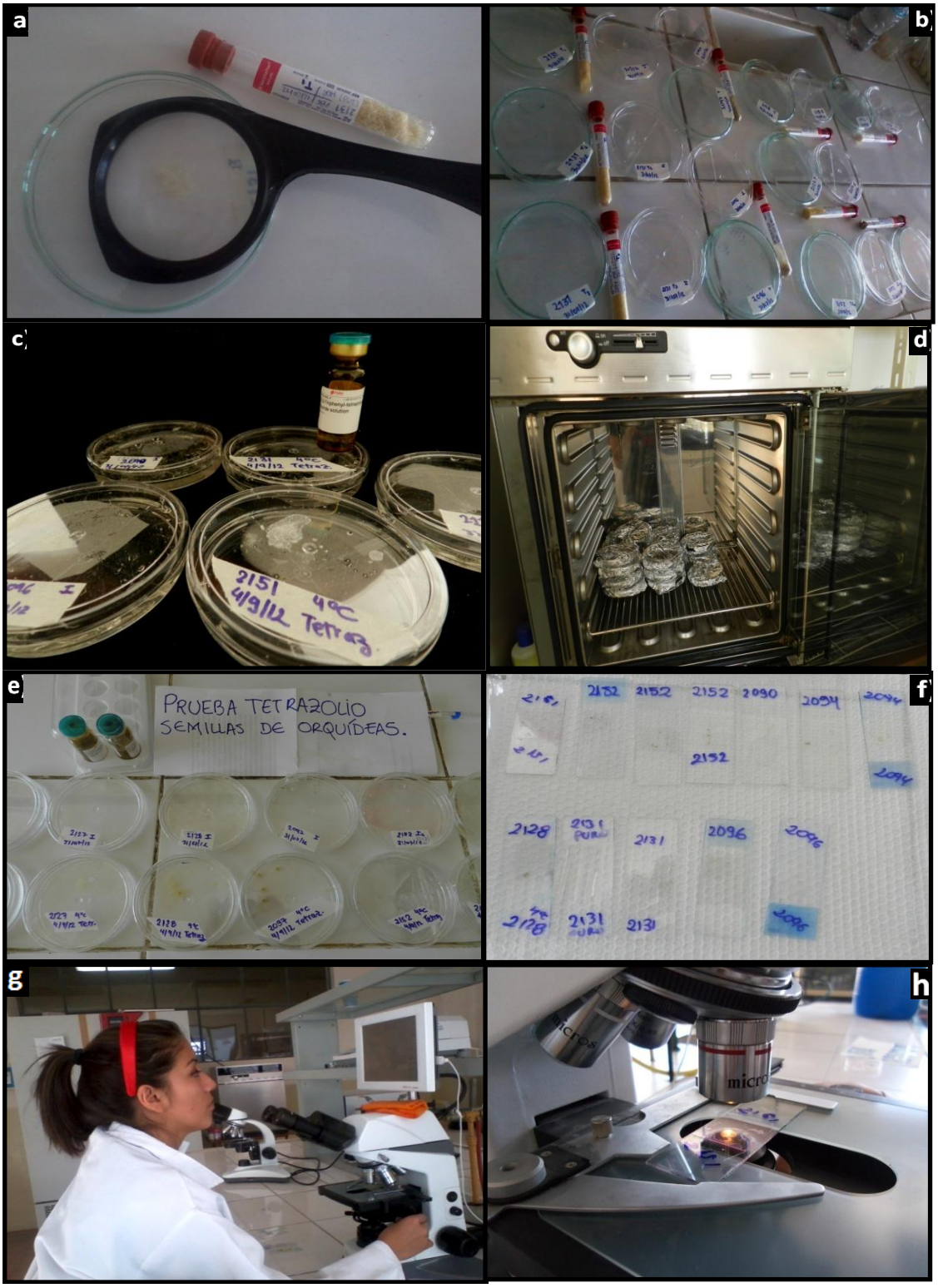
Fuente: Cárdenas y Cruz, 2012.

3.2.2 Determinación de viabilidad de semillas después del almacenamiento

Materiales: mango-bisturí No.4, lupa, papel aluminio, jeringuilla, cajas petri plásticas, cajas petri de vidrio, porta-objetos, cubre- objetos**,** vaso de precipitación, marcador azul, papel toalla, papel filtro, micropipeta, recipientes de vidrio. ***Equipos:*** incubadora, microscopio con cámara marca Micros®, balanza analítica, cámara marca Nikon Coolpix P500 12.1 MP 36X Optical Zoom. ***Reactivos:*** solución de Tetrazolio 1% (4°C), solución de sacarosa 10%, agua destilada.

Procedimiento: en septiembre de 2012, a las semillas almacenadas en diferentes condiciones ambientales, se les determinó viabilidad a través de la Prueba de Tetrazolio [2, 3, 5- cloruro trifenil tetrazolio (CTT)]; para lo cual, se realizó un pre-acondicionamiento de las semillas sumergiéndolas en agua destilada durante 24 horas (embibición) a temperatura ambiente. Se colocó 2 ml de solución de sacarosa al 10% en cada caja petri de plástico durante 12 horas a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, el exceso de la solución fue absorbido con papel filtro y con una micropipeta. Luego, en condiciones de oscuridad, se agregó 1 ml de solución de CTT al 1% (1g en 100 ml de buffer fosfato, pH 6.5) a aproximadamente 150 semillas de orquídeas (1 mg) en cada caja petri plástica; se sumergió a baño de agua a 40 ^{o}C. Se dejó en la incubadora por 36 - 48 horas a 25°C (Gráfico 32), envueltos con papel aluminio y en total oscuridad. Se prepararon placas para observar los resultados en el microscopio. Para realizar el conteo de semillas viables, se colocó sobre un portaobjeto una muestra de semillas tomada de las cajas petri con la ayuda de un bisturí; se colocó un cubreobjetos cuadriculado a mano con un marcador permanente. El aumento utilizado fue de 10x y 40x. Se hicieron dos repeticiones del proceso de viabilidad por código, una repetición para las semillas almacenadas en el refrigerador y otra para las que estaban a temperatura ambiente con luz. Al final, se examinaron en el microscopio y se determinó como reaccionaron de viabilidad, positiva: color rojo y negativa: color blanco esta técnica fue adaptada en base a Lallana y García (2010), Ossenbach y otros (2007 b). Las semillas viables se tiñen de rojo, debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células. Esta prueba está aceptada por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA, por sus siglas en inglés) (ISTA, 2006).

Gráfico 32. Procedimiento para realizar el Test de Tetrazolio. **a)** Conteo de semillas de orquídeas de tubos almacenados **b)** Imbibición de semillas y solución de sacarosa al 1% **c)** Homogenización de Tetrazolio **d)** Incubación de semillas **e)** Reacción de la prueba de tetrazolio **f)** Preparación de placas por código/semilla **g y h)** Observación en el microscopio, con cámara



Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

3.3 Determinación del medio óptimo para germinación in vitro

3.3.1 Preparación de cápsulas obtenidas en invernadero

Materiales: pinzas, mango y bisturí No. 4. ***Reactivos:*** hipoclorito de sodio al 3%, Alcohol 70%. ***Equipos:*** Cámara de flujo laminar

Procedimiento: al obtener las cápsulas desde el invernadero, en el laboratorio se procedió a su recepción con el correspondiente registro. A continuación, recibieron limpieza y desinfección a través de varios lavados con hipoclorito de sodio 3% por cinco minutos y varios enjuagues con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, se rociaron las cápsulas con alcohol 70% y se flamearon en el mechero por un minuto, en el caso de cápsulas cerradas. La selección de cápsulas se hizo verificando su madurez: madura o falta madurar, se verificó estado: abierta o cerrada. Una vez limpio el material vegetal, se destinó las cápsulas hacia almacenamiento o siembra (según su estado: madura o inmadura), en el caso de estar inmaduras se colocaron en un lugar donde puedan madurarse, mientras que las cápsulas maduras estaban listas para la siembra *in vitro.*

3.3.2 Preparación de Medios de Cultivo

Materiales: servilletas estériles, pinzas, mango y bisturí No. 4, pipetas volumétricas, papel aluminio, jeringuilla, frascos de vidrio, tubos de ensayo, lápiz, papel filtro, papel toalla, fósforos, espátula, *rollopac*, matraz, etiquetas. ***Equipos:*** cámara de flujo laminar, cámara de incubación para germinación, refrigeradora, autoclave, estufa, plancha para calentamiento, balanza analítica. ***Reactivos:*** hipoclorito de sodio 3%, alcohol 70% y 96%, agua destilada estéril, agua oxigenada, solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1%, solución de ácido clorhídrico (HCl) 1%, soluciones Stocks (I–V) para Murashige&Skoog (M&S), Vitaminas, Knudson Comercial (Knudson C), 2,4D (auxinas), agar, carbón activado (CA) y sacarosa.

Procedimiento: la unidad experimental que se utilizó en esta fase, estuvo conformada por tubos de ensayo de borosilicato (Pyrex®) de 18mm de ancho y 150mm de largo, y la forma del medio sólido para el cultivo *in vitro*. Se evaluaron los siguientes tratamientos: Murashige&Skoog (T1), Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2), Murashige&Skoog + 2,4D (T3), Murashige&Skoog + 1% carbón activado (T4) y Knudson C (T5).

***Preparación de T1* [(M&S)]:** los componentes de las soluciones stocks necesarias para preparar 1000 ml de medio de cultivo M&S, fueron: Stock I: 1650 $mg.l^{-1}$ de Nitrato de amonio (NH_4NO_3) y 1900 $mg.l^{-1}$ de Nitrato de Potasio (KNO_3); Stock II: 180,7 $mg.l^{-1}$ de Sulfato de Magnesio ($Mg\ SO_4$), 16,9 $mg.l^{-1}$ de Sulfato de manganeso ($Mn\ SO_4$), 8,6 $mg.l^{-1}$ de Sulfato de zinc ($ZnSO_4$), 0,025 $mg.l^{-1}$ de Sulfato cúprico ($Cu\ SO_4$); del Stock III: 332,2 $mg.l^{-1}$ de Cloruro de Calcio ($Ca\ Cl_2$), 0,83 $mg.l^{-1}$ de Yoduro de Potasio (K I), 0,025 $mg.l^{-1}$ de Clorhidrato de Potasio ($Co\ Cl_2$); Stock IV: 170 $mg.l^{-1}$ de Fosfato ácido de Potasio ($K\ H_2\ PO_4$), 6,2 $mg.l^{-1}$ de Ácido Bórico ($H_3\ BO_{3n}$), 0,025 $mg.l^{-1}$ de Molibdato de Sodio (Na_2MoO_4); y Stock V: 27,8 $mg.l^{-1}$ de Sulfato Ferroso ($Fe\ SO_4$) y 37,26 $mg.l^{-1}$ de EDTA disódico (Na_2 EDTA) (Murashige y Skoog, 1962).

Tabla 4. Cantidad y composición de soluciones Stock para medio Murashigue & Skoog

STOCK/ 1000 ml	COMPONENTES	CANTIDAD mg/l
Stock I (20ml)	(Nitrato de amonio)NH_4NO_3	1650
	(Nitrato de Potasio)KNO_3	1900
Stock II (10ml)	(Sulfato de Magnesio) $Mg\ SO_4.\ 7H_2O$	180.7
	(Sulfato de manganeso) $Mn\ SO_4.\ H_2O$	16.9
	(Sulfato de zinc) $Zn\ SO_4.\ 7H_2O$	8.6
	(Sulfato cúprico) $Cu\ SO_4.\ 5H_2O$	0.025
Stock III (10ml)	(Cloruro de Calcio) $Ca\ Cl_2.\ 2H_2O$	332.2
	(Yoduro de Potasio) K I	0.83
	(Clorhidrato de Potasio) $Co\ Cl_2.\ 6H_20$	0.025
Stock IV (10ml)	(Fosfato ácido de Potasio)$K\ H_2\ PO_4$	170
	(Ácido Bórico) $H_3\ BO_{3n}$	6.2
	(Molibdato de Sodio) $Na_2MoO_4.\ 2H_2O$	0.025
Stock V (10ml)	(Sulfato Ferroso)$Fe\ SO_4.\ 7H_2O$	27.8
	(EDTA disódico) Na_2 EDTA	37,26

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

Se añadió 500 ml de agua destilada estéril a un matraz. Luego se agregó la soluciones Stock I, II, III, IV, V en las cantidades indicadas en la Tabla 4. Se agregó las vitaminas indicadas en la Tabla 5. Separadamente, se pesó 3000 $mg.l^{-1}$ de sacarosa, 800 $mg.l^{-1}$ de agar, se añadió al medio y se aforó con agua destilada hasta el volumen deseado (1000 ml). Con el pH-metro, se midió y ajustó el pH a 5,8 con una solución de NaOH 1% en caso de acidez o HCl 1% en caso de alcalinidad. Se colocó en la plancha de calentamiento hasta total disolución.

El medio de cultivo preparado se dispensó en los tubos de ensayo. El medio se gelificó con cierta pendiente de inclinación, los tubos de ensayo se cubrieron con tapa de aluminio y se envolvieron con plástico *rollopac*. Finalmente, los medios fueron auto-clavados a 121ºC y 1 ATM de presión por 20 minutos.

Tabla 5. Cantidad de vitaminas para preparar 1000 ml de medio M&S

VITAMINAS	Concentración	Cantidad
Ac. Nicotínico	50 $mg.l^{-1}$	5ml
Piridoxina	50 $mg.l^{-1}$	5ml
Tiamina	100 $mg.l^{-1}$	1ml
Glicina	200 $mg.l^{-1}$	20ml
Mioinositol	250 $mg.l^{-1}$	10ml

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

Preparación de T2 **[(M&S)+Vit]:** contiene M&S más cinco veces la concentración normal de vitaminas, es decir, se agregó: 250 $mg.l^{-1}$ de Ác. Nicotínico, 250 $mg.l^{-1}$ de Pirodoxina, 500 $mg.l^{-1}$ de Tiamina, 1000 $mg.l^{-1}$ de Glicina y 1250 $mg.l^{-1}$ de Mioinositol para 1 litro para el medio de cultivo.

Preparación de T3 **[(M&S)+2,4D]:** para este tratamiento se mantuvo como base el T1=M&S y se le adicionó 0,01 $mg.l^{-1}$ de 2,4-D auxinas (regulador de crecimiento artificial).

Preparación de T4 **[(M&S)+CA]:** este tratamiento consta de T1=M&S más carbón activado al 0,1% (1000 $mg.l^{-1}$).

Preparación de T5: en el caso de este tratamiento se usó el medio Knudson Comercial, por lo cual sólo fue necesario agregar los 800 $mg.l^{-1}$ de agar. Los componentes necesarios para preparar 1000 ml de medio de cultivo Knudson C, fueron: 250 $mg.l^{-1}$ de Sulfato de Magnesio ($Mg\ SO_4$), 250 $mg.l^{-1}$ de Fosfato ácido de Potasio ($K\ H_2\ PO_4$), 500 $mg.l^{-1}$ de Sulfato de amonio ($(NH_4)_2\ SO_4$,) 1000 $mg.l^{-1}$ de Nitrato de Calcio ($Ca\ (NOH_3)$), 5,68 $mg.l^{-1}$ de Sulfato de manganeso ($Mn\ SO_4$), y 25 $mg.l^{-1}$ Sulfato Ferroso ($Fe\ SO_4$) (Knudson, 1946).

Desinfección de cápsulas: el método que se usó fue el de Mayo y otros (2010), el cual adopta la siguiente secuencia: lavar la cápsula con etanol 70% por un minuto, desinfectar la cápsula con hipoclorito de sodio 2,5% por cinco minutos, sumergir nuevamente en alcohol 70% por 30 segundos y flamear hasta que el alcohol se queme (repetir 1 a 3 veces). Todo el proceso se efectuó dentro de la cámara de flujo laminar.

Siembra Directa in vitro: posterior a la desinfección se realizó uno o dos cortes longitudinales para abrir la cápsula con bisturí, se recomienda no introducir demasiado. Con una espátula se golpeó para esparcir las semillas estériles sobre el medio de cultivo. A continuación, se fijaron las semillas con un bisturí totalmente estéril, agregando unas gotas de agua oxigenada y agua destilada estéril. Finalmente cerca del mechero, se cubrió con papel aluminio, se selló con *rollopac* y se etiquetó. Se sembró 16 códigos de semillas de orquídeas para los ensayos en los respetivos tratamientos a elabora, por duplicado, con aproximadamente 0,05 mg de semillas en cada tubo de ensayo. El protocolo seguido fue el método de *"*siembra directa*"* para germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres, descrito por Mayo y otros (2010).

Incubación: inmediatamente los tubos sembrados fueron incubados bajo condiciones ambientales controladas en la cámara de incubación, se utilizaron lámparas con luz blanca, bajo 16 horas luz y 8 de oscuridad, a 20 ± 2 ºC y 50% - 60% de humedad ambiental relativa.

3.3.3 Evaluación del porcentaje de germinación de las semillas en estudio

La evaluación se realizó desde el mes de abril hasta septiembre, mediante las fases de desarrollo de orquídeas descritas por Seaton (2000). Los resultados fueron evaluados de acuerdo a las siguientes variables cualitativas: Turgencia (TUR), Color (COL), Fenolización (FEN), Contaminación (CON), Estado de la semilla (ESEM) expresados en la Tabla 6. Por otro lado, se diseño una ficha de evaluación de tubos contaminados, germinados y tubos sin actividad, proveyéndonos un porcentaje referencial (Tabla 7).

Tabla 6. Formulario de control de variables del proceso de germinación

Fecha Siembra	Repetición	Código	Tratamiento	TUR			COL						FEN		CON		ESEM		
				0	1	2	0	1	2	3	4	5	1	2	1	2	0	1	2

Fuente: Cuaderno de Laboratorio

Tabla 7. Ficha de evaluación de tratamientos aplicados en germinación *in vitro*

	Tubos Contaminados	Tubos Germinados	Tubos sin actividad	TOTAL
Porcentaje				

Fuente: Cuaderno de Laboratorio.

En el procesamiento de datos, se utilizó el software Infostat® 2008, un programa para análisis estadísticos de aplicación general. Para esto, las variables cualitativas evaluadas visualmente se transformaron a cuantitativas a través de escalas numéricas y el uso de una carta de colores (Anexo 3) (Gráfico 33).

Gráfico 33. Escalas numéricas para evaluación de variables

Escala color	
0	Blanco
1	Crema
2	Amarillo
3	Amarillo verdoso
4	Verde suave
5	Verde fuerte

Escala turgencia	
0	< 0 mm
1	0 - 1 mm
2	1 - 2 mm

Estado de la Semilla	
2	Madura
1	Madura/Inmadura
0	Inmadura

Fuente: Cuaderno de Laboratorio.

4. RESULTADOS

COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

Las siguientes fueron las hipótesis aceptadas en el presente trabajo:

Del Objetivo 1: recolectar, identificar y conservar en invernadero orquídeas de las zonas Copal, Tres Ranchos y La Delicia del Cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago.

Para el primer objetivo, se acepta la ***Hipótesis Central (H_{i1}):*** el proceso de recolección, identificación y conservación de orquídeas en invernadero, es un procedimiento óptimo de conservación *ex situ.*

Del Objetivo 2: almacenar las semillas en el banco de germoplasma de la Universidad Politécnica Salesiana, y determinar su viabilidad.

Para el segundo objetivo, se acepta la ***Hipótesis Central (H_{i2}):*** el protocolo de almacenamiento de semillas en *vacuntainers* a 4°C en oscuridad, es un método óptimo de conservación de germoplasma de las orquídeas en estudio.

Del Objetivo 3: determinar un medio óptimo de germinación *in vitro* para las semillas de las orquídeas en investigación.

Para el tercer objetivo, se acepta la ***Hipótesis Central (H_{i3}):*** se puede determinar un medio óptimo de germinación *in vitro* para las semillas de las orquídeas en investigación, con un porcentaje de germinación mayor al 60%.

4.1 Recolección, identificación y conservación en invernadero de orquídeas de los sectores: Copal, Tres Ranchos y La Delicia del Cantón Santiago de Méndez

4.1.1 Recolección de orquídeas en el Cantón Santiago de Méndez

Se recolectaron en campo 50 especies diferentes de orquídeas con y sin cápsulas, pertenecientes a 15 géneros de la familia *Orchidaceae*. Cada individuo fue codificado según la base de datos del Libro de Campo de Cerna (2012) (Tabla 8).

Tabla 8. Códigos de orquídeas recolectas e identificación

#	Código	Lugar	Especie	#	Código	Lugar	Especie
1	2036	Sector A	*Stelis sp.***	26	2046	Sector C	*Prosthechea vespa***
2	2038	Sector A	*Prosthechea sp* **	27	2071	Sector C	*Masdevallia sp.* **
3	2040	Sector A	*Maxillaria sp* **	28	2073	Sector C	*Pleurothallis sp.* **
4	2041	Sector A	*Sobralia sp.***	29	2074	Sector C	Morfoespecie*
5	2042	Sector A	*Huntleya sp.***	30	2076	Sector C	Morfoespecie*
6	2045	Sector A	*Elleanthus sp.***	31	2081	Sector C	Morfoespecie*
7	2048	Sector B	Morfoespecie *	32	2083	Sector C	Morfoespecie*
8	2054	Sector B	*Pleurothallis sp***	33	2084	Sector C	*Mormodes sp.***
9	2055	Sector B	*Maxillaria splendens***	34	2086	Sector C	*Lycaste sp.* **
10	2056	Sector B	Morfoespecie*	35	2087	Sector C	Morfoespecie*
11	2061	Sector B	Morfoespecie*	36	2088	Sector C	Morfoespecie*
12	2062	Sector B	*Maxillaria sp***	37	2090	Sector C	*Maxillaria rufescens***
13	2096	Sector B	*Epidendrum nocturna***	38	2091	Sector C	*Maxillaria sp.***
14	2063	Sector C	*Maxillaria sp.***	39	2093	Sector C	*Mormodes sp.* **
15	2066	Sector C	*Brassia arcuigera***	40	2094	Sector C	*Epidendrum sp.***
16	2067	Sector C	*Stelis sp.***	41	2116	Sector C	*Pleurothallis sp.***
17	2097	Sector C	*Epidendrum sp.***	42	2118	Sector C	Morfoespecie*
18	2098	Sector C	*Maxillaria sp.***	43	2119	Sector C	Morfoespecie*
19	2103	Sector C	*Cyclopogon sp.***	44	2122	Sector C	Morfoespecie*
20	2104	Sector C	*Maxillaria sp.* **	45	2153	Sector C	Morfoespecie*
21	2106	Sector C	*Huntleya sp.***	46	2127	Sector C	*Rodriguezia batemanii***
22	2107	Sector C	*Epidendrum sp.***	47	2128	Sector C	*Rodriguezia sp.***
23	2108	Sector C	*Maxillaria sp.***	48	2131	Sector C	*Sobralia rosea***
24	2113	Sector C	*Epidendrum sp.***	49	2151	Sector C	*Sievekingia marsupialis**** **NT**
25	2117	Sector C	*Stelis sp.***	50	2152	Sector C	*Maxillaria aff. Guareimensis***

Fuente: Registro trabajo del Invernadero.

NT Casi Amenazada (UICN) * No identificada
** Orquídea Nativa *** Orquídea Endémica

Interpretación: se determinó que la mayor cantidad de orquídeas recolectadas pertenecieron al Sector C - La Delicia con 37 individuos, equivalente al 74%; seguido del Sector B - Tres Ranchos con 7 individuos, que equivalen al 14%, y finalmente el Sector A – Copal, con 6 individuos que corresponden al 12% del total recolectado.

4.1.2 Identificación de las orquídeas recolectadas

Del 74% de orquídeas recolectadas fueron identificadas visualmente; 10% reconocidas en campo y 64% identificadas bibliográficamente (Tabla 9) (Gráfico 35-42). Las especies identificadas por género y epíteto fueron ocho, y se citan a continuación: *Maxillaria splendens, M. rufescens, M. aff. guareimensis, Epidendrum nocturna, Brassia arcuigera, Sobralia rosea, Sievekingia marsupialis* y *Prosthechea vespa*, las mismas que no están descritas en la Lista de Orquídeas Endémicas de Morona Santiago (Anexo 5), posiblemente esto se deba a que a pesar de ser especies nativas de la zona, no son propias de la misma. De los 29 individuos que se identificaron sólo por el género, se desconoce su estado actual de conservación. Y las 13 morfoespecies restantes no han sido identificadas (26% de individuos), esto se debe a la falta de floración. En el caso particular de *Sievekingia marsupialis* (Gráfico 34), sí es una especie endémica, ya que se encuentra descrita en la Lista de Orquídeas Endémicas de Morona Santiago, catalogada como Casi Amenazada (NT), en la clasificación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), y además, no está confirmada dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP).

Gráfico 34. *Sievekingia marsupialis*, en campo.

Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

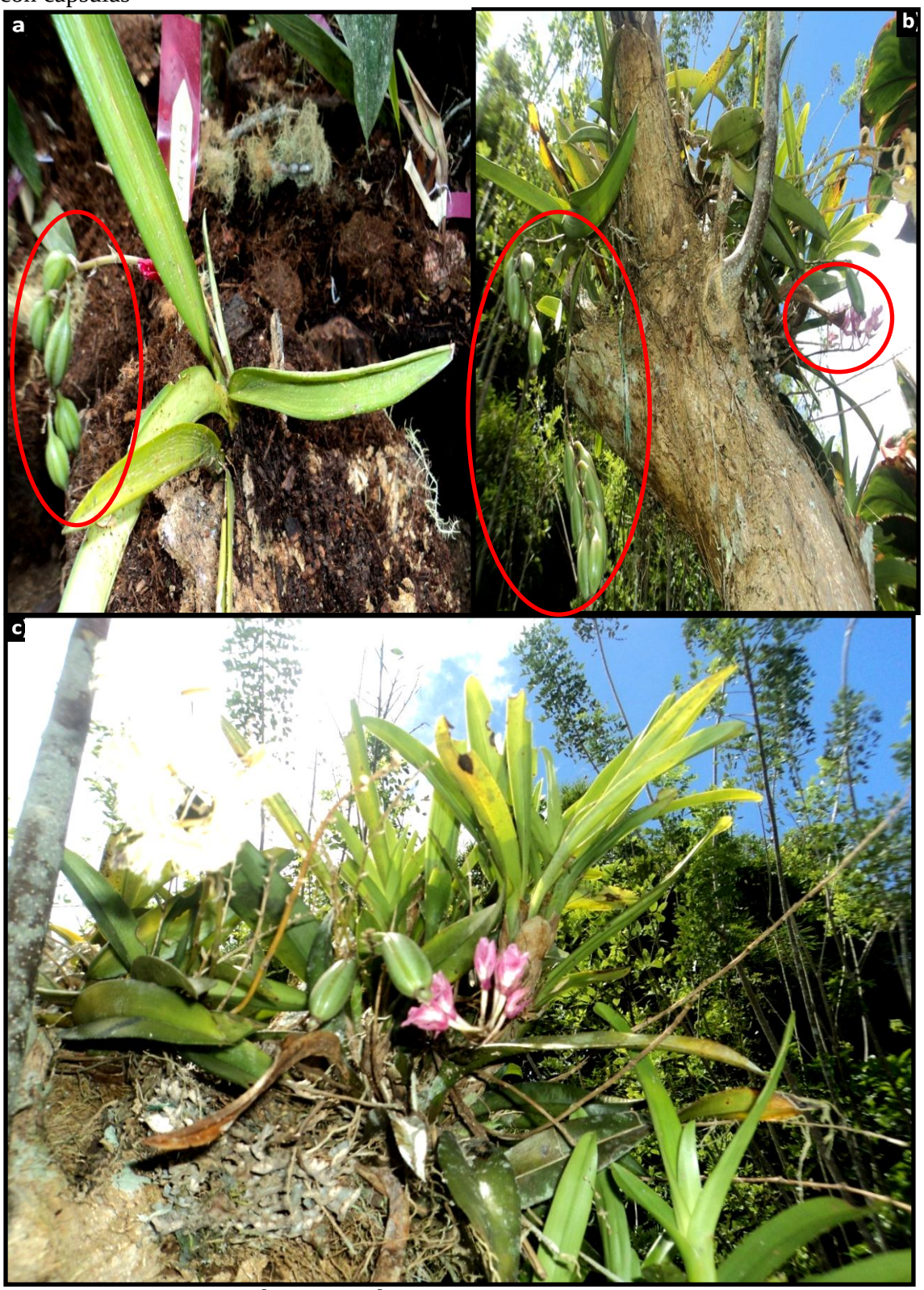
Gráfico 35. Identificación de *Sievekingia marsupialis* **a)** *In situ,* con cápsula **b)** Abertura de cápsula en la cámara de flujo **c)** Floración en Invernadero

Fuente *in situ*: La Delicia (2°44'46''S 78°19'06.31''O).
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Gráfico 36. Identificación *Sobralia rosea* **a)** Cápsulas cosechadas **b)** Abertura de cápsula en la cámara de flujo **c)** En Floración *in situ*

Fuente *in situ*: La Delicia (2°44'46''S 78°19'06.31''O).
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Gráfico 37. Identificación *Rodriguezia sp.* **a)** En Invernadero **b y c)** En Floración, *in situ* con cápsulas



Fuente *in situ*: La Delicia (2°44'46''S 78°19'06.31''O).
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Gráfico 38. Identificación *Prosthechea vespa* **a)** En Floración, con cápsula en Invernadero **b)** Corte de cápsula **c)** Descripción cápsula cosechada

Fuente *in situ*: Copal (2°40’57.61’’ S78°24’00.14’’ O).
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Gráfico 39. Identificación *Maxillaria rufescens*

Fuente *in situ*: La Delicia (2°44'46''S 78°19'06.31''O).
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Gráfico 40. Identificación *Epidendrum sp.* **a)** En Invernadero **b)** con cápsulas

Fuente *in situ*: La Delicia (2°44'46''S 78°19'06.31''O).
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Gráfico 41. Identificación *Rodriguezia batemanii* **a)** En Floración, *in situ* **b)** Cápsulas cosechadas

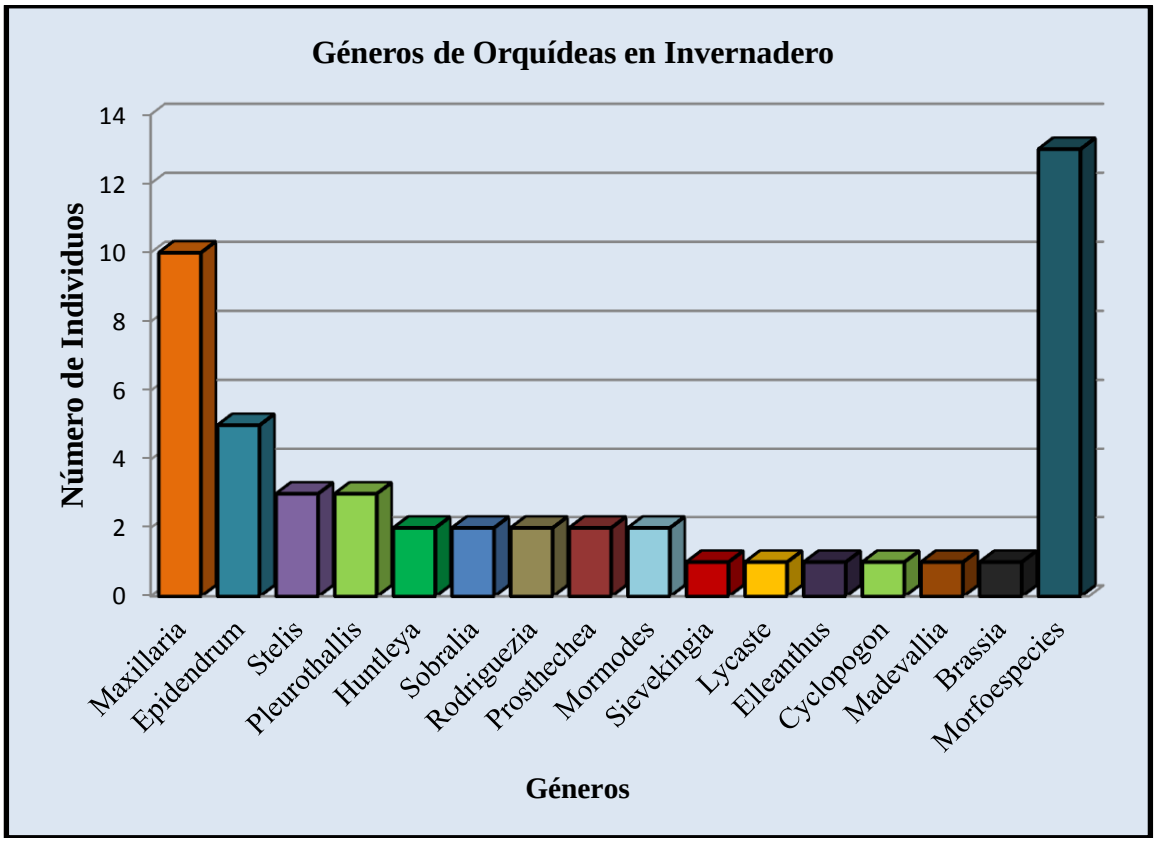
Fuente *in situ*: La Delicia (2°44'46''S 78°19'06.31''O).
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Gráfico 42. *Prosthechea vespa* **a)** En Floración, *in situ* **b)** Con cápsula en Invernadero

Fuente: Vía a la Delicia.
Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

En la Lista de Orquídeas Endémicas de Morona Santiago descritas en el Libro Rojo, se encuentran entre los géneros más abundantes los siguientes: *Masdevallia, Stelis, Lephantes, Pleurothallis y Epidendrum*. El Gráfico 43 indica los géneros encontrados:

Gráfico 43. Géneros de orquídeas presentes en invernadero



Fuente: Registro de trabajo en Invernadero.

Interpretación: se identificaron quince géneros de orquídeas en el invernadero. El género predominante, fue *Maxillaria* con 10 individuos (20%), seguido del género *Epidendrum* con 5 individuos (10%), *Stelis* 3 individuos (6%), *Pleurothallis* 3 individuos (6%), *Huntleya* 2 individuos (4%), *Sobralia* 2 individuos (4%), *Rodriguezia* 2 individuos (4%), *Prosthechea* 2 individuos (4%), *Mormodes* 2 individuos (4%), *Sievekingia* 1 individuo (2%), *Lycaste* 1 individuo (2%), *Elleanthus* 1 individuo (2%), *Cyclopogon* 1 individuo (2%), *Masdevallia* 1 individuo (2%), *Brassia* 1 individuo (2%) y finalmente 13 Morfoespecies (26%), que no pudieron ser identificadas por falta de floración (Gráfico 43).

4.1.3 Conservación de orquídeas en invernadero

En el lapso de cuatro meses de experimentación en invernadero, del total de orquídeas recolectadas (50), se cosecharon 16 individuos con cápsulas maduras (Tabla 9). La mayor cosecha de cápsulas, se realizó entre los meses de abril y junio de 2012.

Tabla 9. Cápsulas obtenidas en campo vs. Cosechadas en invernadero

	FRECUENCIA	
SECTOR	**Cápsulas Obtenidas**	**Cápsulas Cosechadas**
Sector A (Copal)	6	2
Sector B (Tres Ranchos)	7	1
Sector C (La Delicia)	37	13
TOTAL	**50**	**16 (32%)**

Fuente: Registro de trabajo en Invernadero.

Interpretación: el 32% de orquídeas fructificaron en el lapso planificado para la experimentación en invernadero. El 68% restante, no dio cápsulas en tal lapso, sin embargo; actualmente, siguen desarrollándose, debido a que aún no completan su total maduración. Del Sector–A, se cosecharon las cápsulas de los siguientes códigos: 2154 y 2038. Del Sector–B: 2096 y del Sector-C, las cápsulas de los códigos: 2046, 2066, 2090, 2094, 2097, 2113, 2127, 2128, 2131, 2151, 2152, 2119 y 2153.

Tabla 10. Tiempo de maduración de cápsulas en invernadero

Especie con polinización cruzada	Tiempo de maduración de las cápsulas en Invernadero	Color de cápsula madura
Prosthechea vespa	18-20 semanas	Verde claro
Sobralia rosea	13-16 semanas	Verde claro amarillo con líneas longitudinales cafés
Maxillaria guareimensis	14-16 semanas	Verde claro
Brassia arcuigera	16-19 semanas	Verde claro a amarillo
Maxillaria rufescens	15-18 semanas	Marrón

Fuente: Registro de trabajo en Invernadero.

Interpretación: se recopiló información del tiempo de maduración de cápsulas de cinco especies: *P. vespa*, *S. rosea*, *M. guareimensis*, *B.arcuigera* y *M. rufescens* (Tabla 10). Al igual, se identificó el color de cápsula en función a la Carta de Colores (Anexo 3) para determinar su etapa madura.

4.2 Almacenamiento de las semillas en el Banco de germoplasma y, determinación de su viabilidad

4.2.1 Almacenamiento de semillas en el Banco de germoplasma

Se almacenaron las semillas de 12 especies de orquídeas (Tabla 11). Mediante las pruebas de almacenamiento, se demostró que las mejores condiciones para depositar semillas de las orquídeas en estudio, en un banco de germoplasma, son: en *vacuntainers*, a temperatura de 4°C, en oscuridad y con 6 - 10% de Humedad Relativa (HR).

Tabla 11. Características de las semillas almacenadas en el Banco de germoplasma

No.	Código	Fecha Recolección	Longitud promedio	Ancho promedio	Área promedio	Peso almacenado
1	2151	06/04/2012	0,656 mm	0,706 mm	0,4305 mm^2	0,0423 g
2	2127	06/04/2012	5,238 mm	0,684 mm	3,4125 mm^2	0,4776 g
3	2128	06/04/2012	4,235 mm	0,487 mm	2,3406 mm^2	0,2021 g
4	2131	23/07/2012	6,869 mm	1,456 mm	6,6879 mm^2	0,1092 g
5	2152	06/04/2012	4,458 mm	0,627 mm	2,5828 mm^2	0,1147 g
6	2097	11/05/2012	6,908 mm	1,986 mm	8,7404 mm^2	0,0777 g
7	2096	11/05/2012	4,791 mm	0,704 mm	4,0563 mm^2	0,0427 g
8	2153	16/06/2012	3,322 mm	0,450 mm	1,4907 mm^2	0,0346 g
9	2113	16/06/2012	1,113 mm	0,197 mm	0,0221 mm^2	0,1201 g
10	2094	11/05/2012	2,425 mm	0,701 mm	1,4373 mm^2	0,0432 g
11	2090	11/05/2012	3,258 mm	0,371 mm	2,8161 mm^2	0,0871 g
12	2046	16/06/2012	5,221 mm	0,662 mm	3,4525 mm^2	0,0379 g
	PROMEDIO	-	4,0411 mm	0,7525 mm	3,1224 mm^2	0,1157 g

Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

Interpretación: el promedio del peso de semillas almacenadas en *vacuntainers*, fue de 0,1157g. El valor más alto de área medido en semillas de orquídeas, fue del código 2097 con 8,7404 mm^2; seguido del código 2131 con un área promedio de 6,6879 mm^2, siendo en efecto, las semillas más grandes (Tabla 12). Las semillas más pequeñas, las de áreas menores, son: 2113 con 0,0221 mm^2 y 2152 con 2,5828 mm^2.

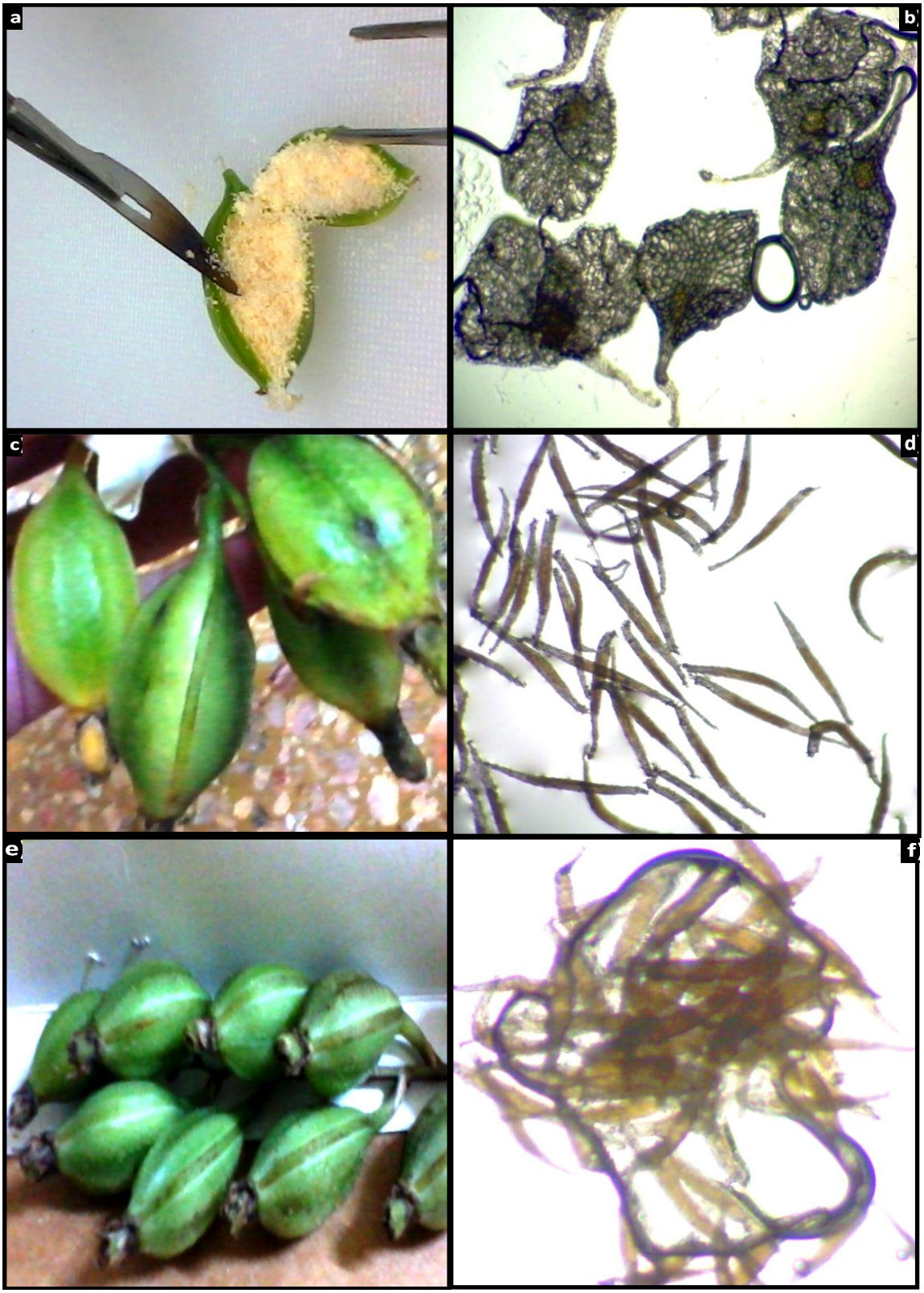
Con esta información y con los respectivos datos de pasaporte de cada especie, se establecieron en el "Banco de germoplasma de orquídeas endémicas del Ecuador, Fase 1", un total de doce individuos de orquídeas de Morona Santiago (MOR) (Gráfico 44).

Gráfico 44. Semillas almacenadas en *vacuntainers*, con sus datos de pasaporte. **a y b)** Tubos con semillas de las zonas de estudio, del Cantón Santiago

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

A continuación, se muestran las fotografías de diez de los doce códigos de semillas almacenadas en el banco de germoplasma, observadas en su cápsula y al microscopio (40X) (Gráfico 45, 46 y 47).

Gráfico 45. Fotografías de cápsulas y observación microscópica. **a y b)** 2151 *Sievekingia marsupialis* **c y d)** 2127 *Rodriguezia batemanii* **e y f)** 2128 *Rodriguezia sp.*

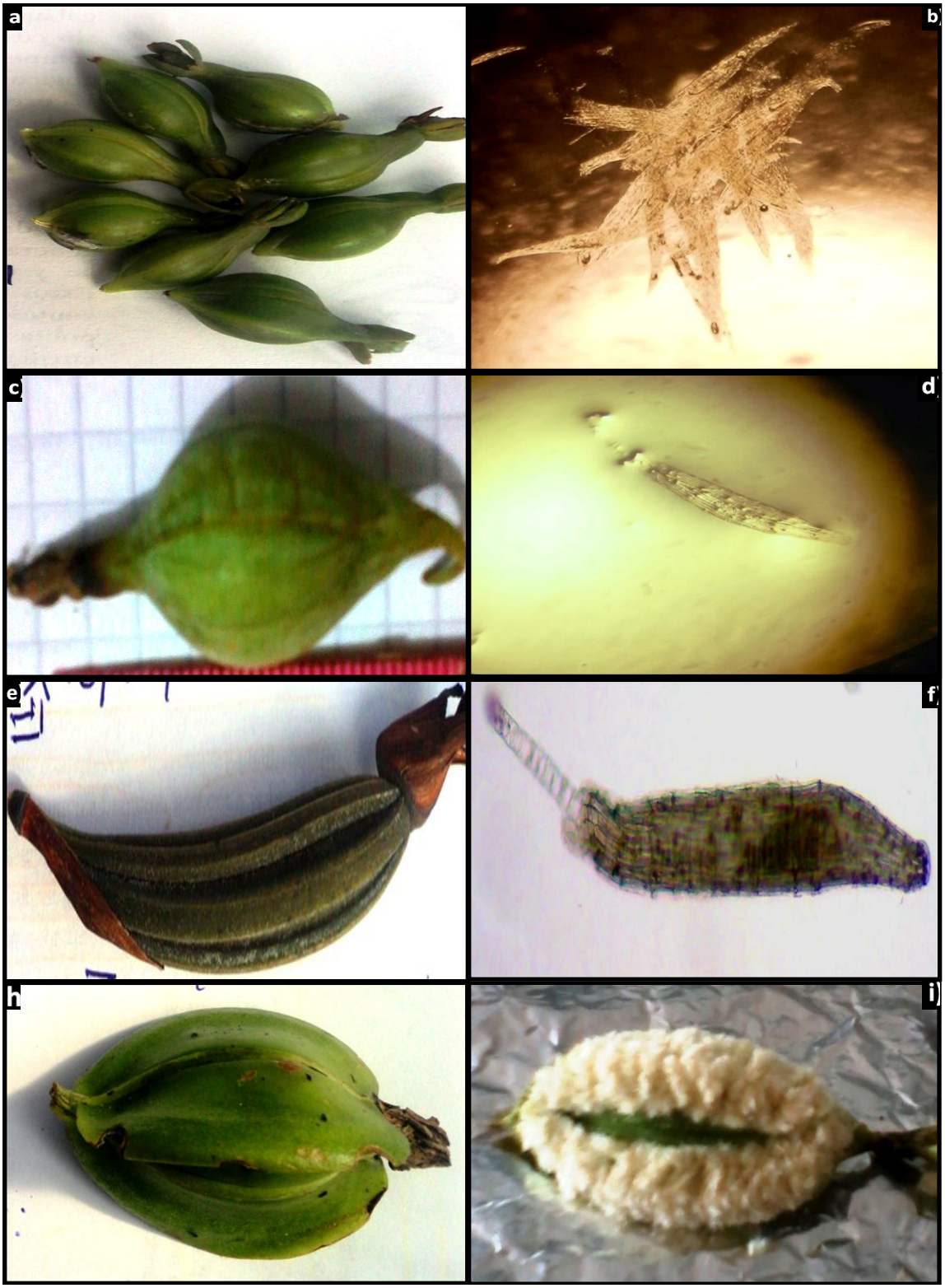


Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Gráfico 46. Fotografías de cápsulas y observación microscópica. **a y b)** 2131 *Sobralia rosea* **c y d)** 2152 *Maxillaria aff. guareimensis* **e y f)** 2097 *Epidendrum sp*.

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Gráfico 47. Fotografías de cápsulas y observación microscópica. **a y b)** 2113 *Epidendrum sp.* **c y d)** 2094 Epidendrum sp. **e y f)** 2090 *Maxillaria rufescens* **g)** 2046 Cápsula cerrada de *Prostechea vespa* y **h)** 2046 Cápsula abierta de *Prostechea vespa*

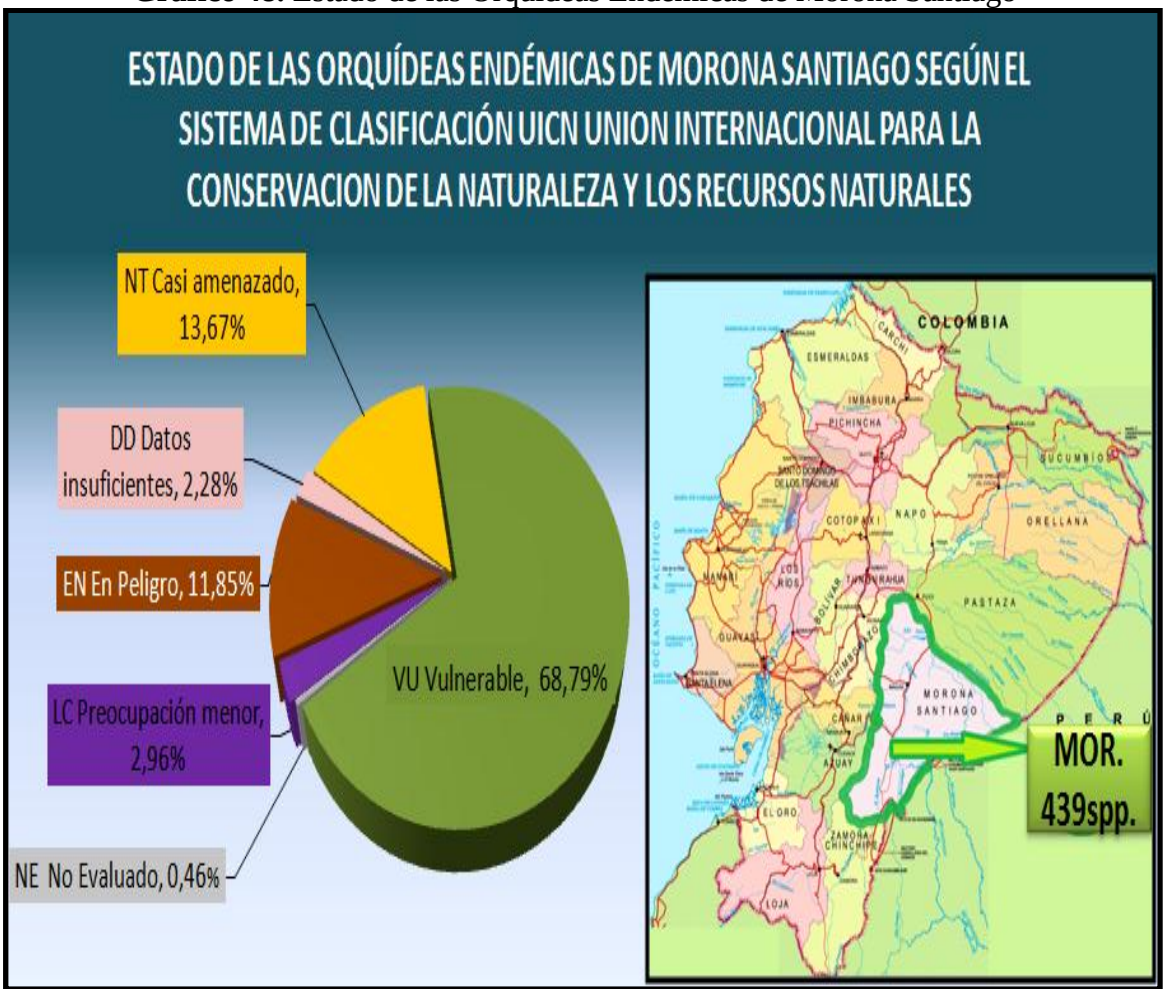


Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Por otro lado, de la investigación bibliográfica efectuada sobre el estado de conservación de las orquídeas endémicas de Morona Santiago, se determinó que, de las 439 *spp.* de orquídeas endémicas existentes: el 68,79% están catalogadas como vulnerables (301*spp.*) **(VU)**, el 13,67% (61*spp.*) están casi amenazadas **(NT)**, 11,85% (52*spp.*) se encuentra en peligro **(EN)**, 2,96% (13*spp.*) son de preocupación menor **(LC)**, mientras que el 2,28% (10*spp.*) poseen datos insuficientes **(DD)** y 0,46% (2*spp.*) no han sido evaluadas **(NE)** (Según la UICN) (Gráfico 48).

La gran mayoría de especies de la Lista de Orquídeas Endémicas de Morona Santiago, no están confirmadas en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP).

Gráfico 48. Estado de las Orquídeas Endémicas de Morona Santiago



Fuente: Endara y otros, 2011.

4.2.2 Determinación de viabilidad de las semillas almacenadas

De las dos condiciones de almacenamiento de semillas ensayadas en el laboratorio: 1) 4ºC+oscuridad y 2) a temperatura ambiente 20 ± 2 ºC, más luz.; se determinó su viabilidad mediante la prueba de tetrazolio, donde se consideró reacción positiva o semilla viable, la coloración roja intensa de las semillas; mientras que reacción negativa o semilla no viable, simplemente no coloreó. El cálculo fue realizado por especie y mediante conteo de las semillas en una cuadrícula bajo el microscopio (Tabla 12).

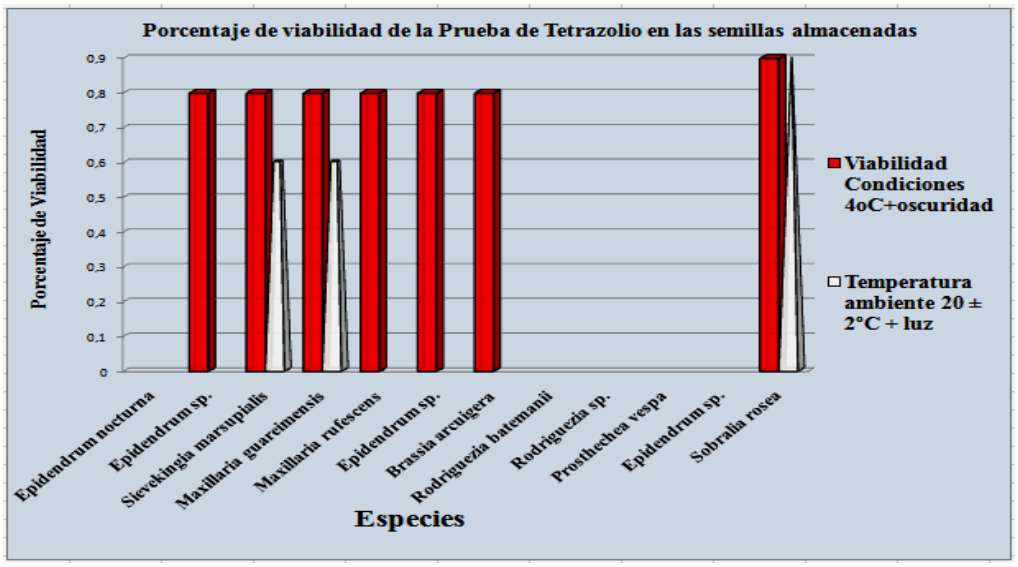
Tabla 12. Viabilidad de semillas almacenadas: a 4ºC+oscuridad vs. Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC, más luz.

Código	Especie	No. semillas en 1mg	Viabilidad condiciones 4ºC+ OSCURIDAD	Porcentaje % aprox. Viabilidad	Viabilidad condiciones NORMALES DE LABORATORIO	Porcentaje % aprox. Viabilidad
2131	*Sobralia rosea*	160	+	90%	+	90%
2096	*Epidendrum nocturna*	146	-	-	-	-
2097	*Epidendrum sp.*	155	+	80%	-	-
2151	*Sievekingia marsupialis*	165	+	80%	+	60%
2152	*Maxillaria guareimensis*	168	+	80%	+	60%
2090	*Maxillaria rufescens*	152	+	80%	-	-
2113	*Epidendrum sp.*	145	+	80%	-	-
2066	*Brassia arcuigera*	160	+	80%	-	-
2127	*Rodriguezia batemanii*	169	-	-	-	-
2128	*Rodriguezia sp.*	152	-	-	-	-
2046	*Prosthechea vespa*	150	-	-	-	-
2094	*Epidendrum sp.*	115	-	-	-	-
PROMEDIO	-	157,2		81,42%	-	70%

Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

Interpretación: en las condiciones de almacenamiento de semillas a 4°C y en oscuridad, el 58,33% de las especies, resultaron viables con la prueba de tetrazolio. El porcentaje de viabilidad más alto lo presentó la especie *Sobralia rosea* (2131) con el 90%, y el menor porcentaje de viabilidad correspondió a *Brassia arcuigera* (2066) con el 80%. Por otro lado, las semillas que fueron almacenadas a temperatura ambiente 20 ± 2 ºC, más luz, se mantiene con el 90% de viabilidad para *S. rosea* (2131), y el con el menor porcentaje en *Maxillaria guareimensis* (2090) con solo el 60%. La viabilidad promedio de las semillas almacenadas a 4°C y en oscuridad, fue del 81,42%, tomando en cuenta su significancia según Rao y otros (2007), quien describe viabilidad como: "La medida de cuántas semillas de un lote están vivas, y pueden llegar a convertirse en plantas capaces de reproducirse en condiciones adecuadas".

Gráfico 49. Porcentaje de viabilidad de semillas en la Prueba de Tetrazolio



Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

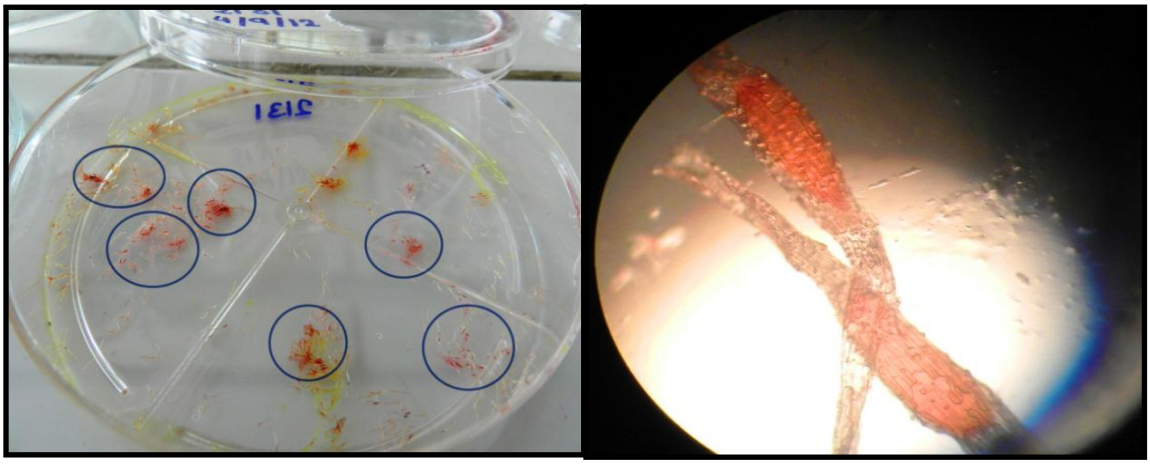
Interpretación: comparando resultados entre las condiciones de almacenamiento ensayadas, se puede apreciar que a temperatura ambiente 20 ± 2 ºC+luz, disminuye el porcentaje de semillas viables, del 58,33% de especies viables que hubo en condiciones de 4oC+oscuridad, tan sólo 25% resultaron viables a temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Por tanto, se considera método óptimo de almacenamiento, las condiciones de 4oC+oscuridad y con 6 - 10% de Humedad Relativa de semillas (HR) (Gráfico 49).

En las fotografías a continuación, se puede observar los resultados de la Prueba de Tetrazolio, mediante la observación microscópica (40X) de las semillas.

Condiciones: 4°C + oscuridad. Código 2131.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 50).

Gráfico 50. Positivo tetrazolio. *Sobralia rosea.* 4°C + oscuridad



Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Código 2131.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 51).

Gráfico 51. Positivo tetrazolio. *S. rosea.* Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz

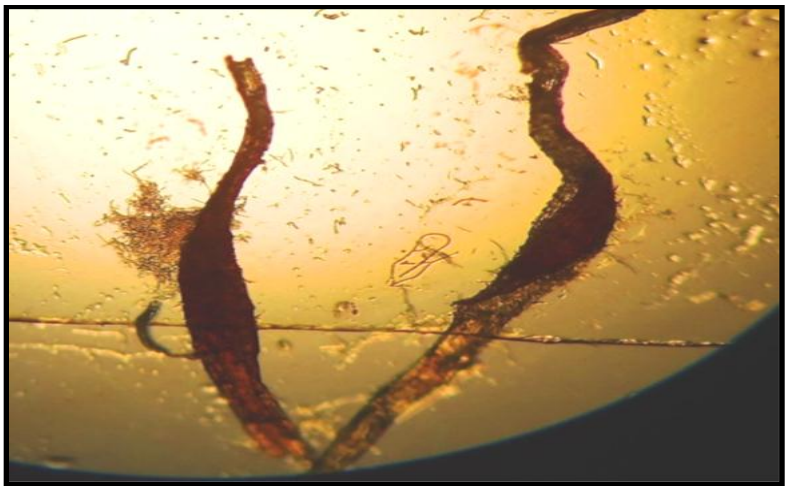


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: 4°C + oscuridad. Código 2151.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 52).

Gráfico 52. Positivo tetrazolio. *Sievekingia marsupialis.* 4°C + oscuridad

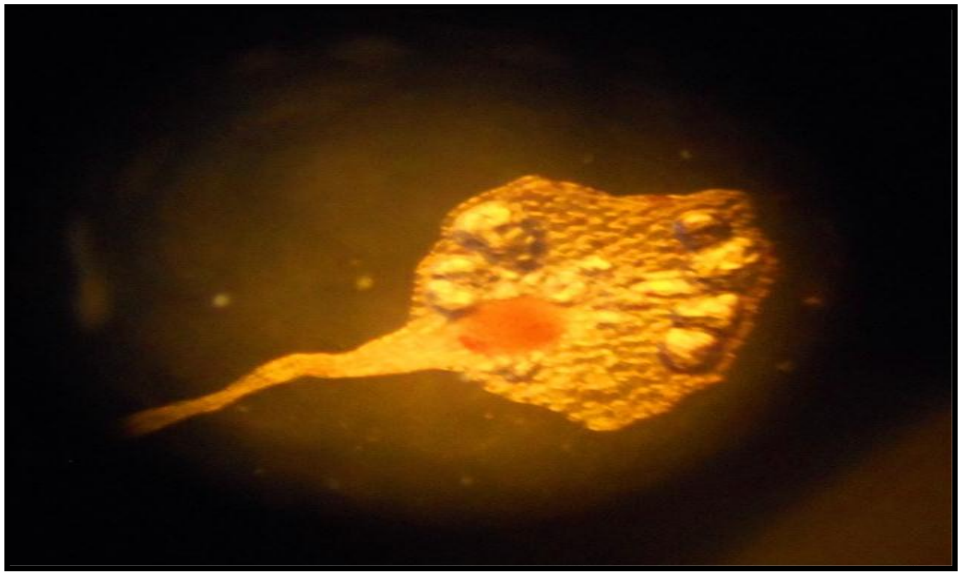


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Código 2151.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 53).

Gráfico 53. Positivo tetrazolio. *S. marsupialis.* Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz

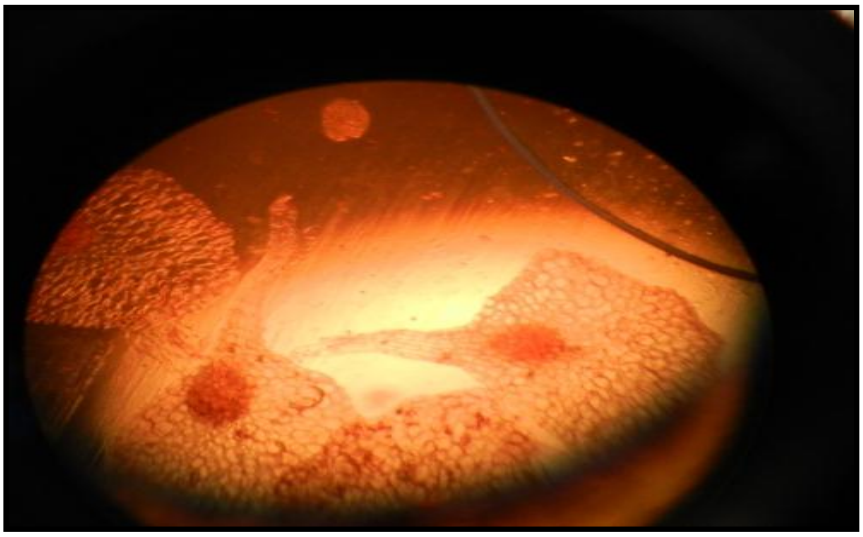


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: 4ºC + oscuridad. Código 2113.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 54).

Gráfico 54. Positivo tetrazolio. *Epidendrum sp.* 4ºC + oscuridad

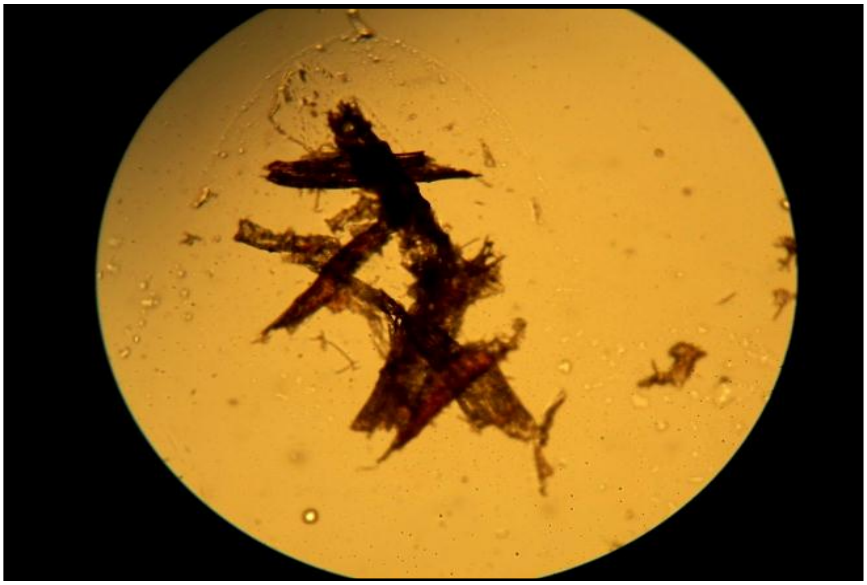


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Código 2113.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción negativa: no viable (Gráfico 55).

Gráfico 55. Negativo tetrazolio. *Epidendrum sp.* Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz

Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: 4°C + oscuridad. Código 2090.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 56).

Gráfico 56. Positivo tetrazolio. *Maxillaria rufescens.* 4°C+oscuridad

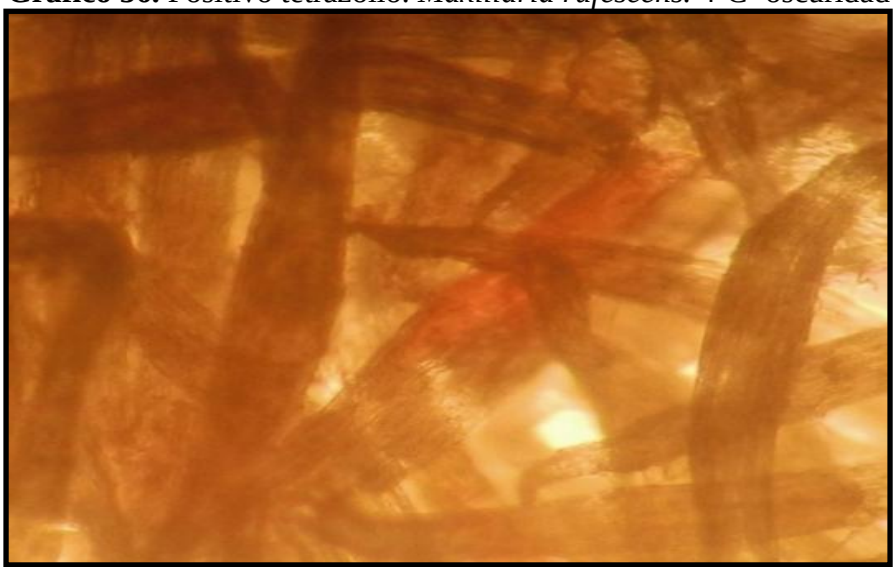


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Código 2090.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción negativa: no viable (Gráfico 57).

Gráfico 57. Negativo tetrazolio. *M. rufescens.* Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz

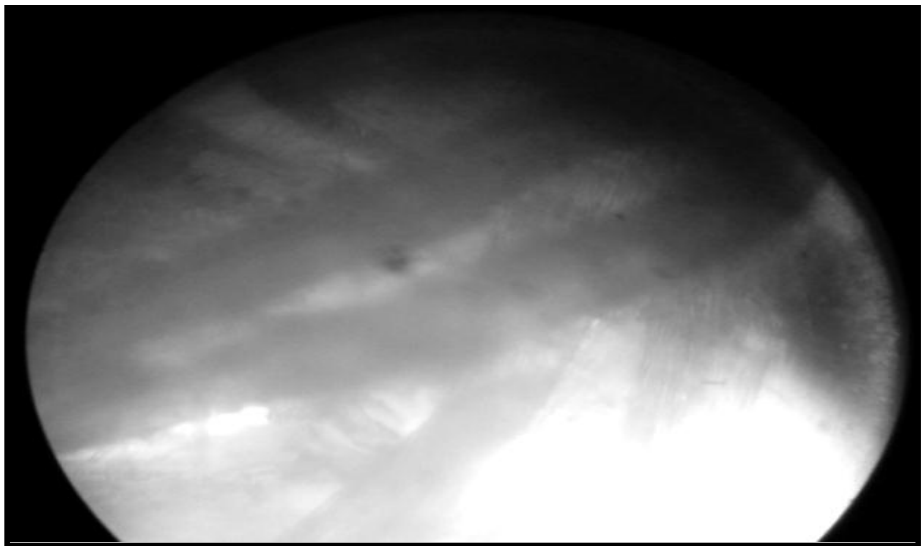


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: 4°C + oscuridad. Código 2152.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 58).

Gráfico 58. Positivo tetrazolio. *Maxillaria guareimensis*. 4°C+oscuridad

Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Código 2152.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 59).

Gráfico 59. Positivo tetrazolio. *M. guareimensis.* Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz

Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: 4°C + oscuridad. Código 2097.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 60).

Gráfico 60. Positivo tetrazolio. *Epidendrum sp*. 4°C+oscuridad

Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Código 2097.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción negativa: no viable (Gráfico 61).

Gráfico 61. Negativo tetrazolio. *Epidendrum sp.* Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz

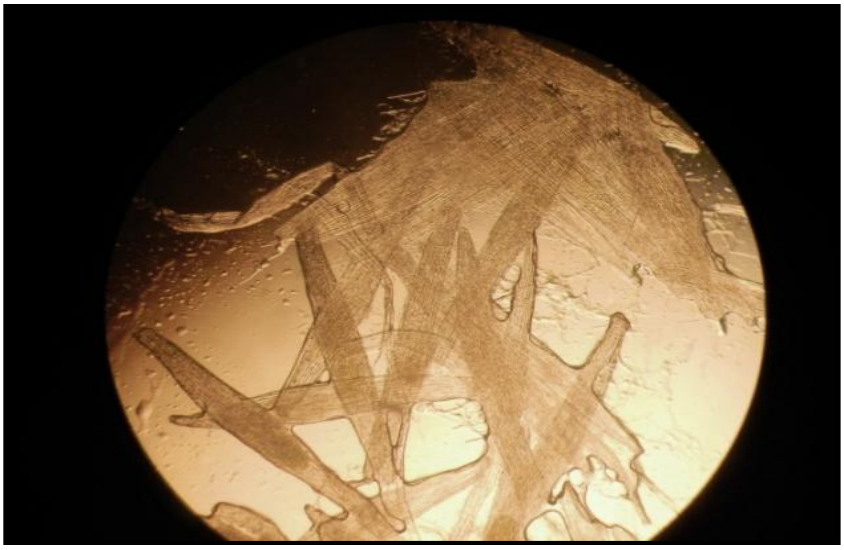


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: 4°C + oscuridad. Código 2066.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción positiva: viable (Gráfico 62).

Gráfico 62. Positivo tetrazolio. *Brassia arcuigera*. 4°C+oscuridad

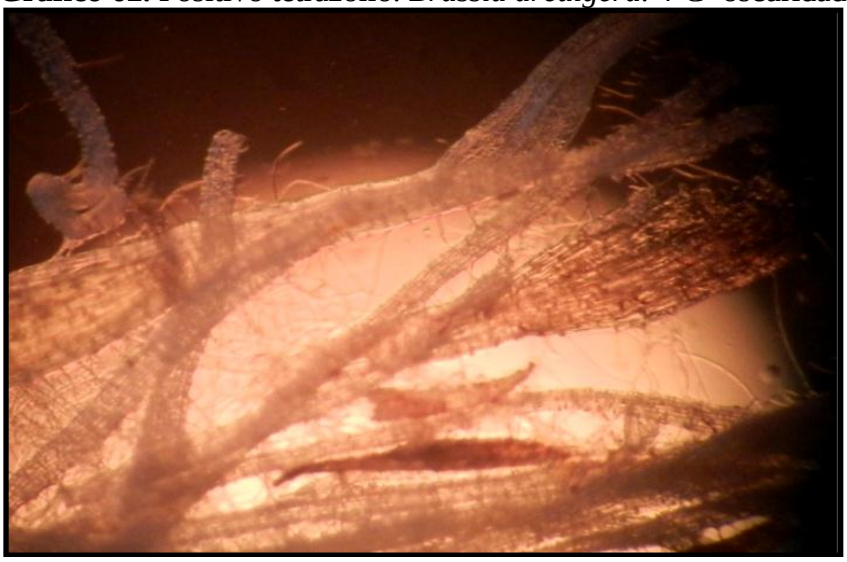


Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.

Condiciones: temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz. Código 2066.

Resultado Ensayo Tetrazolio: reacción negativa: no viable (Gráfico 63).

Gráfico 63. Negativo tetrazolio. *B. arcuigera.* Temperatura ambiente 20 ± 2 ºC + luz

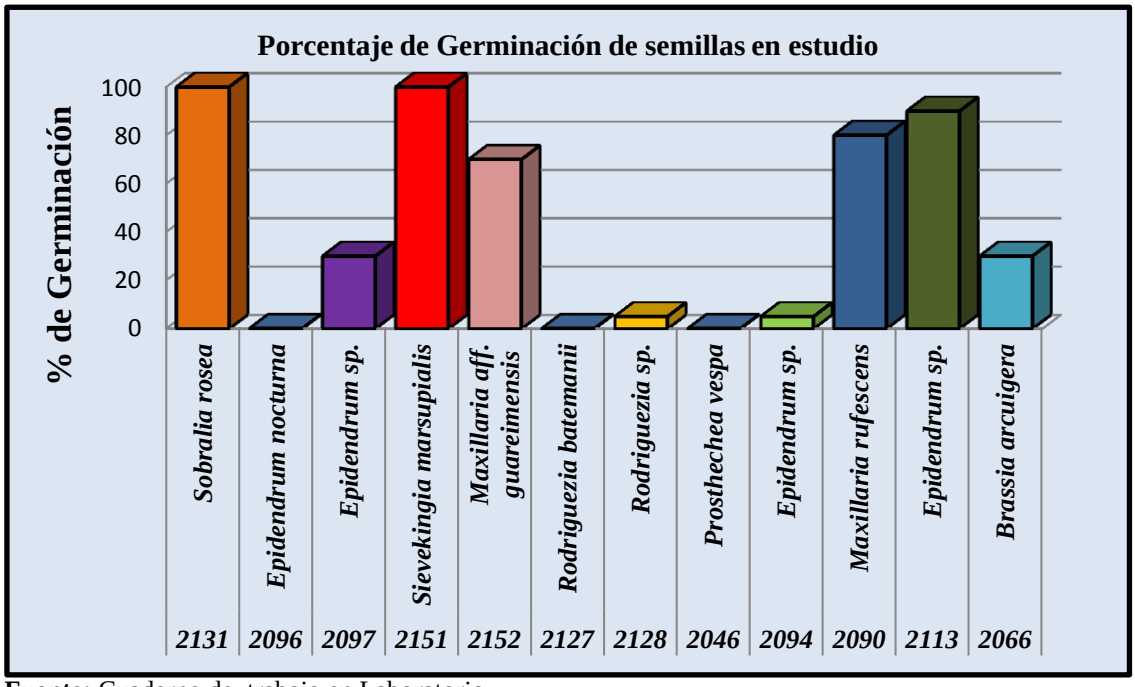
Foto: Cruz y Cárdenas, 2012.

4.3 *Obtención del medio óptimo para germinación in vitro*

4.3.1 Germinación de las semillas en estudio

A continuación, en el Gráfico 64, se muestra los porcentajes de germinación *in vitro*:

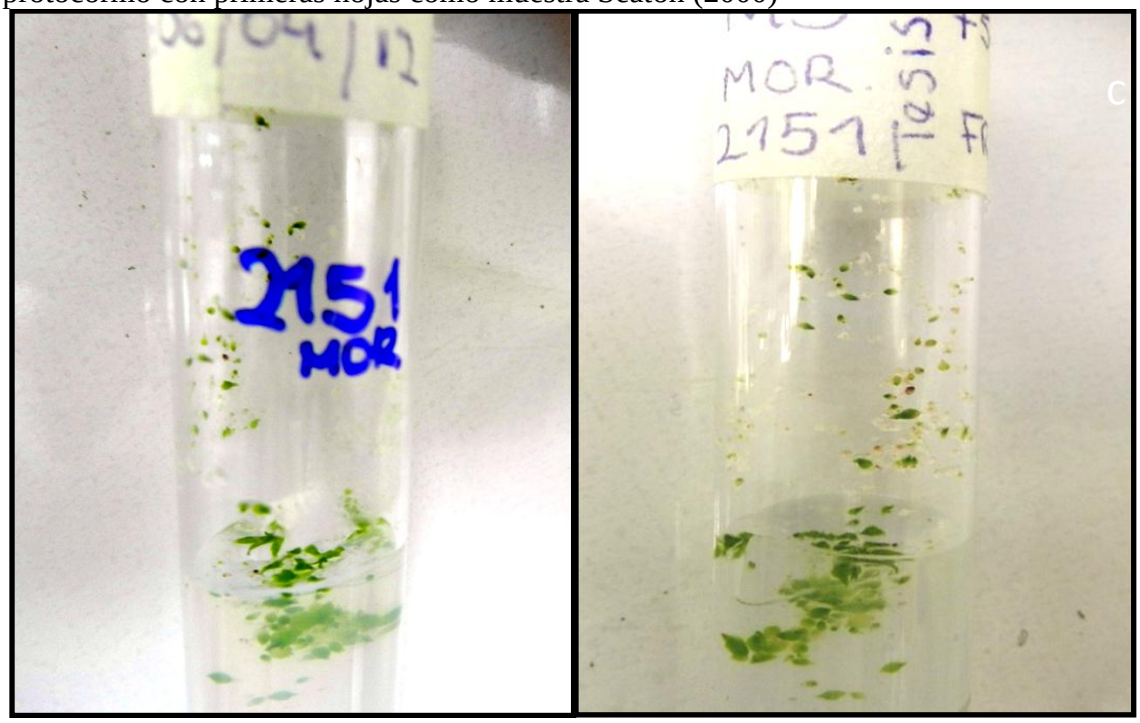
Gráfico 64. Porcentaje de germinación de semillas



Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

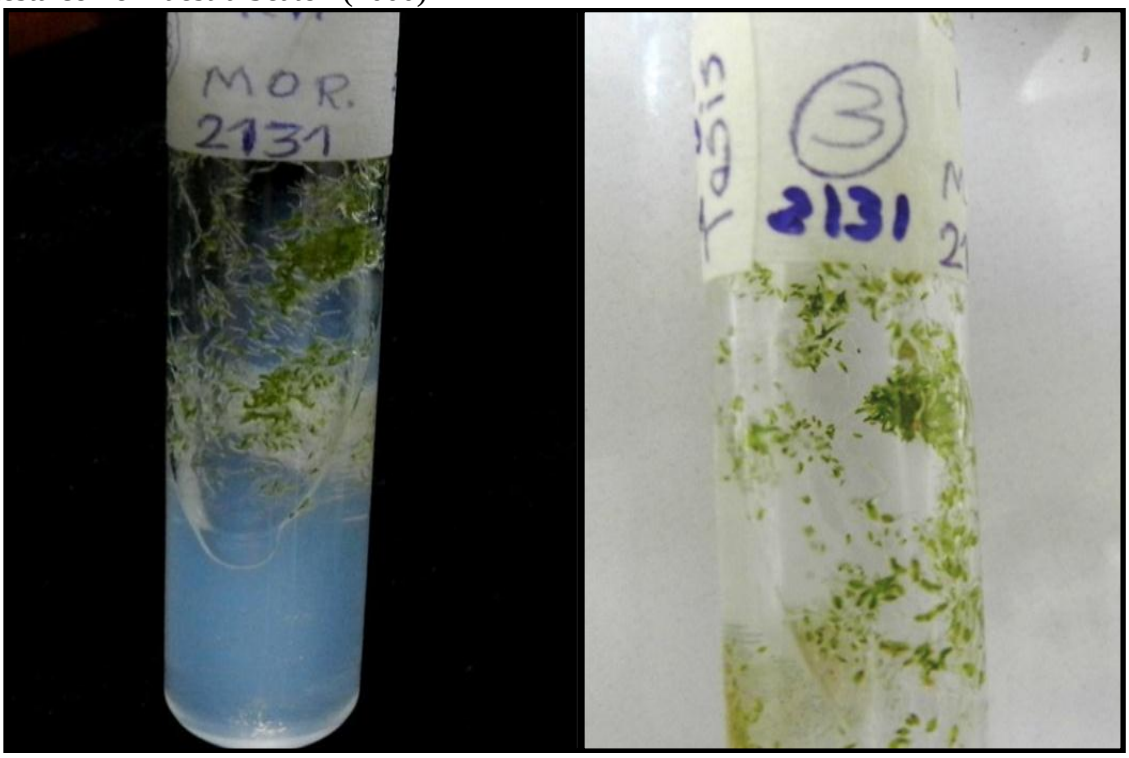
Interpretación: como se observa en el Gráfico 64, las orquídeas que presentaron mayor porcentaje de germinación *in vitro* (≥75%), indistintamente de los tratamientos ensayados, fueron las siguientes especies: con el 90% de germinación *in vitro* para *Sobralia rosea* (2131) y *Sievekingia marsupialis* (2151), seguido del 75% para *Maxillaria rufescens* (2090) y *Epidendrum sp*. (2113), la especie con porcentaje de germinación del 60% fue *Maxillaria guareimensis* (2152). Finalmente las especies con porcentaje (≤50%), fueron *Epidendrum nocturna* (2096), *Epidendrum sp.* (2097), *Rodriguezia batemanii* (2127), *Rodriguezia sp.* (2128), *Prosthechea vespa* (2094) *Epidendrum sp.* (2094) y *Brassia arcuigera* (2066). A continuación se muestran fotos (Gráfico 65 - 69) de los tubos con las semillas germinadas *in vitro* que estuvieron 5 meses sembrados en la cámara de incubación.

Gráfico 65. Germinación *in vitro* de 2151 *Sievekingia marsupialis* en la Etapa 5: protocormo con primeras hojas como muestra Seaton (2000)



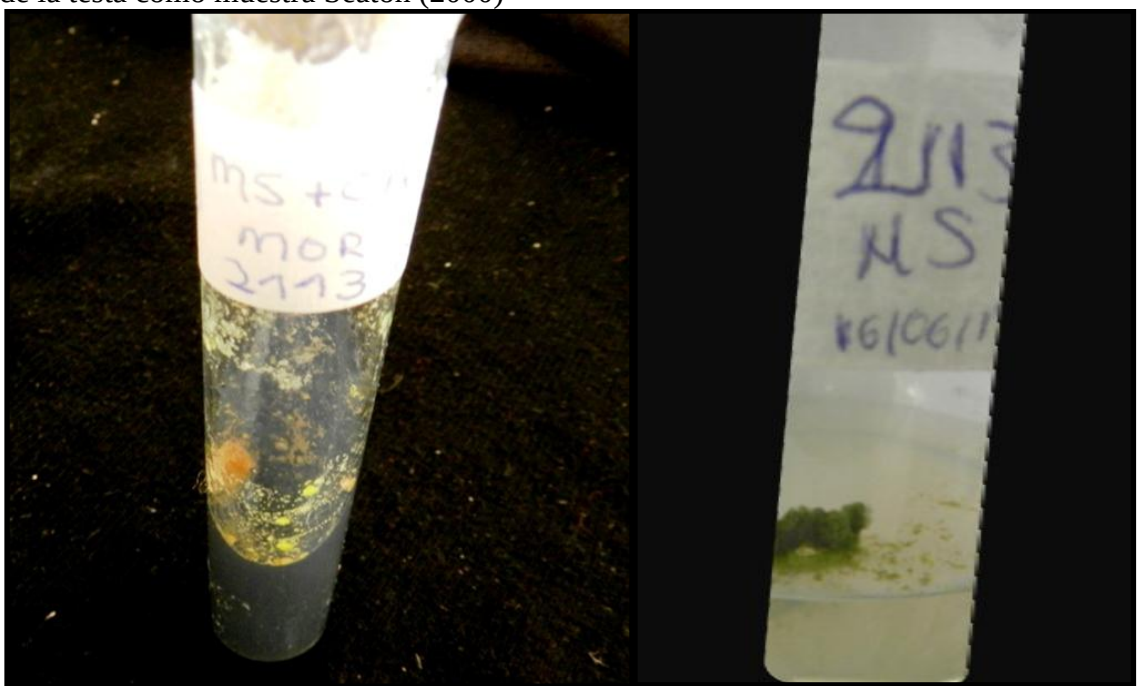
Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Gráfico 66. Germinación *in vitro* de *Sobralia rosea*, en la Etapa 2: rompimiento de la testa como muestra Seaton (2000)



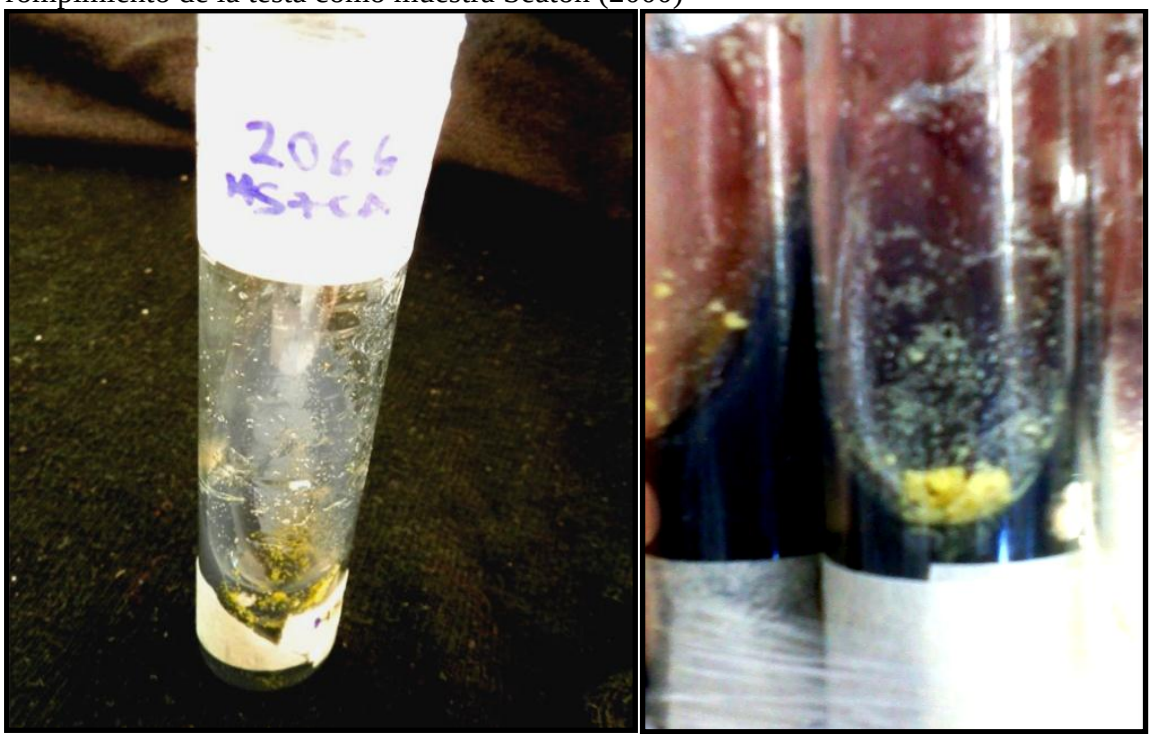
Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Gráfico 67. Germinación *in vitro* de 2113 *Epidendrum sp,* en la Etapa 2: rompimiento de la testa como muestra Seaton (2000)



Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Gráfico 68. Germinación *in vitro de* 2066 *Brassia arcuigera,* en la Etapa 2: rompimiento de la testa como muestra Seaton (2000)



Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

Gráfico 69. Germinación *in vitro* de 2090 *Maxillaria rufescens*, en la Etapa 2: rompimiento de la testa como muestra Seaton (2000)

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

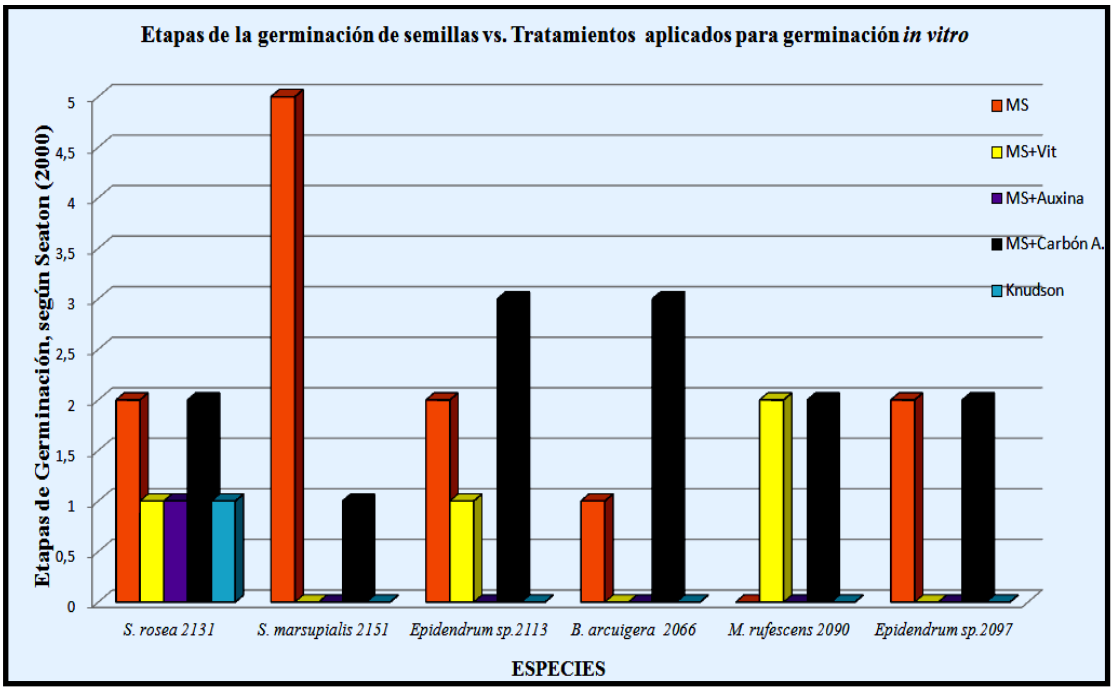
Interpretación: como se puede apreciar en las fotografías, la mayoría de semillas de orquídeas ensayadas germinaron en el tratamiento número cuatro (T4), que contenía M&S+1% carbón activado. Todas las especies, a excepción de 2151 *Sievekingia marsupialis*, llegaron a la etapa 2 – 3 de germinación *in vitro* según la escala de Seaton (2000), en el lapso establecido para la evaluación (2 meses). La especie *Sievekingia marsupialis*, llegó a la etapa 5 según la misma escala, pero en un lapso de cinco meses, es decir se formó un protocormo con las primeras hojas.

Todas las semillas sembradas *in vitro*, estuvieron bajo las mismas condiciones ambientales, con lámparas de luz blanca bajo 16 horas fotoperiodo, a 20 ± 2 ºC y 50% - 60% de humedad ambiental relativa.

4.3.2 Determinación del mejor medio para germinación in vitro

Comparando entre los medios de cultivo *in vitro* evaluados, dónde los tratamientos fueron: Murashige&Skoog (T1), Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2), Murashige&Skoog + 2,4D (T3), Murashige&Skoog + carbón activado (T4) y Knudson C (T5). Se determinó que las mejores etapas de germinación alcanzadas por las semillas de las orquídeas en estudio de forma global, el medio óptimo para germinación *in vitro* fue: Murashige&Skoog + 1% carbón activado (T4).

Gráfico 70. Etapas de germinación en distintos tratamientos

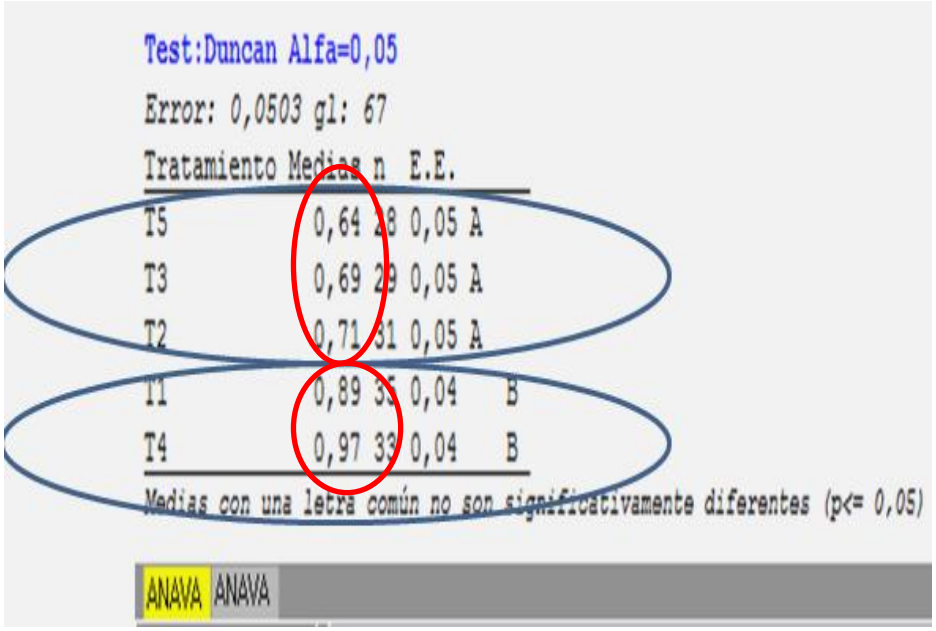


Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

Interpretación: se determinó que el mejor tratamiento para germinación *in vitro*, en general para todas las especies en estudio, fueron T4: Murashige&Skoog + 1% de carbón activado. Seguido de el T1, que contiene solamente medio: Murashige&Skoog; y en tercer lugar estuvo el T2: Murashige&Skoog + cinco veces la concentración de vitaminas (Gráfico 70).

Además, se realizó el test de Duncan a través del programa estadístico Infostat®, para corroborar los resultados anteriores. Se consideraron dos variables importantes en la evaluación de germinación *in vitro*: Turgencia y Color de brotes. A continuación se hallan los resultados (Anexo 4) de la evaluación efectuada en el programa Infostat®.

Gráfico 71. Test de Duncan para evaluación de tratamientos en función de la variable Turgencia de brotes (TUR)



Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0503 gl: 67

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T5	0,64	28	0,05	A
T3	0,69	29	0,05	A
T2	0,71	31	0,05	A
T1	0,89	35	0,04	B
T4	0,97	33	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

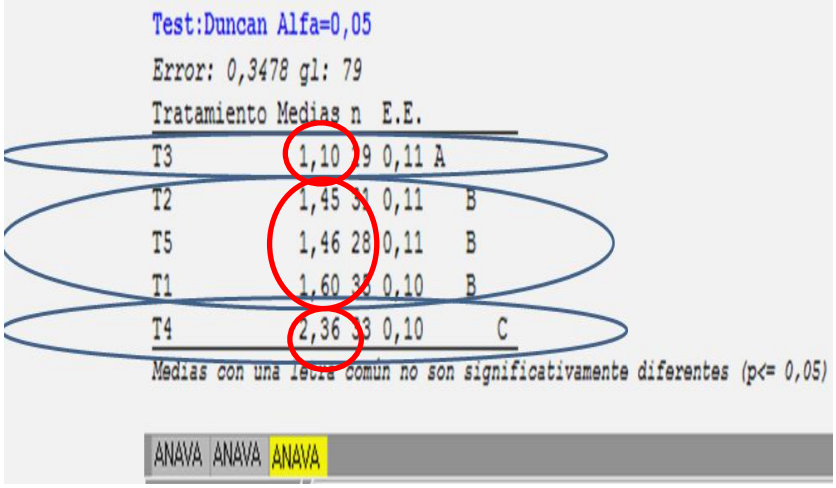
ANAVA ANAVA

Calculado en el programa estadístico Infostat®

Interpretación: como se aprecia en el Gráfico 71, existen dos grupos con diferencias significativas: el grupo A [Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2), Murashige&Skoog + 2,4D (T3) y Knudson C (T5)], con un promedio menor al 71%; en contraste, con el grupo B [Murashige&Skoog+1% carbón activado (T4) y Murashige&Skoog (T1)], con un promedio que varía entre 89-97% de turgencia; resultando ser estos últimos, los medios óptimos para germinación *in vitro* en las semillas de orquídeas investigadas, indistintamente de la especie. Estos resultados, fueron determinados en función a la variable Turgencia de brotes: TUR ≤ 2mm.

Los mejores tratamientos para germinación *in vitro* de las semillas de orquídeas en estudio, en función de la variable color de brotes (COL).

Gráfico 72. Test de Duncan aplicado para evaluación de tratamientos en función de la variable de Color (COL)



Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,3478 gl: 79

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T3	1,10	29	0,11	A
T2	1,45	31	0,11	B
T5	1,46	28	0,11	B
T1	1,60	30	0,10	B
T4	2,36	33	0,10	C

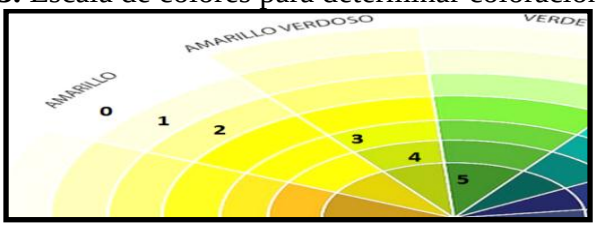
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

ANAVA ANAVA ANAVA

Calculado en el programa estadístico Infostat®

Interpretación: como se aprecia en el (Gráfico 72), existen tres grupos con diferencias significativas: los grupos de A, B y C. En el caso del grupo C [Murashige&Skoog + 1% carbón activado (T4)], muestra un sobresaliente resultado con un promedio de 2,36 en la variable color que trasciende entre amarillo-verde, para las semillas ensayadas en este tratamiento. En cambio el grupo B [Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2), Knudson C (T5) y Murashige&Skoog (T1)], presenta un promedio menor a 1,60 con coloración amarilla, asemejándose con el grupo A [Murashige&Skoog + 2,4D (T3)], con un promedio de 1,10 con coloración crema sin trascendencia de color. Estos resultados, fueron determinados en función a la variable Color de brotes ≤ 3 (Gráfico 73).

Gráfico 73. Escala de colores para determinar coloración en brotes

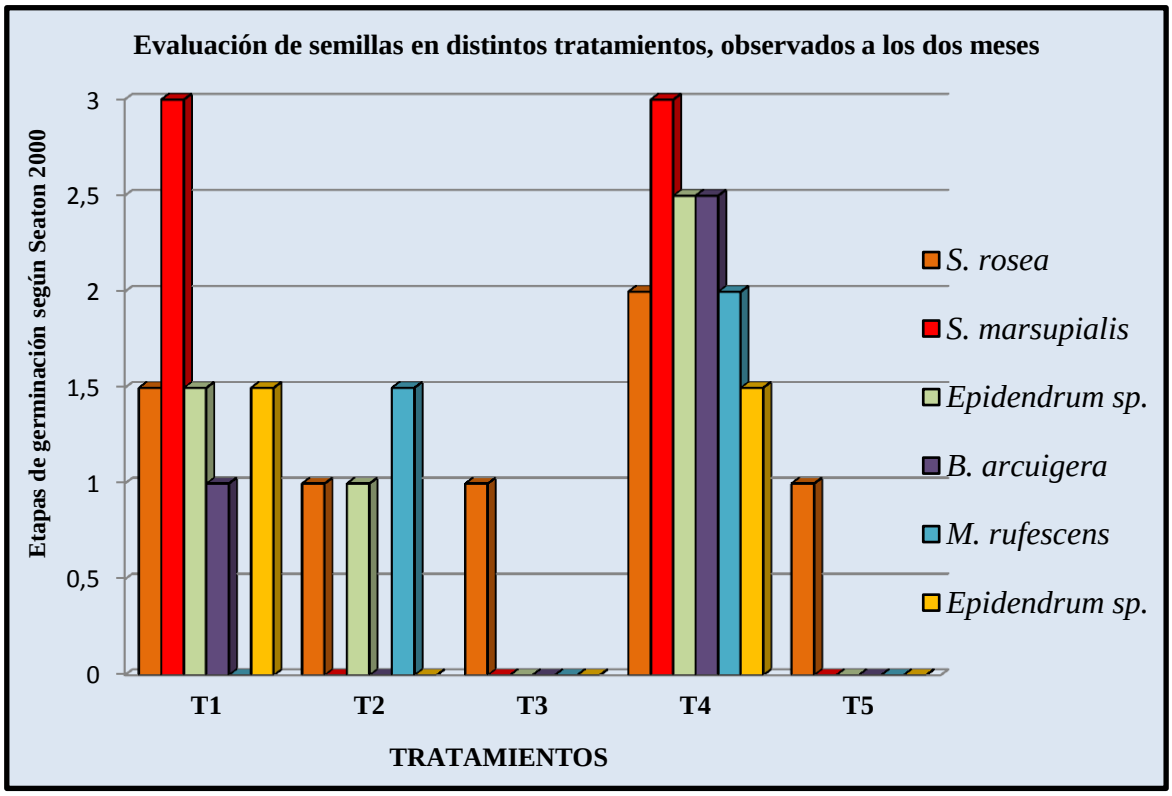


Fuente: Menchucolor, 2012.

4.3.3 Determinación del mejor medio de germinación in vitro (por especie)

En cuanto al mejor medio de cultivo por especie, se obtuvieron los siguientes resultados, tomando en cuenta que la evaluación fue realizada a los 2 meses de sembradas *in vitro.*

Gráfico 74. Evaluación a los dos meses, de semillas en tratamientos ensayados



Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

Como se puede apreciar para las especies: *Sobralia rosea* (2031), *Sievekingia marsupialis* (2152), 2113 Maxillaria rufescens Epidendrum sp. 2097 en los resultados actuales y los anteriores, los mejores medios de cultivo corroboran con los datos encontrados en la germinación *in vitro* por especie dónde: Murashige&Skoog+1% carbón activado (T4) y Murashige&Skoog (T1), siguen siendo los medios óptimos (Gráfico 74).

Tabla 13. Mejores tratamientos para germinación *in vitro*, por especie

Código	Especie	Medios óptimos de germinación *in vitro* (En orden)
2131	*Sobralia rosea*	T4, T2 y T1
2113	*Epidendrum sp.*	T4, T2 y T1
2151	*Sievekingia marsupialis*	T1 y T4
2066	*Brassia arcuigera*	T4 y T1
2097	*Epidendrum sp.*	T4 y T1
2090	*Maxillaria rufescens*	T4 y T2

Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

Interpretación: la Tabla 13, indica los mejores tratamientos para germinación *in vitro*, por especie, dónde;

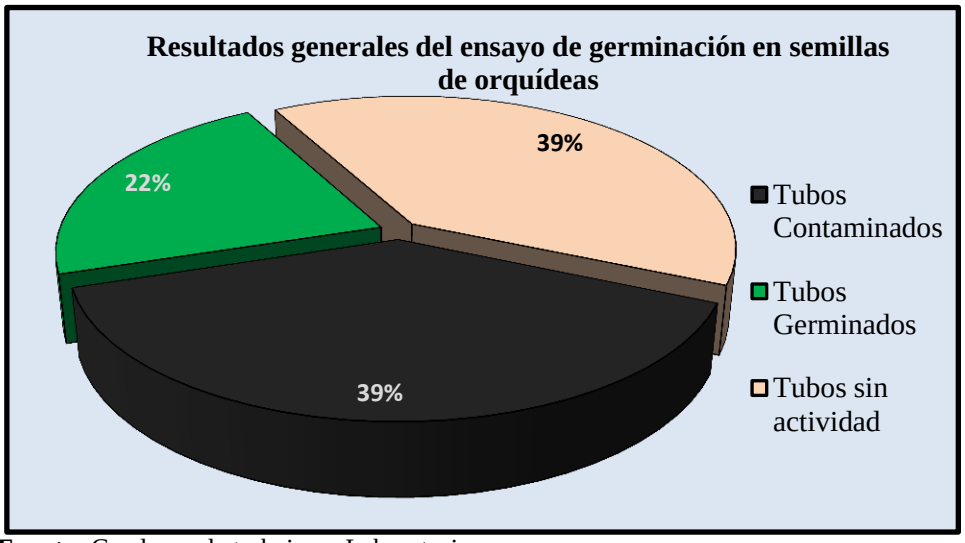
Sobralia rosea (2131) y *Epidendrum sp.* (2113), germinaron *in vitro* en: Murashige&Skoog+1% carbón activado (T4), Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2), Murashige&Skoog (T1).

Sievikingia marsupialis (2151), *Brassia arcuigera* (2066), *Epidendrum sp.* (2097), germinaron *in vitro* en: Murashige&Skoog (T1) y Murashige&Skoog + 1% carbón activado (T4).

Maxillaria rufescens (2090), germinó *in vitro* en: Murashige&Skoog + 1% carbón activado (T4) y Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2).

Resultados generales del ensayo de germinación en semillas de orquídeas: de los 16 códigos de semillas de orquídeas que fueron cultivadas desde el mes de abril hasta septiembre de 2012, distribuidos en 5 tratamientos por 2 repeticiones (5x2x16), dándonos un total de 160 tubos sembrados, los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico 75.

Gráfico 75. Resultados del ensayo de germinación en los tubos de ensayo



Fuente: Cuaderno de trabajo en Laboratorio.

Interpretación: el 22% de tubos sembrados resultaron germinados *in vitro,* en un lapso de cuatro meses de evaluación, desde el mes de abril hasta el mes de agosto del 2012.

El 39% de tubos sembrados *in vitro,* resultaron sin ninguna actividad, aquí se incluyen los tubos fenolizados y los que no germinan aún.

El 39% de tubos sembrados *in vitro,* resultaron contaminados por distintos agentes patógenos, tanto hongos como bacterias.

5. DISCUSIÓN

Recolección, identificación y conservación en invernadero de orquídeas de las zonas de Copal, Tres Ranchos y La Delicia del Cantón Santiago de Méndez.

Sobre la recolección e identificación de orquídeas

Conforme a los objetivos propuestos, y tal como afirman Rao y otros (2007) en su obra "Manual para el manejo de semillas en Bancos de germoplasma". El primer paso hacia la conservación *ex situ* de la riqueza genética de un lugar, es la recolección del germoplasma en áreas de conocida biodiversidad. En este estudio, se colectaron 50 especies de orquídeas de 15 géneros distintos en un área de tan solo 600m^2, confirmando así la riqueza florística del Cantón Santiago en la provincia de Morona Santiago, denominada como "*hot spot*" según Ruiz (2000) en su trabajo: "Amazonía ecuatoriana Escenario y actores del 2000", donde menciona que la Amazonía es: "Una de las zonas más importantes del mundo, por lo que la región consta como uno de los diez *hot spots* de biodiversidad en los trópicos". Por otro lado, en la publicación de EcoCiencia (2000) "La biodiversidad del Ecuador", manifiesta lo siguiente respecto de los *hot spot*: Es la denominación utilizada para definir a un área del mundo, que a la vez que contiene un número alto de especies, está amenazada ecológicamente por actividades humanas y cambios climáticos, entre otros. Estos puntos, a pesar de que abarcan únicamente un 2% de la superficie de la Tierra, contienen en su interior más de la mitad de la biodiversidad del mundo, razón por la cual son considerados prioridades de conservación.

Sobre la Conservación de orquídeas en invernadero

"El almacenamiento de germoplasma de especies amenazadas, puede realizarse mediante colecciones de plantas", afirma Laliberté (1997) en su estudio "Bancos de semillas de Jardines botánicos". Además, Maxted y otros, (1997) recalcan la importancia de esta actividad e indican: "La utilización de colecciones de plantas de especies vegetales amenazadas reside fundamentalmente en los jardines botánicos, a la hora de multiplicar material vegetal para su exposición o con fines de estudio o intercambio".

“No obstante, estas técnicas también pueden ser utilizadas para la obtención de material vegetal cuando la reproducción por vía sexual no resulta factible o eficaz. En estos casos, se debe tener la precaución de mantener controlada la identidad genética del material propagado y de tener en cuenta, no sólo la producción de un determinado número de individuos, sino también la producción de un mínimo número de genotipos distintos” en su publicación “Estrategias complementarias de conservación genética de plantas” de Maxted y otros, (1997). Además, Hartmann y otros (1997) en su estudio: “Propagación de Plantas, Principios y Prácticas”, manifiestan: “En los países tropicales, donde reside el mayor número de especies, es donde menos colecciones de plantas hay, por ejemplo jardines botánicos”**.** En la presente investigación, ratificamos el valor de los métodos de conservación *ex situ*, debido a que, la recolección, evaluación periódica y monitoreo constante en campo de los individuos en las áreas de estudio, se ve imposibilitada, ya que están en zonas de alto riesgo (zona de deslaves), tal es el caso de Copal y Tres Ranchos, sectores de difícil y peligroso acceso. Tal como lo demuestran en su investigación “Manteniendo las opciones vivas, las bases científicas para conservación de la Biodiversidad” de Reid y Miller (1989), y Rao y otros (2007) “este tipo de limitaciones, enfrenta la necesidad de desarrollar métodos de conservación *ex situ* o fuera del hábitat natural”. En este caso, en nuestro estudio, la conservación a través del invernadero fue de gran utilidad, puesto que se pudo acceder fácilmente a las especies colectadas en el Cantón Santiago, con la inspección, cuidados diarios de las orquídeas y con la consecuente protección de la biodiversidad de la zona.

Almacenamiento de semillas en el Banco de germoplasma y determinación de su viabilidad

Sobre el almacenamiento de semillas en el Banco de germoplasma

Desde las investigaciones iniciales sobre condiciones óptimas para mantener semillas, se conoce que las bajas temperaturas y bajo contenido en humedad son óptimas para almacenar semillas, tal como afirmaron Justice y Bass (1978) en su monografía “Principios y prácticas sobre almacenamiento de semillas”.

Por otro lado Böhm (1996) en su estudio “Manejo de semillas de orquídeas terrestres”, aseveró que: “El almacenamiento de semillas por periodos de meses o años, se deben conservar a una temperatura de 4°C”. En el presente estudio, afirmamos el uso apropiado de estos dos factores: temperatura de 4°C en refrigeración a oscuridad y humedad promedio del 8% que proporciona una vía aceptable para la conservación de semillas de orquídeas en un banco de germoplasma. En su estudio: “Crecimiento de orquídeas desde la semilla”, Seaton (2000) concluye que: “Los viales de vidrio herméticos, son el tipo de contenedor óptimo para almacenamiento de semillas de orquídeas”. Sobre el almacenamiento de semillas en viales de vidrio, Ossenbach y otros (2006 a) manifiestan en su estudio “Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma”, que los viales “proveen un ambiente más favorable para mantener las características de la semilla por tiempo más prolongado”. Paralelamente a los estudios mencionados, en nuestra investigación, los *vacuntainers,* a más de resultar un contenedor óptimo para mantener las características de semillas en almacenamiento, fueron de fácil manipulación y ocuparon reducidos espacios en el banco de germoplasma.

Reid y Miller (1989), indicaron que “la conservación de semillas puede constituir la única opción disponible cuando los últimos ejemplares de una especie están a punto de desaparecer”. Esto se advierte con la información encontrada en el Libro Rojo de las Especies Endémicas del Ecuador, donde se halló el caso de la especie *Sievekingia marsupialis*, que actualmente está catalogada como Casi Amenazada (NT), desconociendo su estado de preservación futura, por lo tanto nuestro aporte fue conservar las semillas de esta especie en el banco de germoplasma para mantener almacenada en condiciones adecuadas y asegurar su preservación a largo plazo.

Sobre la determinación de viabilidad en semillas almacenadas

Para determinar viabilidad de semillas, la prueba con tetrazolio (TZ) es la más común según Colbry y otros (1986) en su estudio: “Pruebas de germinación en el laboratorio. Semillas”.

Asimismo, en el estudio de Hosomi y otros (2011), sobre la "Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de *Cattleya* por medidas con la prueba de tetrazolio" concluye que: "El uso del tetrazolio con una concentración >0,25% es óptima incluso si las semillas de orquídeas no fueron preacondicionadas con sacarosa". Por su parte, Lallana y García (2010) en su estudio "Puesta a punto de la prueba de tetrazolio en semillas de orquídeas", aplicaron el tetrazolio a una concentración de 0,5%. Mientras que Böhm (1996), utilizó una concentración del 1% obteniendo de igual forma resultados favorables. Por lo tanto, el uso de la solución de tetrazolio en concentraciones >0,25% se comprueba que es efectiva. En esta investigación se utilizó una concentración del 1% más un preacondicionamiento en solución de sacarosa 10% para mejorar la coloración, proveyéndonos resultados confiables.

Determinación del medio óptimo para germinación in vitro de semillas de orquídeas.

Sobre la obtención del medio óptimo para germinación *in vitro*

Durante la evaluación de medios de germinación *in vitro* en el presente estudio, se determinó que emplear el medio Murashige&Skoog más 1% de carbón activado, es el medio óptimo para la mayoría de semillas investigadas, lo cual mostró una tasa de germinación más alta en comparación a los tratamientos sin carbón activado. Estos resultados coinciden con lo propuesto por Margara (1988), en "Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*: los meristemos y la organogénesis", quien afirma que el carbón activado administrado en bajas concentraciones a los medios de cultivo, acelera la formación de cuerpos protocórmicos. Por otra parte, concordando con la investigación "Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro Cocos nuciferas L.*" de Borges y otros (2008), el ambiente oscuro que produce el carbón activado tiende a aparentar condiciones naturales para la germinación de las semillas de orquídeas y colabora con la formación de la clorofila proporcionando al embrión la coloración verde intensa.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Recolección, identificación y conservación en invernadero de orquídeas de las zonas de Copal, Tres Ranchos y La Delicia del Cantón Santiago de Méndez.

Conclusión: se recolectaron 50 especies de orquídeas de 15 géneros diferentes en un área de 600m^2 muestreados entre las zonas de Copal, Tres Ranchos y La Delicia, pertenecientes al cantón Santiago de Méndez en la provincia de Morona Santiago, estos fueron: *Maxillaria*, *Epidendrum*, *Stelis*, *Pleurothallis*, *Huntleya*, *Sobralia*, *Rodriguezia*, *Prosthechea*, *Mormodes*, *Sievekingia*, *Lycaste*, *Elleanthus*, *Cyclopogon*, *Masdevallia* y *Brassia*. Además, se encontró una especie endémica en la localidad de La Delicia (2°44'46''S - 78°19'06.31''O), esta es *Sievekingia marsupialis*, cuya categorización según la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), es de Casi Amenazada (NT), lo que significa que: "Las especie está disminuyendo y en un futuro cercano será especie vulnerable". Esta especie no está descrita dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP).

Recomendación: se debería implementar un sistema de información geográfica de especies de orquídeas amenazadas, para monitorear su estado, conservación y restitución futura. Como por ejemplo de *Sievekingia marsupialis*, entre otras poblaciones de orquídeas que corren peligro de extinción en la provincia de Morona Santiago, sobe toda aquellas que no están descritas en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP).

Conclusión: el invernadero como técnica de conservación *ex situ* de orquídeas, es un medio eficaz para estudio, protección, conservación y reproducción de especies fuera de su hábitat natural, con el objetivo de mantener el recurso genético de una zona.

Recomendación: considerando que esta técnica constituye un recurso para la conservación y refugio de las especies amenazadas, un banco de germoplasma vivo sería la mejor opción, por lo que se debería determinar las condiciones ambientales específicas para cada especie, tomando en cuenta la temperatura y humedad de los lugares de donde provienen.

Almacenamiento de semillas en el Banco de Germoplasma y determinación de su viabilidad.

Conclusión: las mejores condiciones de almacenamiento de semillas de las orquídeas en estudio durante ocho semanas, para que se conserven íntegras, resultaron ser: en *vacuntainers* a 4°C, con 6-10% de humedad relativa (HR) y en condiciones de oscuridad. El proceso de vacío en los contenedores resultó ser muy importante, al igual que la asepsia en todos los procedimientos para almacenamiento.

Recomendación: se debería almacenar al vacío, con asepsia en *vacuntainers* a 4°C, a 4°C, con 6-10% de HR y en condiciones de oscuridad. Además, sería importante establecer análisis periódicos de semillas almacenadas para asegurar su viabilidad a largo plazo.

Conclusión: la prueba de tetrazolio utilizada al 1%, es un método adecuado para determinar viabilidad de semillas de orquídeas. Esto se demostró en las especies: *Sobralia rosea* (90%), *Epidendrum sp.* (80%), *Brassia arcuigera* (80%), *Maxillaria aff. Guareimensis* (80%), y *Maxillaria rufescens* (80%), las cuales fueron almacenadas en *vacuntainers* a 4°C, con 6-10% de humedad relativa y en oscuridad.

Recomendación: se debería usar una concentración al 1% tetrazolio, más un preacondicionamiento en solución de sacarosa 10% para mejorar la coloración y el estado del embrión. Asimismo, se debería ajustar el protocolo de viabilidad de semillas de orquídeas, para cada género, y de ser posible por especie; puesto que la morfología de las semillas de *Orchidaceae* presenta grandes variaciones anatómicas y funcionales.

Conclusión: las semillas de orquídeas almacenadas que resultaron con reacción positiva en la prueba de tetrazolio, concuerdan con los resultados de la prueba de germinación *in vitro*. Es decir las mismas especies viables, germinaron, y las especies que dieron reacción negativa a la prueba de tetrazolio no germinaron.

Recomendación: se debería realizar la prueba de germinación *in vitro* así como de viabilidad antes, durante y posterior al almacenamiento de semillas de orquídeas en el banco de germoplasma.

Determinación del medio óptimo para germinación in vitro de semillas de orquídeas

Conclusión: se determinó que los medios óptimos para germinación *in vitro* en función a la variable Turgencia, marcaron diferencias significativas entre tratamientos; para el grupo A [Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2), Murashige&Skoog + 2,4D (T3) y Knudson C (T5)], con un promedio menor al 71% en turgencia; en contraste, con el grupo B [Murashige&Skoog+1% carbón activado (T4) y Murashige&Skoog (T1)], tratamientos que resultaron ser estadísticamente muy similares con un promedio sobresaliente entre 89-97% de turgencia; por tanto cualquiera de los dos tratamientos se considera como medio óptimo de germinación *in vitro,* en las semillas de orquídeas investigadas, indistintamente de la especie.

Recomendación: se debería usar el Tratamiento 4: Murashige&Skoog + 1% carbón activado y el Tratamiento 1: Murashige&Skoog para germinación *in vitro.*

Conclusión: los mejores tratamientos para germinación *in vitro*, por especie, fueron: *Sobralia rosea* (2131) y *Epidendrum sp.* (2113), germinaron *in vitro* en: Murashige&Skoog+1% carbón activado (T4), Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2) y Murashige&Skoog (T1). *Sievekingia marsupialis* (2151), *Brassia arcuigera* (2066), *Epidendrum sp.* (2097), germinaron *in vitro* en: Murashige&Skoog (T1) y Murashige&Skoog+1% carbón activado (T4). *Maxillaria rufescens* (2090), germinó *in vitro* en: Murashige&Skoog+1% carbón activado (T4) y Murashige&Skoog + cinco veces vitaminas (T2).

Recomendación: se debería evaluar medios para desarrollo y germinación *in vitro,* por cada especie y adaptar estas semillas a medios de conservación *in vitro*, por cada especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Z, N. León, C. Yaguana y B. Merino (2011). **Catálogo de las Orquídeas del Jardín Botánico del Padmi.** Universidad Nacional de Loja. Herbario Loja. Centro de Estudios y Desarrollo de la Amazonía (CEDAMAZ). Zamora Chinchipe, Ecuador. Disponible en: <http://www.unl.edu.ec/agropecuaria/wp-content/uploads/2012/02/padmiorquideas. pdf>. Consulta: 19/09/2012.

Alvarado, P. y G. Urrutia (2003). **Invernaderos.** Biblioteca Virtual Universal. Revista el Agroeconómico de la Fundación de Chile No. 05/2000. Editorial del Cardo. Disponible en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/.pdf>.Consulta:05/05/ 2012.

Arditti, J., J. Michaud y D. Healay (1979). ***Morphometry of orchid seeds I.*** *Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. American Journal of Botany, 66(10): 1 128- 1 13 7. En: Ulloa, C. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri x Cattleya áxima* por cultivo de ápices. Disponible en: < http://es.scribd.com/doc/51341112/9/Estructuras-vegetativas >. Consulta: 06/07/2012.

Arditti, J. y R. Ernets (1993). ***Micropropagation of orchids.*** New York, Estados Unidos. John Waley & Sons, Inc. pp 25-86,199-240. En: Ulloa, C. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri x Cattleya áxima* por cultivo de ápices. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/51341112/9/Estructuras-vegetativas>. Consulta: 06/07/2012.

Arias, L., R. Santibañes, L. Dendooven, T. Ayora y A. Gutiérrez (2006). **Efecto del agua de coco y homogenizados de jitomate y plátano sobre el crecimiento de la orquídea *Guarianthe skinneri* cultivada *in vitro*.** El cromosoma: 76-79. En: Mayo, A. y otros (eds.), 2010. Germinación *in vitro* de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. Tabasco, México. Disponible en: <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/.pdf>.Consulta:18/09/2012.

Arriagada, V. (2000). **Semillas Inspección, Análisis, Tratamiento y Legislación.** Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Santiago, Chile.114 pp. En: Verdugo, G. y otros. 2007. Caracterizacion morfométrica de la áximaase de *Chloraea crispa lindl.* (*Orchidaceae*) usando Análisis de imagen. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Instituto de Ciencia y Tecnología, Universidad Arturo Prat, Puerto Montt, Chile. Disponible en: < http://www.scielo.cl/pdf/gbot/v64n2/art08.pdf> Consulta: 06/07/2012.

Asamblea Constituyente del Ecuador (2008). **Constitución del Ecuador.** Título dos, Capítulo segundo, Sección segunda, artículo 14. Disponible en: <http://www.asamblea nacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo. pdf>. Consulta: 20/05/2012.

Bachetta, G., A. Bueno-Sánchez, G. Fenu, B. Jiménez-Alfaro, E. Mattana, B. Piotto, y M. Virevaire (eds.) (2008). **Conservación *ex situ* de plantas silvestres.** Ministerio del Ambiente, del territorio y del mar, Italia; Departamento de Ciencias Botánicas de la Universidad de los estudios de Cagliari, Italia; Instituto de Recursos Naturales y Ordenación del Territorio, España y Principado de Asturias / Obra social : La Caixa. Disponible en: <http://www.conservacionvegetal.org/upload/publicacio nes/28/Conserv-exsitu_Bachetta _et_al._eds.pdf>. Consulta: 06/05/2012.

Besnier, R. (1990). **Semillas, biología y tecnología**. Biologia de las semillas. Produccion de semillas. Ensayo y uso de semillas. Ediciones Mundi-Prensa. España. http://biblioteca.unirioja.es/biba/mas_info.php?-titn=25244>. Consulta: 19/09/2012.

Biocromática (2001). **Fotografía de Orquídeas.** Disponible en: <http://biocromatica-exp.blogspot.com/2011/06/orquideas-del-yanachaga-la-belleza.html>. Consulta: 19/09/2012.

Böhm, J. (1996). ***Terrestrial orchid seed handling: How to collect, store and send terrestrial orchid seed and pollen and how to send in vitro cultures.*** En: Ossenbach, y otros (eds.) (2006 b). Almacenamiento de Semillas de diferentes Especies de Orquídeas para su Conservación en un Banco de Germoplasma II. Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. Tierra Tropical (2007) 3 (1): 47 – 59. Revista de la Universidad Earth. ISSN: 1659 – 2751. Costa Rica. Disponible en: <http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/41_v3.1-05_OssenbachII.pdf>. Consulta: 22/09/2012.

Borges, M., B. Malaurie, S. Portales y D. Calzadillas (2008). **Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos nuciferas L.*)** Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. X, Núm. 2, diciembre-sin mes, 2008, pp. 111-119. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve= 77610213>. Consulta: 24/07/2012.

Cavero, M., B. Collantes y C. Patroni (2009). **Orquídeas del Perú. Centro de Datos para la conservación de Perú.** Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú. Disponible en: <http://ibcperu.org/doc/isis/10722.pdf>. Consulta: 06/07/2012.

Cerna, M. (2012). Inédito. **Libro de campo de Colecciones botánicas en Ecuador del 2031 al 2153.** Consulta: 06/04/2012.

Cerón, C. (2003). **Manual de Botánica sistemática, etnobotánica y métodos de estudio.** Editorial universitaria Universidad Central del Ecuador, Quito. Consulta: 06/07/2012.

Colbry, V., T. Swofford, y R. Moore (1986). **Pruebas de germinación en el laboratorio. Semillas.** Compañía Editorial Continental, S.A. México. p. 771-786. En: Ossenbach, y otros (eds.) (2006 b). Almacenamiento de Semillas de diferentes Especies de Orquídeas para su Conservación en un Banco de Germoplasma II. Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. Tierra Tropical (2007) 3 (1): 47 – 59. Revista de la Universidad Earth. ISSN: 1659 – 2751. Costa Rica. Disponible en: <http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/41_v3.1-05_OssenbachII.pdf> Consulta: 22/09/2012.

Dressler, R. (1973). ***The Orchids Natural History and Classification.*** Cambridge, Massachuset: Cambridge University Press. En: Lara, J. y otros (eds.). 2009. Ecuador país de Orquídeas. Publicación del Jardín Botánico de Quito y Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. pp.15. Consulta: 06/07/2012.

Dressler, R. (1994). ***Phylogeny and Classification of the Orchid Family***. Cambridge, Massachuset: Cambridge University Press. En: Lara, J. y otros (eds.). 2009. Ecuador país de Orquídeas. Publicación del Jardín Botánico de Quito y Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. pp.15. Consulta: 06/07/2012.

Dodson C. y P. Dodson (1980). ***Xylobium***. ***Herbarium*** **Jany Renz.** Swiss Orchid Foundation. Disponible en: <http://orchid.unibas.ch/phpMyHerbarium/311098/1/Xylobium/pallidiflorum/Hooker_William_Jackson/Nicholson_George/specimen.php>. Consulta: 18 /09/2012.

EcoCiencia (2000). **La biodiversidad del Ecuador. Informe 2000**. Editado por Carmen Josse. Ministerio del Ambiente, EcoCiencia, UICN. 2001, Quito, Ecuador. Disponible en: <http://www.ecociencia.org/inicio/index.php?sid=105&list=one&id=90>. Consulta: 19/09/2012.

Endara, L. (2008). **Herbario FLAS.** Museo de Historia Natural de Florida. Estados Unidos.Disponibleen:<http://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Patrones_endemismo.htm>. Consulta: 27/06/2012.

Endara, L., Hirtz A. y Jost L. (2011). ***Orchidacea***. Pp. 441. En: León-Yánez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa y H. Navarrete (eds.) (2011). Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2ª edición. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Quito. Consulta: 07/07/2012.

FAO (2009). **Situación de los bosques del mundo. Informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.** Roma, Italia. Disponible en: <http://www.bioversityinternational.org>. Consulta: 06/05/2012.

FAO/IPGRI (1994). **Normas para Bancos de genes.** FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*). Roma, Italia. Disponible en: <http://www.bioversityinternational.org/publication/pubfile.asp?ID_PUB=1250> Consulta: 06/05/2012.

Franco, T. (2007). **Los Bancos de Germoplasma de las Américas – Informe especial de los recursos fitogenéticos. Documentation and Programme Information Specialist.** Bioversity International–Regional Office for the Americas c/o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Recursos Naturales y Ambiente/no. 53:81-8. Cali, Colombia. Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/informacion/RFCA/rev53/rna53_p81 _84.pdf>. Consulta: 06/07/2012.

Freuler, M. 2008. **Orquídeas 1ra Edición.** Editorial Albatros. pp. 8. ISBN 9502412184. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id=SjFbL4qd9-MC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Consulta: 06/07/2012.

Gobierno Provincial de Morona Santiago (2012). **Región Amazónica, provincia de Morona Santiago.** Disponible en: <http://www.moronasantiago.gob.ec>. Consulta: 07/05/2012.

González–Meneses, C. (2007). **Bancos De Germoplasma. Centro de Recursos Fitogenéticos.** Madrid, España. Disponible en: <http://bduimp.es/archivo/conferencias/pdf/08_10115_09_CeliadelaCuadra_idc3965.pdf>. Consulta: 07/05/2012.

Hartmann, T., D. Kester, F. Davies, R. Geneve (1997). ***Plant Propagation: Principles and Practices.*** Prentice-Hall International, London, 770 pp. En: Iriondo-Alegría, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1). Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, España. Disponible en: <http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf>. Consulta: 09/09/2012.

Hicks, A. (2000). ***Asymbiotic technique of orchid seed germination*.** Huber, R. (Ed.) Orchid Seed Bank Project (OSP). US. 135 p. En: Ossenbach, y otros 2006a. Almacenamiento de Semillas de diferentes Especies de Orquídeas para su Conservación en un Banco de Germoplasma I. Maduración, Viabilidad y Longevidad de Semillas. Disponible en: <http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/40_v3.1-04_OssenbachI.pdf>.Consulta: 13/06/2012.

Hodgson, M., R. Paine y N. Anderson (1991). ***Letts Guide to Orchids of the World. Letts Publishing.*** P. 2-14 and P. 229-232, 236 p. En: Kirby, S. y M. Muñoz. 2007. *Form And Checklist For The Description And Categorization Of Orchids In Field And Laboratory Work*. Lankester Botanical Garden, University of Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Disponible en: <http://www.bosquedepaz.com/description_of_orchids_in_the_field. pdf>. Consulta: 18/09/2012.

Hosomi, S., R. Santos, C. Custodio, P. Seaton, T. Marks y R. y N. Machado-Neto (2011). ***Preconditioning Cattleya seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability.*** Seed Sci. & Technol., 39, 1781189. Disponible en: <http://osssu.org/images/j-pegs/news/orchid-science-letters.pdf>. Consulta: 08/09/2012.

IGM (2008). **Instituto Geográfico Militar. Nuevo mapa político del Ecuador.** Escala 1: 4 000 000. Tamaño INEN A4. Disponible en: <http://www. igm.gob.ec/site/index.php?option=com_content&view=article&id=84:mapa-del-ecuador-uso-escolar-escala-140000 00&catid=41&Itemid=89>. Consulta: 13 /05/ 2012.

InfoStat (2008). **InfoStat, versión 2008**. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>. Consulta: 10/07/2012.

INIA (2009). **Cultivos de Tejido *in vitro*.** Instituto Nacional de Innovación Agraria. Lima, Perú. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/boletin/BCIT/boletin0003/ cultivos_de_ tejidos_in_vitro.htm>. Consulta: 27/06/2012.

INIAP (2008). **Informe Nacional sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación.** Quito, Ecuador. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Ecuador.pdf>. Consulta: 10/10/2012.

INTA (2012). **Biotecnología y Agricultura**. Disponible en: http://inta.gob.ar/documentos /biotecnologia-y-agricultura En: Argenbio (2012). Bancos de germoplasma: una reserva de alimentos para el futuro. Publicado: 22-08-2012. Disponible en: <http://www.argenbio.org/index. php?action=notas&note=6150>. Consulta: 18/09/2012.

Iriondo-Alegría, J. (2001). **Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas.** Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1). Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, España. Disponible en: <http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf>. Consulta: 09/09/2012.

ISTA (2006). ***International rules for seed testing.*** *Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.* En: Bachetta, y otros, (eds). 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Ministerio del Ambiente, del territorio y del mar, Italia. Disponible en: <http://www.conservacionvegetal. org/upload/publicaciones/28/Conserv-exsitu_Bachetta_et_al._eds.pdf>.Consulta: 06/05/2012.

Jiménez, E. (1995). **Propagación *in vitro* de la cana (*Saccharum ssp)*. Hibrido.** Tesis Doctorado UCLV, Cuba. En: Borges y otros, 2008. Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos nuciferas L.*) Revista Colombiana de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://redalyc. uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve= 77610213>. Consulta: 06/06/2012.

Jørgensen, M. y S. León-Yánez (eds.) (1999). **Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador.** Monografías en Botánica Sistemática del Jardín Botánico de Missouri Botanical Garden 75. Quito, Ecuador. Disponible en: <http://www.mobot.org/ mobot/research/ecuador/welcomesp.shtml>. Consulta: 13/06/2012.

Justice, O. y L. Bass (1978). ***Principles and practices of seed storage.*** USDA Handb. 506. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 289 pp. En: Iriondo-Alegría, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1). Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, España. Disponible en: <http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf>. Consulta: 09/09/2012.

Kitsaki, C., S. Zygouraki, M. Ziobora, y S. Chintziest (2004). ***In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae).*** Plant Cell Reports. 23:284–290. En: Salazar, S. y G. Cancino 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu. co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/31703/32917>.Consulta:17/09/2012.

Knudson, C. (1946). ***A new nutrient solution for the germination of orchid seed.*** American Orchid Society Bulletin 15: 214-217. En: Mayo, A. y otros (eds.), 2010. Germinación *in vitro* de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. División Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. Consulta: 17/09/2012.

Kuan, C. y L. González (1993). **Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas.** pp 1-16, 47-53, 75-76. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José de Costa Rica. UNIVERSIDAD EARTH - Biblioteca W.K. Kellogg. Disponible en: <http://www.metabase.net/docs/earth/11048.html>. Consulta: 18/09/2012.

Laliberté B. (1997). ***Botanic garden seed banks / genebanks worldwide, their facilities, collections and network.*** Botanic Gardens Conservation News 2, 18-23. En: Iriondo - Alegría, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1). Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, España. Disponible en: <http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf>. Consulta: 24/09/2012.

Lallana, H. y F. García (2010). **Puesta a punto de la prueba de tetrazolio en semillas de orquídeas.** Reunión de Comunicaciones Científicas de la Asoc. Cienc. Nat. Del Litoral. Proyecto PID-UNER 2144. Laboratorio de Cultivos Vegetales, Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina. Pp. 8. Disponible en: < http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/ deptos/catedras/WEBFV_2010/FVpdf/ Lallana_Germinacion%20Oncidium%20bifolium%20%20Sims.pdf >. Consulta: 13/06/2012.

Lara, J., C. Jijón, A. Rengifo y L. Hernández (2009). **Ecuador país de Orquídeas.** Publicación del Jardín Botánico de Quito y Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Quito. Consulta: 13/06/2012.

León-Yánez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa y H. Navarrete (eds.) (2011). **Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2ª edición.** Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica de Ecuador (PUCE), Quito. Consulta: 13/06/2012.

Leopardi, C., J. Veliz y L. Cumana (2009). **Orquideoflórula preliminar de la península de Araya y áreas adyacentes**, Estado Sucre, Venezuela. *Acta Bot. Venez.* [online]. 2009, Vol.32, No. 1 2012, pp. 159-177. ISSN 0084-5906. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid =S0084-59062009000100007&lng=en&nrm=iso>. Consulta: 12/10/12.

Lo, F., M. Nalawade, L. Kuo, L. Chen, y S. Tsay (2004). ***Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of Dendrobium Tosaense Makino – A medicinal important orchid. In vitro Cell.*** Dev. Biol.- Plant 40: 528-535. En: Mayo, A. y otros (eds.), 2010. Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. Consulta: 13/06/2012.

Lucke, E. (1971). **Estructura de las semillas y germinación de las orquídeas europeas después de las pruebas Veyret y más** (*Samenstruktur und Samenkeimung europaischer Orchideen nach Veyret sowie weitere Untersuchungen* I). *Die Orchidee*, 32: 182- 188. Disponible en: <http://kbd.kew.org/kbd/detailedresult.do?id= 62846>. Consulta: 19/09/2012.

MAGAP (2012). **Propuesta de Ley Orgánica de Agrobiodiversidad semillas y fomento Agroecológico.** Comisión técnica de Agrobiodiversiadad semillas y Agroecología. Conferencia Plurinacional e Interculturalidad de Soberania alimentaria. Versión final aprobada por el pleno de COPISA. Disponible en: <http://www.soberaniaalimentaria.gob.ec/pacha/wp-content/uploads/2012/03/PROPUESTA-LEYAGROBIODIVERSIDAD-SEMILLAAGROECOLOGIA1.pdf>. Consulta: 07/05/2012.

Margara, J. (1988). **Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: los meristemos y la organogénesis**. MundiPrensa 232 p. Madrid, España. En: Pedroza-Manrique, y otros (eds.) (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *in vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XII, núm. 2, diciembre, 2010, pp. 86-102. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf /776/77617808007.pdf>. Consulta: 21/09/2012.

Maxted, N., B. Ford-Lloyd y J.Hawkes (1997). ***Complementary Conservation Strategies. En: Plant Genetic Conservation.*** *The In Situ* Approach. Pp. 15-39. En: Iriondo - Alegría, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas**.** Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1). Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, España. Disponible en: <http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf>. Consulta: 09/09/2012.

Mayo, A., J. Cazares, E. De la Cruz y A. Flores (2010). **Germinación *in vitro* de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco.** División Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. ISBN:978-607-7557-30-2. Disponible en: <http://www. archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf>. Consulta: 06/05/2012.

Mckendrick, S. (2000). **Manual para la Germinación *in vitro* de orquídeas.** Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Programa Orquideológico de El Pahuma, Ecuador. Disponible en: <http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP). doc>. Consulta: 08/05/2012.

Menchucolor (2012). **Carta de Colores Monocromatica.** Disponible en: <http://menchucolor.blogspot.com/2009/11/de-la-escala-acromatica-al-color.html >. Consulta: 17/09/2012.

Mendoza, L. (2010). **Exposición virtual de Orquídeas – Semillas, testa, embriones y otras cosas.** Michoacán, México. Disponible en: <http://orquideas-katia.com/orquideas-expovirtual/index.htm>. Consulta: 05/05/2012.

Menini, L., R. Alves y R. Campostrini (2007). **La subtribu *Pleurothallidinae* (*Orchidaceae*) del Parque Estatal de Ibitipoca, Minas Gerais.** Sao Paulo. Brazil. Disponible en: <http://www.delfinadearaujo.com/on/on35/meninii/ meniniieng.htm>. Consulta: 17/10/2012.

Mitchell, R. (1989). ***Growing hardy orchids from seeds at Kew*.** Plantsman 11: 152-169. En: Verdugo, G. y otros. 2007. Caracterización morfométrica de la germinación de *Chloraea crispa lindl.* (*Orchidaceae*) usando Análisis de imagen. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Instituto de Ciencia y Tecnología, Universidad Arturo Prat, Puerto Montt, Chile. Consulta: 13/06/2012.

Montero, M. (2011). **XXXVII Exposición Nacional de Orquídeas, Ticorquídeas.** Asociación Costarricense de orquideología A.C.O. San José, Costa Rica. Disponible en: <http://www.ticorquideas.com/ticorquideas/Ticorquideas-5-11. pdf>. Consulta: 05/05/2012.

Morales, J. (2008). **Cultivo de Orquídeas.** Infojardin. Disponible en: <http://www. Infojardin.com>. Consulta: 05/05/2012.

Moreira-Muñoz, A. (2010). **Darwin alrededor de las Orquídeas.** Revista Universitaria UC, 104: 17-23. Argumento Darwin 2.0. Disponible en: <http://www.geo.puc.cl/pdf/moreira/Actualizaci%C3%B3n_Jul2010 /RU104 _articulo%20moreira.pdf>. Consulta: 21/05/2012.

Moreno, E. (1984). **Análisis físico y biológico de semillas agrícolas.** Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id=FTpGWUIoo4UC&pg=PA169&lpg=PA169&dq=prueba+de+viabilidad+de+semillas+con+tetrazolio&source=bl&ots=4uErpw_Pj1&sig=7oHUTghoMExn5P2N4bT_7dfhVlQ&hl=es&sa=X&ei=i0sXUKuNK4qq8ASA6IDYDQ&ved=0CGUQ6AEwBg#v=onepage&q=prueba%20de%20viabilidad%20de%20semillas%20con%20tetrazolio&f=false>. Consulta: 19/09/2012.

Murashige, T. y F. Skoog (1962). ***A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.*** Physiol. Plant. En: Mayo, A. y otros (eds.), 2010. Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. División Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. Pp. 473. Consulta: 21/05/2012.

Navarro, C. y J. Pizarro (2009). **Prácticas de Botánica Farmacéutica.** Departamento De Biología Vegetal II. Facultad De Farmacia Universidad Complutense, España. Disponible en <http://farmapuntes.wikispaces.com/file/view/Bot.Farm.+-+PR%C3%81CTICAS+ESPERMATOFITOS.pdf>. Consulta:27/06/2012.

Ossenbach, C., J. Arce y J. Warner (2006 a). **Almacenamiento de Semillas de diferentes Especies de Orquídeas para su Conservación en un Banco de Germoplasma I. Maduración, Viabilidad y Longevidad de Semillas.** Tierra Tropical (2007) 3 (1): 37 – 45. Revista de la Universidad Earth. ISSN: 1659 – 2751. Costa Rica. Disponible en: < http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/40_v3.104_OssenbachI.pdf> Consulta: 13/06/2012.

Ossenbach, C., J. Arce y J. Warner (2006 b). **Almacenamiento de Semillas de diferentes Especies de Orquídeas para su Conservación en un Banco de Germoplasma II. Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas.** Tierra Tropical (2007) 3 (1): 47 – 59. Revista de la Universidad Earth. ISSN: 1659 – 2751. Costa Rica. Disponible en:<http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/41_v3.1-05_OssenbachII.pdf>. Consulta: 13/06/2012.

Pedroza-Manrique, J., L. Serrato-Muñoz y M. Castaño-Robayo (2010). **Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *in vitro*.** Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XII, núm. 2, diciembre, 2010, pp. 86-102. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Disponible en:< http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf /776/77617808007.pdf>. Consulta: 21/09/2012.

Perrino, P. y M. Terzi (2003). ***Importanza della conservazione del germoplasma*.** En: Bressan M., Magliaretta L. & Pino S. (eds). Cereali del Veneto. Regione Veneto/Prov. Di Vicenza/Veneto Agricoltura. En: Bachetta y otros (eds). 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. España y Principado de Asturias, Obra social: La Caixa. Pp. 378. Disponible en: <http://www.conservacionvegetal.org/upload/publicaciones/28/Conserv-exsitu_Bachetta_et_al._eds.pdf>. Consulta: 06/05/2012.

Portilla, J. (2007). **Manual de Cultivo de las Orquídeas. Ecuagenera Cía. Ltda.** Orquídeas del Ecuador. Cuenca. Consulta: 07/04/2012.

Pupulin, F. (1998). **Revista biológica tropical.** Vol.46, n.4/2012, pp. 961-10317. ISSN 0034-7744. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441998000400009&lng=es&nrm=iso>. Consulta: 19/09/2012.

Rao, K., J. Hanson, E. Dulloo, K. Ghosh, D. Nowell y M. Larinde (2007). **Guía para el manejo eficaz de semillas en Bancos de Germoplasma.** Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia. ISBN 978-92-9043-757-4. Pp. 100 -145. Consulta: 07/04/2012.

Reid W. y K. Miller (1989). ***Keeping Options Alive. The Scientific Basis for Conserving Biodiversity.*** *World Resources Institute*, Washington, 128 pp. En: Iriondo - Alegría, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1). Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, España. Disponible en: <http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf>. Consulta: 24/09/2012.

Rioseco, P. (2010). **Ecuador empeñado en frenar deforestación Amazónica.** Corresponsal de Prensa Latina ensEcuador. Periódico en línea: Ecuador Inmediato. Disponible en: < http://www.ecuadorinmediato.com /Noticias/news_user_view/ecuador_empenado_en_frenar_deforestacion_en_amazonia--126191> Consulta: 24/08/2012.

Rojas, L., E. Moreno y B. Bohórquez (2009). **Proyecto Orquídeas.** Institución Educativa Panamericana Ventaquemada, México. Consulta: 06/05/2012.

Rosim, M. (2009). ***Stelis itatiayae.*** Disponible en: <http://www.flickr.com/fotos/rosim/3366057232/> Consulta: 19/09/2012.

Ruiz, L. (2000). **Amazonía Ecuatoriana. Escenario y actores del 2000.** Quito: EcoCiencia y Comité Ecuatoriano de la UICN, 2000. Disponible en: <http://www.flacsoandes.org/biblio/catalog/resGet.php?resId=43409>. Consulta: 19/09/2012.

Sahoo, L., M. Dadlani, D. Singh y S. Sharma (2000). ***Characterization of sunflower (Helianthus annuus L.) genotypes using laboratory techniques.*** *Plant Varieties and Seeds.* 13: 31-43. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/gbot/v64n2/ art08.pdf> Consulta: 09/09/2012.

Sahuquillo, E. (2008). **Guía de las orquídeas.** Xunta de Galicia. Consellería de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Disponible en: <http://www.medioruralemar.xunta.es/fileadmin/ arquivos/publicacions/ biodiversidade/áxi_orquideas_es.pdf >. Consulta: 12/04/2012.

Seaton, P. (2000). ***Growing orchids from seed*.** Part 1: Seed storage. Orchid Review 108: 55-110. En: Ossenbach, y otros, 2006 a. Almacenamiento de Semillas de diferentes Especies de Orquídeas para su Conservación en un Banco de Germoplasma I. Disponible en: <http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/40_ v3.104_Ossenbach I.pdf>. Consulta: 13/06/2012.

Segretín, M. (2007). **Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).** Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina. Disponible en:<http://www.argenbio.org/adc/ uploads/pdf/Cultivos %20celulares%20II%20Euge.pdf>. Consulta: 06/05/2012.

SINGER (2006). **Sistema de Información para Recursos Genéticos, siglas en inglés: SINGER.** Disponible en: <http://www. singer.cgiar.org/>. Consulta: 07/05/2012.

Singer, R. (2009). **Morfología floral y polinización de orquídeas: El Segundo Libro de Charles Darwin.** Vol.14, suppl.1 Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php? script=sci_arttext&pid=S0120548X2009000400021&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0120-548X. Consulta: 16/07/2012.

Ulloa, C. (2000). **Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri x Cattleya máxima* por cultivo de ápices.** Informe de Proyecto de Graduación para optar por el grado de Ingeniería en Biotecnología. Disponible en: < http://es.scribd.com/doc/ 51341112/9/Estructuras-vegetativas>. Consulta: 06/07/2012.

UTPL (2010). **Banco de Germoplasma, de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).** Disponible en: < www.utpl.edu.ec/>. *Consulta:* 07/05/2012.

Valencia, J. y E. Buitrago (2003). **Las orquídeas del río Ñambí.** Nariño, Colombia. Disponible en: <http://www.felca-colombia.org/texto/2inforquideas.pdf>. Consulta: 04/07/2012.

Vázquez, L. y N. Saltos (2009). **Ecuador su realidad.** Fundación de Investigación y Promoción Social "José Peralta". XVII Edición. Quito, Ecuador. Pp. 103. Consulta: 04/07/2012.

Walter, K. (1979). **Orquídeas.** Traducido por: Luis Diego Gómez. San José de Costa Rica. En: Ulloa, C. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri x Cattleya máxima* por cultivo de ápices. Disponible en: < http://es.scribd.com/doc/51341112/9/Estructuras-vegetativas >. Consulta: 06/07/2012.

WIEWS (2007). **Sistema Mundial de Información y Alerta Rápida, siglas en inglés: WIEWS**. Disponible en: <http://apps3.fao.org/wiews/wiews.jsp>. Consulta: 07/05/2012.

ANEXOS

ANEXO 1: AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PARA FLORA X, OTORGADO POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE.

Ministerio del Ambiente

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

No. 17-2011 - INVESTIGACIÓN –B- DPMS/MAE

FLORA X

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: **Nelly Silvana Cárdenas Rodríguez**, con Cédula de ciudadanía No. 140073013-9 de nacionalidad Ecuatoriana, y **Andrea Mercedes Cruz Aldeán** con Cédula de ciudadanía No. 110472408-1 de nacionalidad Ecuatoriana, para que lleven a cabo la investigación **"COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE LA ORCHIDACEAE DEL CANTON SANTIAGO DE MÉNDEZ- MORONA SANTIAGO."**

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1.- Solicitud con oficio sin número con fecha 01 de Diciembre del 2011, emitido por: Dr. Marco Cerna, Docente de la Universidad Politécnica Salesiana y el oficio No. 12-06-53 Macas 06 de Diciembre del 2011.

2.- Valoración técnica del proyecto: Víctor León.

3.- Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna.

4.- Institución Científica Nacional Responsable: Universidad Politécnica Salesiana (Ecuador).

5.- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Zootecnista Víctor León Caldas, Responsable del Parque Nacional Sangay (zona baja).

6.- Complementos autorizados de la Investigación: Colección de germoplasmas de Orquídeas.

7.- Duración: Desde el 08 de Diciembre del 2011 al 07 de Diciembre del 2012.

8.- Obligaciones del Investigador:
Entregar 2 copias en formato impreso y digital de los resultados finales de la investigación en castellano.
Entregar copia de las fotografías (impreso y digital) que formen parte de la investigación.
Entregar copias en formato impreso del informe final de investigación.
Entregar al Ministerio del Ambiente el registro de las especies objeto de la investigación, en formato digital, incluyendo la localización exacta de los especímenes observados o colectados con las coordenadas UTM

ANEXO 1: AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PARA FLORA X, OTORGADO POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE

Ministerio del Ambiente

9.- Obligaciones de la Institución Científica Nacional Responsable: del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se Responsabiliza Banco de Germoplasma de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito, representado por su Directora la Dr. Marco Cerna.
Cumplir con los plazos de entrega de informes finales o parciales.
Informar a la dependencia correspondiente del Ministerio del Ambiente sobre irregularidades cometidas por los investigadores.
Respetar y hacer cumplir los aspectos técnicos, legales y administrativos a los que los investigadores estén obligados a ejecutar.

10.- Como garantía para el complimiento de la ejecución de la investigación, entrega copia de depósito Nro. 2578918, por un valor de veinte dólares ($ 20,00) depositados en el Banco Nacional de Fomento, en la cuenta corriente 0010000785 del Ministerio del Ambiente.

Macas, 08 de Diciembre del 2011

DIRECCIÓN PROVINCIAL DE MORONA SANTIAGO
Ministerio del Ambiente

Blgo. Favian Mosquera Ordóñez.
DIRECTOR DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE MORONA SANTIAGO

ANEXO 2: CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DEL PERMISO DE INVESTIGACIÒN CON FLORA EN ECUADOR

SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LA PROVINCIA DE MORONA SANTIAGO, CANTÓN SANTIAGO, PARROQUIAS (Méndez Copal y tres Ranchos) con las coordenadas:

Sector C – La Delicia 2º 44' 46''S 78º19' 06.31''O.
Copal 17M, 1407m. 2° 40' 57.61'' S78° 24' 00.14'' O
Tres Ranchos: 17M, 963m. 2° 44' 34.18'' S 78° 25' 05.90'' O

ESTA AUTORIZACIÓN **(SI)** FACULTA PARA LA COLECCIÓN DE MUESTRAS, MISMAS QUE NO PODRÁN SER UTILIZADAS COMO MATERIAL PARENTAL PARA MANEJO COMERCIAL. ESTE DOCUMENTO SI HABILITA LA EXPORTACIÓN PARA IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS COLECTADAS. ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN. LAS MUESTRAS COLECTADAS NO PODRÁN SER UTILIZADOS PARA CUALQUIER ACTIVIDAD DE BIOPROSPECCIÓN. LAS MUESTRAS COLECTADAS NO PODRÁN SER UTILIZADOS PARA EL ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS.

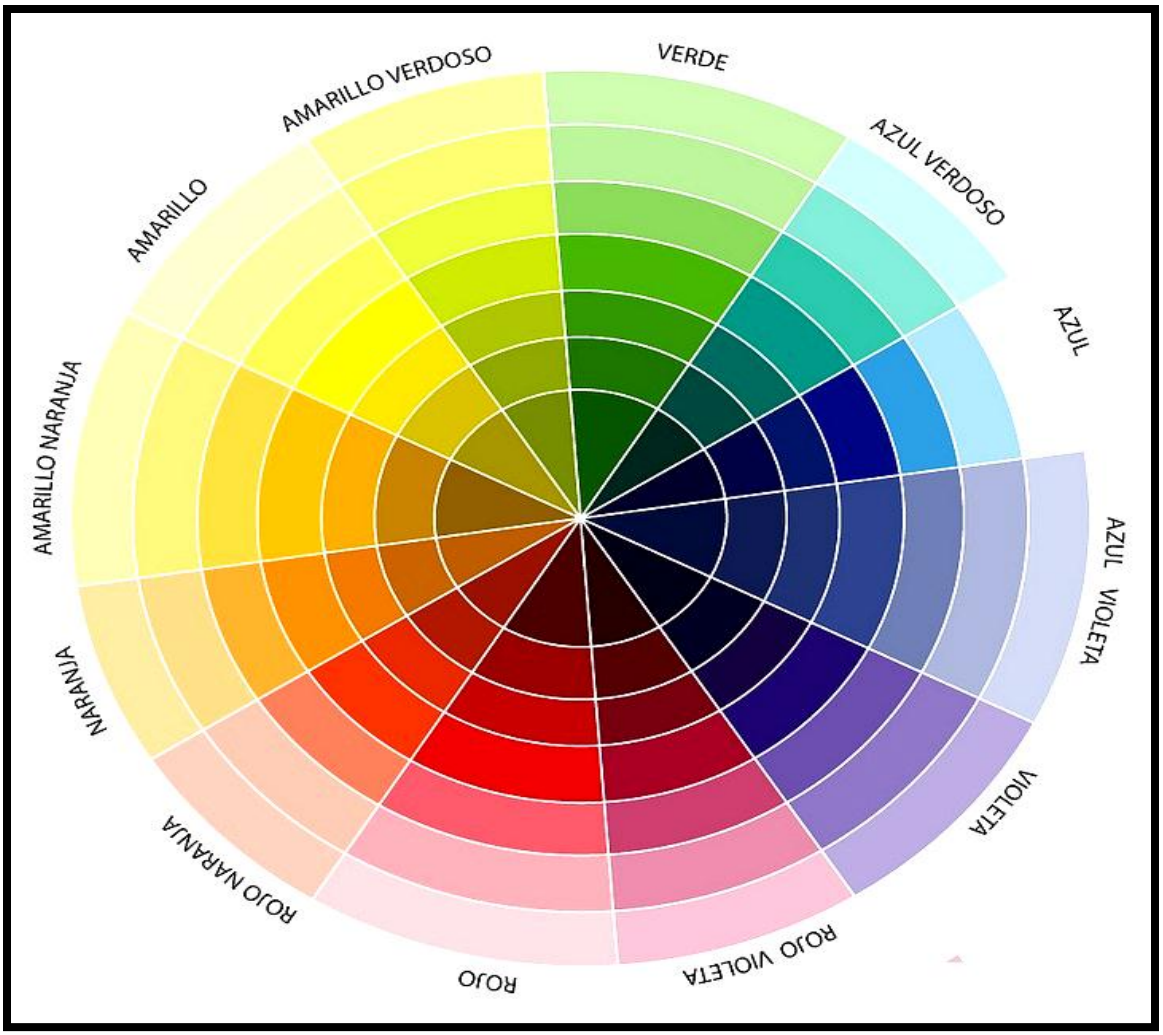
ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DEBERÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO COMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAÍDAS POR LOS INVESTIGADORES, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES/ FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.

EN CASO DE PRÓRROGA, SE SOLICITARA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.EL REGISTRO DE LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS MUESTRAS COLECTADOS U OBSERVADOS ASÍ COMO EL INFORME PARCIAL O FINAL DEBERÁ SER ENTREGADO EN FORMATO DIGITAL PDF (INCLUYENDO INFORMACIÓN SOBRE LAS COORDENADAS UTM) PARA LA PÁGINA WEB DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.

EN CASO DE QUE LA INVESTIGACIÓN PRODUZCA INFORMES PARCIALES, ESTOS DEBERÁN ESTAR CONTEMPLADOS EN EL INFORME FINAL TANTO FORMATO IMPRESO COMO DIGITAL. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE CODIFICADA, TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÒN.

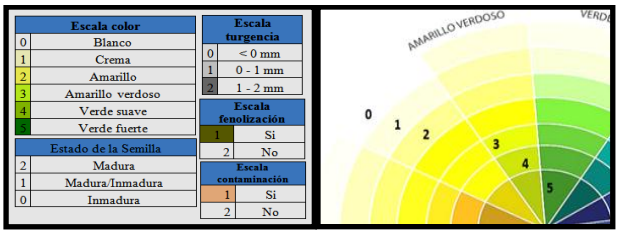
LA TASA POR CONCEPTO DE EMISIÓN DE AUTORIZACIÓN ES DE: USD$ 20 (veinte dólares), DEPOSITADA EN LA CUENTA 0010000785 DEL BANCO NACIONAL DE FOMENTO PAPELETA No. 2578918.

ANEXO 3: CARTA DE COLORES, USADA PARA IDENTIFICACIÓN VISUAL POR COLORES EN LA EVALUACIÓN DE VARIABLES EN GERMINACIÓN *IN VITRO*



Fuente: Menchucolor, 2012.

ANEXO 4: EVALUACIÓN DE VARIABLES EN GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS EN ESTUDIO, A TRAVÉS DE ESCALAS NUMÉRICAS



Escala color	
0	Blanco
1	Crema
2	Amarillo
3	Amarillo verdoso
4	Verde suave
5	Verde fuerte

Estado de la Semilla	
2	Madura
1	Madura/Inmadura
0	Inmadura

Escala turgencia	
0	< 0 mm
1	0 - 1 mm
2	1 - 2 mm

Escala fenolización	
1	Si
2	No

Escala contaminación	
1	Si
2	No

Fecha de Cosecha de Cápsulas	Fecha de Siembra *in vitro*	# de Repetición	Código de semilla	Tratamiento	Turgencia	Color	Fenolización	Contaminación	Estado de la Semilla
6 Junio	11 Junio	1	2108	T1	0	1	1	2	1
6 Junio	11 Junio	2	2108	T1	0	1	1	2	1
6 Junio	11 Junio	1	2108	T2	0	1	1	1	1
6 Junio	11 Junio	2	2108	T2	0	1	1	1	1
6 Junio	11 Junio	1	2108	T3	0	1	1	1	1
6 Junio	11 Junio	2	2108	T3	0	1	1	1	1
6 Junio	11 Junio	1	2108	T4	0	1	1	1	1
6 Junio	11 Junio	2	2108	T4	0	1	1	1	1
6 Junio	11 Junio	1	2108	T5	0	1	1	1	1
6 Junio	11 Junio	2	2108	T5	0	1	1	1	1
16 Junio	18 Junio	1	2113	T1	2	3	2	2	1
16 Junio	18 Junio	2	2113	T1	1	3	2	2	1
16 Junio	18 Junio	1	2113	T2	0	1	2	1	1
16 Junio	18 Junio	2	2113	T2	0	1	2	1	1
16 Junio	18 Junio	1	2113	T3	1	2	2	2	1
16 Junio	18 Junio	2	2113	T3	1	2	2	2	1
16 Junio	18 Junio	1	2113	T4	1	5	2	2	1
16 Junio	18 Junio	2	2113	T4	2	5	2	2	1
16 Junio	18 Junio	1	2113	T5	0	1	2	1	1
16 Junio	18 Junio	2	2113	T5	0	1	2	1	1
23 Julio	24 Julio	1	2131	T1	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	2	2131	T1	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	1	2131	T2	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	2	2131	T2	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	1	2131	T3	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	2	2131	T3	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	1	2131	T4	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	2	2131	T4	2	5	2	2	1
23 Julio	24 Julio	1	2131	T5	2	5	2	2	1

Fecha de Cosecha de Cápsulas	Fecha de Siembra *in vitro*	# de Repetición	Código de semilla	Tratamiento	Turgencia	Color	Fenolización	Contaminación	Estado de la Semilla
23 Julio	24 Julio	2	2131	T5	2	5	2	2	1
06 Abril	09 Abril	1	2151	T1	2	1	2	2	1
06 Abril	09 Abril	2	2151	T1	2	5	2	2	1
06 Abril	09 Abril	1	2151	T2	1	0	2	2	1
06 Abril	09 Abril	2	2151	T2	1	0	2	2	1
06 Abril	09 Abril	1	2151	T3	1	0	2	2	1
06 Abril	09 Abril	2	2151	T3	0	0	1	1	1
06 Abril	09 Abril	1	2151	T4	1	0	2	2	1
06 Abril	09 Abril	2	2151	T4	1	0	2	2	1
06 Abril	09 Abril	1	2151	T5	1	0	2	2	0
06 Abril	09 Abril	2	2151	T5	1	0	2	1	0
06 Abril	09 Abril	1	2152	T1	1	1	1	2	0
06 Abril	09 Abril	2	2152	T1	1	3	2	2	0
06 Abril	09 Abril	1	2152	T2	1	3	2	2	0
06 Abril	09 Abril	2	2152	T2	1	1	2	1	0
06 Abril	09 Abril	1	2152	T3	0	0	2	1	0
06 Abril	09 Abril	2	2152	T3	0	0	2	1	1
06 Abril	09 Abril	1	2152	T4	1	3	2	2	1
06 Abril	09 Abril	2	2152	T4	1	1	2	1	1
06 Abril	09 Abril	1	2152	T5	0	0	2	1	1
06 Abril	09 Abril	2	2152	T5	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2090	T1	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2090	T1	0	0	2	1	0
11 Mayo	14 Mayo	1	2090	T2	1	4	2	2	0
11 Mayo	14 Mayo	2	2090	T2	1	4	2	2	0
11 Mayo	14 Mayo	1	2090	T3	0	0	2	1	0
11 Mayo	14 Mayo	2	2090	T3	0	0	2	1	0
11 Mayo	14 Mayo	1	2090	T4	1	4	2	2	0
11 Mayo	14 Mayo	2	2090	T4	1	4	2	2	0
11 Mayo	14 Mayo	1	2090	T5	0	0	2	1	0
11 Mayo	14 Mayo	2	2090	T5	0	0	2	1	0
11 Mayo	14 Mayo	1	2094	T1	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2094	T1	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2094	T2	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2094	T2	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2094	T3	1	1	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2094	T3	1	1	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2094	T4	1	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2094	T4	1	0	2	2	1

Fecha de Cosecha de Cápsulas	Fecha de Siembra *in vitro*	# de Repetición	Código de semilla	Tratamiento	Turgencia	Color	Fenolización	Contaminación	Estado de la Semilla
11 Mayo	14 Mayo	1	2094	T5	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2094	T5	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2096	T1	1	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2096	T1	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2096	T2	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2096	T2	0	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2096	T3	1	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2096	T3	1	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2096	T4	1	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2096	T4	1	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2096	T5	0	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2096	T5	0	0	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2097	T1	1	1	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2097	T1	2	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2097	T2	1	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2097	T2	1	0	2	1	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2097	T3	1	1	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2097	T3	1	1	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2097	T4	1	2	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2097	T4	1	2	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	1	2097	T5	1	2	2	2	1
11 Mayo	14 Mayo	2	2097	T5	1	1	2	1	1
16 Junio	18 Junio	1	2046	T1	0	1	2	2	0
16 Junio	18 Junio	2	2046	T1	0	1	2	2	0
16 Junio	18 Junio	1	2046	T2	1	1	1	2	0
16 Junio	18 Junio	2	2046	T2	1	1	1	1	0
16 Junio	18 Junio	1	2046	T3	1	1	1	2	0
16 Junio	18 Junio	2	2046	T3	1	1	1	2	0
16 Junio	18 Junio	1	2046	T4	1	1	1	2	0
16 Junio	18 Junio	2	2046	T4	1	1	1	2	0
16 Junio	18 Junio	1	2046	T5	1	1	1	2	0
16 Junio	18 Junio	2	2046	T5	1	1	1	2	0
6 Junio	11 Junio	1	2153	T1	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2153	T1	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2153	T2	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2153	T2	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2153	T3	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2153	T3	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2153	T4	1	4	2	2	0

Fecha de Cosecha de Cápsulas	Fecha de Siembra *in vitro*	# de Repetición	Código de semilla	Tratamiento	Turgencia	Color	Fenolización	Contaminación	Estado de la Semilla
6 Junio	11 Junio	2	2153	T4	1	4	2	2	0
6 Junio	11 Junio	2	2153	T5	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2153	T5	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2038	T1	1	1	1	2	0
6 Junio	11 Junio	2	2038	T1	1	1	1	2	0
6 Junio	11 Junio	1	2038	T2	1	1	1	2	0
6 Junio	11 Junio	2	2038	T2	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2038	T3	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2038	T3	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2038	T4	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2038	T4	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2038	T5	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2038	T5	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2066	T1	2	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2066	T1	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2066	T2	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2066	T2	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2066	T3	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2066	T3	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	1	2066	T4	1	4	2	2	1
6 Junio	11 Junio	2	2066	T4	1	4	2	2	1
6 Junio	11 Junio	1	2066	T5	1	1	1	1	0
6 Junio	11 Junio	2	2066	T5	1	1	1	1	0
6 Abril	9 Abril	1	2127	T1	1	2	1	2	0
6 Abril	9 Abril	2	2127	T1	1	2	1	2	0
6 Abril	9 Abril	1	2127	T2	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	2	2127	T2	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	1	2127	T3	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	2	2127	T3	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	1	2127	T4	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	2	2127	T4	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	1	2127	T5	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	2	2127	T5	0	1	1	2	0
6 Abril	9 Abril	1	2128	T1	0	2	2	2	0
6 Abril	9 Abril	2	2128	T1	0	2	2	2	0
6 Abril	9 Abril	1	2128	T2	0	2	2	1	0
6 Abril	9 Abril	2	2128	T2	0	2	2	1	0
6 Abril	9 Abril	1	2128	T3	0	2	2	1	0
6 Abril	9 Abril	2	2128	T3	0	2	2	1	0
6 Abril	9 Abril	1	2128	T4	0	2	2	1	0

ANEXO 5: LISTA ACTUAL DE LAS ORQUÍDEAS ENDÉMICAS PRESENTES EN LA PROVINCIA DE MORONA SANTIAGO

No.	Nombre científico	Hábito	Herbario	Libro Rojo
1	*Ackermania caudata*	Epí.	QCNE (2)	NT *
2	*Acostea trilobata*	Epí.	QCNE (2)	NT
3	*Acronia tobari*	Epí.	Ninguno?	VU D2 *†
4	*Ada andreettae*	Epí.	QCNE (1)	VU B1 ab(iii) *
5	*Barbosella portillae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
6	*Baskervilla pastasae*	Ter.	QCNE (2), QCA(1)	LC *
7	*Brachionidium capillare*	Ter.	Ninguno	VU B1 ab(iii) *
8	*Brachionidium condorense*	Ter.	QCNE (HT)	VU B1 ab(iii) *
9	*Brachionidium deflexum*	Ter.	QCNE (T)	VU B1 ab(iii) *†
10	*Brachionidium dodsonii*	Ter.	QCNE (1?)	VU D2
11	*Brachionidium ecuadorense*	Lit.	Ninguno	VU D2 *
12	*Brachionidium ephemerum*	Epí.	Ninguno	VU B1 ab(iii)
13	*Brachionidium galeatum*	Ter.	Ninguno	VU B1 ab(iii) *
14	*Brachionidium piuntzae*	Epí.	Ninguno	EN
15	*Brachionidium portillae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
16	*Brachionidium simplex*	Ter.	Ninguno	VU D2 *
17	*Brachionidium stellare*	Ter.	Ninguno	VU D2 *†
18	*Brachycladium (Peduncella) ciliare*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
19	*Brachycladium (Peduncella) viebrockianum*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
20	*Catasetum napoënse*	Epí.	QCNE (2)	VU B1 ab(iii) *
21	*Chaubardiella dalessandroi*	Epí.	QCNE (2)	EN B1 ab(iii) *
22	*Chondrorhyncha suarezzii*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
23	*Chondrorhyncha velastiguii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
24	*Cischweinfa popowiana*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
25	*Cischweinfa suarezii*	Epí.	QCNE (4), QCA (1)	VU D2 *
26	*Crossoglossa pichinchae*	Epí.	GUAY (1), QCA (1)	VU D2 *
27	*Crossoglossa steinii*	Ter.	Ninguno	VU D2 *†
28	*Cyclopogon condoranus*	Ter.	Ninguno	VU D2 *†
29	*Cyclopogon hirtzii*	Ter.	Ninguno	VU D2 *†
30	*Cyrtochilum lamelligerum*	Epí.	Ninguno	VU D2
31	*Cyrtochilum pastasae*	Epí.	QCA (2), LOJA (1)	NT *
32	*Dichaea chiquindensis*	Epí.	Ninguno	DD *
33	*Dichaea cleistogama*	Epí.	QCA (1)	VU D2 *
34	*Dichaea hirtzii*	Epí.	QCNE (1), QCA (2)	NT *
35	*Dichaea luerorum*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
36	*Dichaea moronensis*	Epí.	Ninguno	EN B1 ab(iii) *†
37	*Dichaea sodiroi*	Epí.	LOJA (1), QCA (3),	NT *
38	*Dichaea suarezii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
39	*Dracula hirsuta*	Epí.	Ninguno	EN A4d; B1ab(iii) *
40	*Dracula lotax*	Epí.	Ninguno	VU A4d *
41	*Dracula portillae*	Epí.	Ninguno	EN A4d; B1ab(iii) *
42	*Dracula rezekiana*	Epí.	Ninguno	VU A4d *
43	*Dracula simia*	Epí.	QCNE (2)	VU A4d; B1ab(iii)*
44	*Dresslerella caesariata*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
45	*Dresslerella lasiocampa*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
46	*Dresslerella portillae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
47	*Elleanthus ecuadorensis*	Ter. o Epí.	QCA (5), QCNE (14)	LC *
48	*Elleanthus porcophyllus*	Ter.	LOJA (2), QAP (1), QAC	NT
49	*Elleanthus vernicosus*	Ter.	GUAY (1), QCA (3)	NT *
50	*Epidendrum alexii*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
51	*Epidendrum ampelospathum*	Epí. o Lit.	LOJA (1), QCNE (T)	VU D2
52	*Epidendrum arevaloides*	Epí. o Ter.	QCNE (1+T)	VU B1ab(iii) *
53	*Epidendrum asplundii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
54	*Epidendrum atonum*	Epí.	LOJA, QCA, QCNE (Ilustraciones)	VU B1ab(iii) *†
55	*Epidendrum baezaense*	Epí.	QCA (3), QCNE (4+T)	VU D2 *
56	*Epidendrum bonitense*	Epí.	QCA (1), QCNE (3+T)	VU B1ab(iii) *
57	*Epidendrum boscoense*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
58	*Epidendrum calagrense*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
No.	**Nombre científico**	**Hábito**	**Herbario**	**Libro Rojo**

59	*Epidendrum campylorhachis*	Ter.	QCNE (1+T)	EN B1ab(iii) *
60	*Epidendrum chiguindense*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *†
61	*Epidendrum cuchibambae*	Epí.	QCA (2)	NT
62	*Epidendrum dialyrhombicum*	Epí. o Ter.	QCA (1), QCNE (T)	VU D2 *
63	*Epidendrum falcisepalum*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
64	*Epidendrum guacamayense*	Ter.	QCA (3), QCNE (7)	NT
65	*Epidendrum gualaquicense*	Epí.	QCA (T)	VU D2 *†
66	*Epidendrum harlingii*	Ter.	QCA (1), QCNE (2)	VU D2
67	*Epidendrum homoion*	Epí.	QCA (1), QCNE (T)	VU D2
68	*Epidendrum hugomedinae*	Epí.	Ninguno	DD *†
69	*Epidendrum imitans*	Epí. o Ter.	QCA (1), QCNE (2)	VU B1ab(iii) *
70	*Epidendrum indanzense*	Ter.	QCNE (T)	VU B1ab(iii) *
71	*Epidendrum indecoratum*	Epí.	QCA (2), QCNE (4)	VU D2 *
72	*Epidendrum insignificans*	Ter.	QCA (2), QCNE (2)	EN B1ab(iii) *
73	*Epidendrum jaramilloii*	Ter.	QCA (1), QCNE (6+T)	NT
74	*Epidendrum jatunsachanum*	Epí.	QCA (1)	NT *
75	*Epidendrum jessupiorum*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
76	*Epidendrum lembotylosum*	Ter.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
77	*Epidendrum llaviucoense*	Epí.	Ninguno	VU D2
78	*Epidendrum lueri*	Epí.	Ninguno	NT *
79	*Epidendrum llumbaquiense*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
80	*Epidendrum macasense*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
81	*Epidendrum madsenii*	Epí.	QCA (2), QCNE (3)	VU D2 *
82	*Epidendrum melanotrichoides*	Ter. o Epí.	QCNE (3), QCA (2)	LC *
83	*Epidendrum moronense*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
84	*Epidendrum neolehmannia*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
85	*Epidendrum ophiochilum*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
86	*Epidendrum opiranthizon*	Epí.	QCNE (2)	VU D2
87	*Epidendrum pergracile*	Epí.	Ninguno	NT
88	*Epidendrum portokalium*	Epí.	QCA (3), QCNE (T+4)	LC *
89	*Epidendrum pterostele*	Epí.	QCNE (3)	VU D2
90	*Epidendrum rhodoides*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
91	*Epidendrum suinii*	Epí.	QCNE (1+T)	VU D2 *
92	*Epidendrum thompsonii*	Ter.	QCNE (T)	VU D2 *
93	*Epidendrum troxalis*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
94	*Epidendrum upanodifforme*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *
95	*Epilyna embreei*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
96	*Erythrodes callophylloides*	Ter.	Ninguno	VU D2 *
97	*Gonphichis crassilabia*	Ter.	QCA (1), QCNE (1)	NT
98	*Gongora gracilis*	Epí.	QCNE (3)	NT *
99	*Gongora pardina*	Epí.	QCNE (6)	NT *
100	*Ixyophora viridisepala*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
101	*Kefersteinia andreettae*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
102	*Kefersteinia hirtzii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
103	*Lephantes allector*	Epí.	QCNE (2)	NT *
104	*Lephantes alopex*	Epí.	QCNE (2)	EN B1ab(iii) *
105	*Lephantes andreettae*	Epí.	Ninguno	DD *†
106	*Lephantes asoma*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
107	*Lephantes aurita*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
108	*Lephantes calliope*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
109	*Lephantes caloura*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
110	*Lephantes calypso*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
111	*Lephantes carinata*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
112	*Lephantes chilopsis*	Epí.	Ninguno	VU D2 †
113	*Lephantes clandestina*	Epí.	QCNE (3)	VU B1ab(iii)
114	*Lephantes columbar*	Epí.	QCNE (1)	NT *
115	*Lephantes condorensis*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
116	*Lephantes craticia*	Ter. o Epí.	QCNE (2)	NT
117	*Lephantes crista-pulli*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
118	*Lephantes decurva*	Epí. o Ter.	QCNE (2)	VU D2 *
119	*Lephantes delhierroi*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
120	*Lephantes dictydion*	Epí.	QCNE (1)	NT *
121	*Lephantes disjuncta*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii)
No.	**Nombre científico**	**Hábito**	**Herbario**	**Libro Rojo**
122	*Lephantes eriocampa*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *

123	*Lephantes exigua*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
124	*Lephantes flexuosa*	Epí. o Lit.	QCNE (1)	VU B1ab(iii)
125	*Lephantes gemmula*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
126	*Lephantes glomerulosa*	Epí	Ninguno	VU B1ab(iii) *
127	*Lephantes hispidosa*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
128	*Lephantes homotaxis*	Epí.	QCNE (1)	NT
129	*Lephantes hymenoptera*	Epí.	QCNE (2)	NT *
130	*Lephantes imitator*	Epí.	QCNE (1)	LC *
131	*Lephantes implexa*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
132	*Lephantes inaequisepala*	Epí.	Ninguno	DD *†
133	*Lephantes inamoena*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
134	*Lephantes ingridiana*	Epí.	Ninguno	EN B2ab(iii)*†
135	*Lephantes jackinpyxa*	Epí.	QCNE (2+T)	VU D2 *
136	*Lephantes lophius*	Epí.	QCNE (2)	VU A4d; D2 *†
137	*Lephantes maxillaris*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
138	*Lephantes meganthera*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
139	*Lephantes melpomene*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
140	*Lephantes narcissus*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
141	*Lephantes neillii*	Epí.	QCA (T), QCNE (T)	VU D2 *†
142	*Lephantes ortegae*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
143	*Lephantes papirophylla*	Epí.	QCNE (3)	VU D2 *
144	*Lephantes pecunialis*	Epí.	QCA (2), QCNE (8)	LC *
145	*Lephantes phrixothrix*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
146	*Lephantes polythricha*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
147	*Lephantes privigna*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
148	*Lephantes protuberans*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
149	*Lephantes pubes*	Epí.	QCNE (2)	VU B1ab(iii) *
150	*Lephantes pubescens*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
151	*Lephantes quaternaria*	Epí.	QCNE (4)	NT
152	*Lephantes rigidigitata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
153	*Lephantes rudicula*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
154	*Lephantes ruthiana*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *
155	*Lephantes schizura*	Epí.	QCNE (1)	NT *
156	*Lephantes sigsigensis*	Epí.	QCA (1), QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
157	*Lephantes silenus*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
158	*Lephantes stegastes*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
159	*Lephantes surrogata*	Epí.	QCNE (1)	EN B1ab(iii)*
160	*Lephantes tectorum*	Epí.	QCNE (3)	VU D2 *†
161	*Lephantes uxoria*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
162	*Lephantes velata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
163	*Lephantes ximenae*	Epí.	Ninguno	NT *
164	*Luzama gemmula*	Epí.	Ninguno	DD *†
165	*Lycaste andreettae*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
166	*Macroclinium dalströmii*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
167	*Macroclinium hirtzii*	Epí.	Ninguno	VU D2
168	*Masdevallia albella*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
169	*Masdevallia ampullacea*	Epí.	Ninguno	NT
170	*Masdevallia andreettaeana*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
171	*Masdevallia anemone*	Epí.	Ninguno	VU A4c; D2 *†
172	*Masdevallia aurea*	Epí.	Ninguno	VU A4d; D2 *
173	*Masdevallia berthae*	Epí.	Ninguno	VU A4d; D2 *†
174	*Masdevallia bicornis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
175	*Masdevallia blanda*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
176	*Masdevallia bottae*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
177	*Masdevallia brachyura*	Epí.	QCA (1), QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
178	*Masdevallia calagrasalis*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
179	*Masdevallia calocalix*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
180	*Masdevallia carmenensis*	Epí.	QCNE (1)	En A4c *
181	*Masdevallia carruthersiana*	Epí.	QCNE (2)	NT *
182	*Masdevallia crassicaulis*	Epí.	Ninguno	VU A4d; D2 *†
183	*Masdevallia cylix*	Epí.	Ninguno	En A4c *
184	*Masdevallia deformis*	Epí.	QCA (1), QCNE (4)	VU A4c; B1ab(iii) *
185	*Masdevallia descendens*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
186	*Masdevallia don-quijote*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
No.	**Nombre científico**	**Hábito**	**Herbario**	**Libro Rojo**
187	*Masdevallia draconis*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*

188	*Masdevallia ejiriana*	Epí.	Ninguno	VU A4d; D2 *
189	*Masdevallia eurynogaster*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
190	*Masdevallia excelsior*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
191	*Masdevallia expers*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *Ŧ
192	*Masdevallia fractiflexa*	Epí.	QCA (1)	VU B1ab(iii) *
193	*Masdevallia glomerosa*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
194	*Masdevallia guerrieroi*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
195	*Masdevallia hercules*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*Ŧ
196	*Masdevallia ivanii*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*Ŧ
197	*Masdevallia lenae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
198	*Masdevallia limax*	Epí.	QCNE (2)	VU A4d*
199	*Masdevallia magaliana*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*Ŧ
200	*Masdevallia mallii*	Epí.	Ninguno	DD *Ŧ
201	*Masdevallia manchinazae*	Epí.	QCNE (1)	EN B1ab(iii)*Ŧ
202	*Masdevallia maxilimax*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
203	*Masdevallia medinae*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*Ŧ
204	*Masdevallia milagroi*	Epí.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
205	*Masdevallia morochoi*	Epí.	QCNE (1)	EN B1ab(iii)*Ŧ
206	*Masdevallia panguiensis*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
207	*Masdevallia pantomima*	Epí.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
208	*Masdevallia patriciana*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
209	*Masdevallia patula*	Epí.	Ninguno	VU A4d*
210	*Masdevallia persicina*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
211	*Masdevallia portillae*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
212	*Masdevallia revoluta*	Epí.	Ninguno	VU A4d; D2 *
213	*Masdevallia rex*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
214	*Masdevallia sanchezii*	Epí.	QCNE (1)	VU A4d*
215	*Masdevallia sanctae-inesae*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
216	*Masdevallia sanguinea*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
217	*Masdevallia schudelii*	Epí.	Ninguno	DD *
218	*Masdevallia trautmanniana*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
219	*Masdevallia truncata*	Epí.	Ninguno	DD *Ŧ
220	*Masdevallia vidua*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii)*
221	*Masdevallia virens*	Epí.	Ninguno	VU A4d *
222	*Masdevallia virgo- cuencae*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
223	*Masdevallia wuelfinghoffiana*	Epí.	Ninguno	En A4c *
224	*Maxillaria augustae-victoriae*	Epí. o Lit.	Ninguno	VU D2 *
225	*Maxillaria (Camaridium) bomboizensis*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *Ŧ
226	*Maxillaria (Mormolyca) chacoensis*	Epí.	QCA (2), QCNE (3)	LC
227	*Maxillaria dallessandroi*	Epí.	Ninguno	LC *
228	*Maxillaria (Ornithidium) gualaquizensis*	Ter.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
229	*Maxillaria perryae*	Epí.	QCNE (3)	NT
230	*Maxillaria (Maxillariella) stictantha*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
231	*Maxillaria thurstoniorum*	Epí.	QCNE (2)	NT *
232	*Maxillaria (Maxillariella) vulcanica*	Epí. o Ter.	LOJ (2), QCA (9), QCNE	LC
233	*Maxillaria whittenii*	Epí.	QCNE (2)	NT *
234	*Mesospinidium ecuadorense*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
235	*Mormodes variabilis*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
236	*Mormolyca polyphylla*	Epí.	QCA (2), QCNE (2)	NT *
237	*Myoxanthus dasyllis*	Epí. o Ter.	Ninguno	NT *
238	*Myoxanthus georgei*	Epí.	QCNE (3)	VU B1ab(iii) *
239	*Myoxanthus gorgon*	Epí.	Ninguno	NT *
240	*Myoxanthus merae*	Epí.	Ninguno	NT *
241	*Myoxanthus xiphion*	Epí.	QCNE (1)	NT *
242	*Notylia ecuadorensis*	Epí.	QCNE (4)	VU D2
243	*Octomeria auriculata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
244	*Octomeria dalstroemii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
245	*Octomeria medinae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
246	*Octomeria rotundata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
247	*Octomeria ximenae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *Ŧ
248	*Odontoglossum helgae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
249	*Oliveriana ecuadorensis*	Epí.	QCA (1)	VU B1ab(iii) *
250	*Oncidium echinops*	Epí.	QCA (1+T), QCNE (1)	VU D2 *
No.	**Nombre científico**	**Hábito**	**Herbario**	**Libro Rojo**
251	*Oncidium harlingii*	Epí.	QCNE (3)	VU B1ab(iii) *
252	*Ornithocephalus suarezii*	Epí.	QCA (1), QCNE (1)	VU D2

253	*Pachyphylum cuencae*	Epí.	QCA (1)	NT *
254	*Paphinia herrerae*	Epí.	QCA (7)	VU B1ab(iii) *
255	*Peristeria lindenii*	Epí.	QCNE (5)	VU B1ab(iii)
256	*Platystele acicularis*	Epí.	QCA (1), QCNE (T)	NT *
257	*Platystele myoxura*	Epí.	QCNE (1)	VU D2
258	*Platystele napintzae*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
259	*Platystele reflexa*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
260	*Platystele stevensonii*	Epí.	Ninguno	NT *
261	*Pleurothallis (Acianthera) aculeata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
262	*Pluerothallis alveolata*	Epí.	Ninguno	NT
263	*Pleurothallis amplectens*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
264	*Pleurothallis ankyloglossa*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
265	*Pleurothallis (Acronia) batracha*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
266	*Pleurothallis (Acianthera) bíceps*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *†
267	*Pleurothallis (Specklinia) coeloglossa*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
268	*Pleurothallis (Acronia) complanata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
269	*Pleurothallis (Ancipitia) condorenses*	Epí.	QCNE (T)	EN B1ab(iii) *†
270	*Pleurothallis (Acianthera) cremasta*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
271	*Pleurothallis (Acronia) cutucuensis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
272	*Pleurothallis (Ancipitia) cypelligera*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
273	*Pleurothallis (Stelis/Specklinia)*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
274	*Pleurtothallis eccentrica*	Ter.	Ninguno	VU D2 *
275	*Pleurothallis (Ancipitia) inornata*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
276	*Pleurothallis(Acianthera) lamia*	Epí.	Ninguno	NT
277	*Pleurothallis lenae*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
278	*Pleurothallis (Specklinia/Lindleyalis)*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
279	*Pleurothallis (Acianthera/Apoda-repentia)*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
280	*Pleurothallis (Acronia) millei*	Epí. o Lit.	QCA (4), QCNE (5)	NT *
281	*Pleurothallis(Acianthera) moronae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
282	*Pleurothallis (Anathallis) muricaudata*	Epí.	Ninguno	NT *
283	*Pleurothallis (Acronia) muriculata*	Epí.	QCNE (T)	EN B1ab(iii) *
284	*Pleurothallis (Acronia) nephroglossa*	Epí. o Ter.	QCNE (2)	LC *
285	*Pleurothallis (Ancipitia) niveoglobula*	Epí.	QCNE (9)	LC
286	*Pleurothallis ocellus*	Epí. o Lit.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
287	*Pleurothallis (Acronia) penelops*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
288	*Pleurothallis phratria*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
289	*Pleurothallis (Ancipitia) praecipua*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
290	*Pleurothallis (Specklinia) praemorsa*	Epí.	Ninguno	NT *
291	*Pleurothallis ptychophora*	Epí.	QCNE (T)	VU B1ab(iii) *
292	*Pleurothallis purpurescens*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
293	*Pleurothallis (Acronia) recurvata*	Epí.	QCNE (2)	EN B1ab(iii) *
294	*Pleurothallis scintillata*	Epí. o Ter.	QCA (1), QCNE (1)	NT
295	*Pleurothallis (Kraenzlinella) shuarii*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
296	*Pleurothallis (Ancipitia) solium*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
297	*Pleurothallis (Acronia) sphaerantha*	Epí.	QCA (2), QCNE (2)	LC *
298	*Pleurothallis tiarata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
299	*Pleurothallis trifurcata*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
300	*Pluerothallis (Specklinia) trullifera*	Epí.	QCNE (1)	EN B1ab(iii) *
301	*Pleurothallis (Acronia) tyria*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
302	*Pleurothallis (Specklinia) ursula*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
303	*Pleurothallis valvola*	Epí.	QCNE (T+1)	VU B1ab(iii) *
304	*Pleurothallis (Specklinia) vigera*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
305	*Pleurothallis (Specklinia) villosilabia*	Epí.	Ninguno	VU D2 †
306	*Pleurothallis viridis*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
307	*Pleurothallis (Acronia) volans*	Epí.	QCNE (T)	EN B1ab(iii) *†
308	*Pleurothallis (Specklinia) ximenae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
309	*Polycycnis annectans*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
310	*Ponthieva pilosissima (Senghas)*	Ter.	Ninguno	VU D2 *
311	*Porroglossum andreettae*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *†
312	*Porroglossum condylosepalum*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
313	*Porroglossum dactylum*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
314	*Porroglossum dalstroemii*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
315	*Porroglossum dreisei*	Epí.	Ninguno	EN A4c *
No.	**Nombre científico**	**Hábito**	**Herbario**	**Libro Rojo**
316	*Porroglossum hirtzii*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
317	*Porroglossum hystrix*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *

318	*Porroglossum jesupiae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
319	*Porroglossum portillae*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
320	*Porroglossum schramii*	Epí. o Lit.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
321	*Porroglossum teretilabia*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
322	*Porroglossum uxorium*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
323	*Restrepia portillae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
324	*Rodriguezia pulchra*	Epí.	Ninguno	NT *
325	*Scaphosepalum andreettae*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii)
326	*Scaphosepalum globosum*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
327	*Scelochilus williamssii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
328	*Schlimmia garayana*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *†
329	*Sievekingia marsupialis*	Epí.	QCNE (9)	NT *
330	*Sigmatostalix marinii*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *†
331	*Sigmatostalix portillae*	Epí.	QCA (T)	VU D2 *
332	*Sobralia luerorum*	Epí. o Ter.	QCA (2+T), QCNE (6+T)	NT *
333	*Stelis acaroi*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
334	*Stelis acutula*	Epí.	Ninguno	VU D2
335	*Stelis alternans*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
336	*Stelis ann-jesupiae*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
337	*Stelis anolis*	Epí.	QCA (3), QCNE (1)	NT *
338	*Stelis applanata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
339	*Stelis brachyrachis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
340	*Stelis bucella*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
341	*Stelis cajanumae*	Epí.	GUAY (2), LOJA (1),	VU B1ab(iii)
342	*Stelis calantha*	Epí.	QCNE (HT)	VU B1ab(iii) *
343	*Stelis calolemma*	Epí.	Ninguno	DD *
344	*Stelis capitata*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *†
345	*Stelis capsula*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
346	*Stelis cavernosa*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
347	*Stelis ciliolata*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
348	*Stelis clusaris*	Epí.	QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
349	*Stelis congesta*	Epí.	QCNE (3), QCA (1)	LC
350	*Stelis coralloides*	Epí.	Ninguno	DD *†
351	*Stelis cotyligera*	Epí.	Ninguno	NE *
352	*Stelis cuencana*	Epí.	LOJA (1), QCA (2)	VU D2
353	*Stelis cutucuensis*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
354	*Stelis dactyloptera*	Epí.	LOJA (1)	VU D2 *
355	*Stelis debilis*	Epí.	LOJA (1), QCNE (2)	VU D2
356	*Stelis discoidea*	Epí.	QCA (1)	VU D2 *
357	*Stelis distans*	Epí.	QCNE (1)	VU D2
358	*Stelis elongatissima*	Epí. o Ter.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
359	*Stelis embreei*	Epí.	QCNE (1)	NT *
360	*Stelis epibator*	Epí.	QCA (1), QCNE (3)	VU D2 *
361	*Stelis exasperata*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
362	*Stelis flexuosissima*	Epí. o Ter.	QCNE (1)	NT *
363	*Stelis floresii*	Epí. o Ter.	QCNE (T+2)	NT
364	*Stelis fortis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
365	*Stelis globiflora*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
366	*Stelis haltonii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
367	*Stelis humboldtina*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
368	*Stelis hydroidea*	Epí.	QCNE (2)	VU B1ab(iii) *
369	*Stelis impostor*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
370	*Stelis ingridiana*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
371	*Stelis liberallis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
372	*Stelis limonensis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
373	*Stelis longihirta*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
374	*Stelis longissima*	Epí. o Ter.	QCNE (T)	VU D2 *
375	*Stelis macilenta*	Epí. o Ter.	QCA (1), QCNE (2)	NT
376	*Stelis maloi*	Epí.	QCNE (4)	VU D2 *
377	*Stelis matula*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
378	*Stelis medinae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
379	*Stelis megalocephala*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
No.	**Nombre científico**	**Hábito**	**Herbario**	**Libro Rojo**
380	*Stelis membranácea*	Epí.	Ninguno	NE *†
381	*Stelis memorialis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†

382	*Stelis mendozae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
383	*Stelis micácea*	Epí.	LOJA (1)	NT
384	*Stelis mundula*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
385	*Stelis nambijae*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *
386	*Stelis nepotula*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
387	*Stelis nycterina*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
388	*Stelis odobenella*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
389	*Stelis opercularis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
390	*Stelis opimipetala*	Epí.	QCNE (2)	VU D2 *
391	*Stelis ortegae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
392	*Stelis paniculata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
393	*Stelis parvipetala*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
394	*Stelis patens*	Epí.	Ninguno	NT *
395	*Stelis patinaría*	Epí. o Ter.	QCA (1), QCNE (1)	NT *
396	*Stelis pedanocaulon*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
397	*Stelis peduncularis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
398	*Stelis petiolata*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
399	*Stelis pilosa*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
400	*Stelis pubipetala*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
401	*Stelis pudens*	Epí.	QCNE (3)	VU D2 *
402	*Stelis Regina*	Epí. o Ter.	QCNE (1)	VU D2 *
403	*Stelis reniformis*	Epí.	QCNE (T)	VU B1ab(iii) *
404	*Stelis rosamariae*	Epí. o Ter.	GUAY (1), LOJA (5),	NT
405	*Stelis rotunda*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
406	*Stelis sanchezii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
407	*Stelis santiagoi*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
408	*Stelis saurocephala*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *†
409	*Stelis septella*	Lit.	Ninguno	VU D2 *
410	*Stelis teaguei*	Epí.	QCNE (T)	EN B2ab(iii) *†
411	*Stelis tempestuosa*	Epí.	LOJA (7), QCA (2),	NT
412	*Stelis tridactyloides*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *
413	*Stelis tridactylon*	Epí.	QCA (T+1)	VU B1ab(iii) *
414	*Stelis venusta*	Epí.	LOJA (1), QCA (1)	VU D2 *
415	*Stelis vesca*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
416	*Stelis viamontis*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
417	*Stelis viridula*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
418	*Stelis ximenae*	Epí. o Ter.	LOJA (1), QCA (4), QCNE (3)	VU D2
419	*Stelis zelenkoi*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
420	*Stellilabium alticolum*	Epí.	Ninguno	NT *†
421	*Stenia falcata (Ackerman)*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
422	*Stenia glatzii*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *†
423	*Stenia stenoides (Garay)*	Epí.	QCA (1), QCNE (1)	VU B1ab(iii) *
424	*Suarezia ecuadorana*	Epí.	QCA (1), QCNE (1)	VU D2 *
425	*Telipogon asuayanus*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
426	*Telipogon ecuadorensis*	Epí.	QPLS (1)	VU D2 *
427	*Telipogon ionopogon*	Epí. o Ter.	Ninguno	NT *
428	*Telipogon obovatus*	Epí.	QCA (2), QCNE (3)	NT
429	*Telipogon sanchezii*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†
430	*Teuscheria dodsoinii*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
431	*Trichocentrum obcordilabium*	Epí.	QCNE (T)	VU D2 *†
432	*Trichocentrum popowianum*	Epí.	Ninguno	EN B1ab(iii) *†
433	*Trichosalpinx ligulata*	Epí.	QCNE (1)	VU D2 *
434	*Trisetella andreettae*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
435	*Trisetella hirtzii*	Epí.	Ninguno	VU B1ab(iii) *
436	*Trisetella hoeijeri*	Epí.	Ninguno	VU D2 *
437	*Trisetella sororia*	Epí.	QCA (1)	VU D2 *
438	*Trisetella strumosa*	Epí.	QCNE (1+T)	EN B1ab(iii) *
439	*Zootrophion niveum*	Epí.	Ninguno	VU D2 *†

Fuente: Endara y otros, 2011. "Libro Rojo de Especies Endémicas del Ecuador 2011".

SIGNIFICADO DE LAS CATEGORÍAS DE AMENAZA UICN

En peligro (EN):	Las especies están enfrentando un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre.
Vulnerable (VU):	La población está disminuyendo rápidamente en estado silvestre y el riesgo de extinción es alto.
Casi amenazado (NT):	Las especies están disminuyendo y en un futuro cercano serán especies vulnerables.
Preocupación menor (NE):	Las especies empiezan a disminuir, pero todavía es común.
Datos Insuficientes (DD):	Las especies no poseen datos suficientes.
No Evaluado (NE):	Las especies están aún por investigarse
Fuente: Endara y otros, 2011.	

ANEXO 6: FOTOGRAFÍAS DE RECOLECCIÓN DE ORQUÍDEAS EN COPAL

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

ANEXO 6: FOTOGRAFÍAS RECOLECCIÓN ORQUÍDEAS TRES RANCHOS

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

ANEXO 6: FOTOGRAFÍAS RECOLECCIÓN ORQUÍDEAS EN LA DELICIA

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

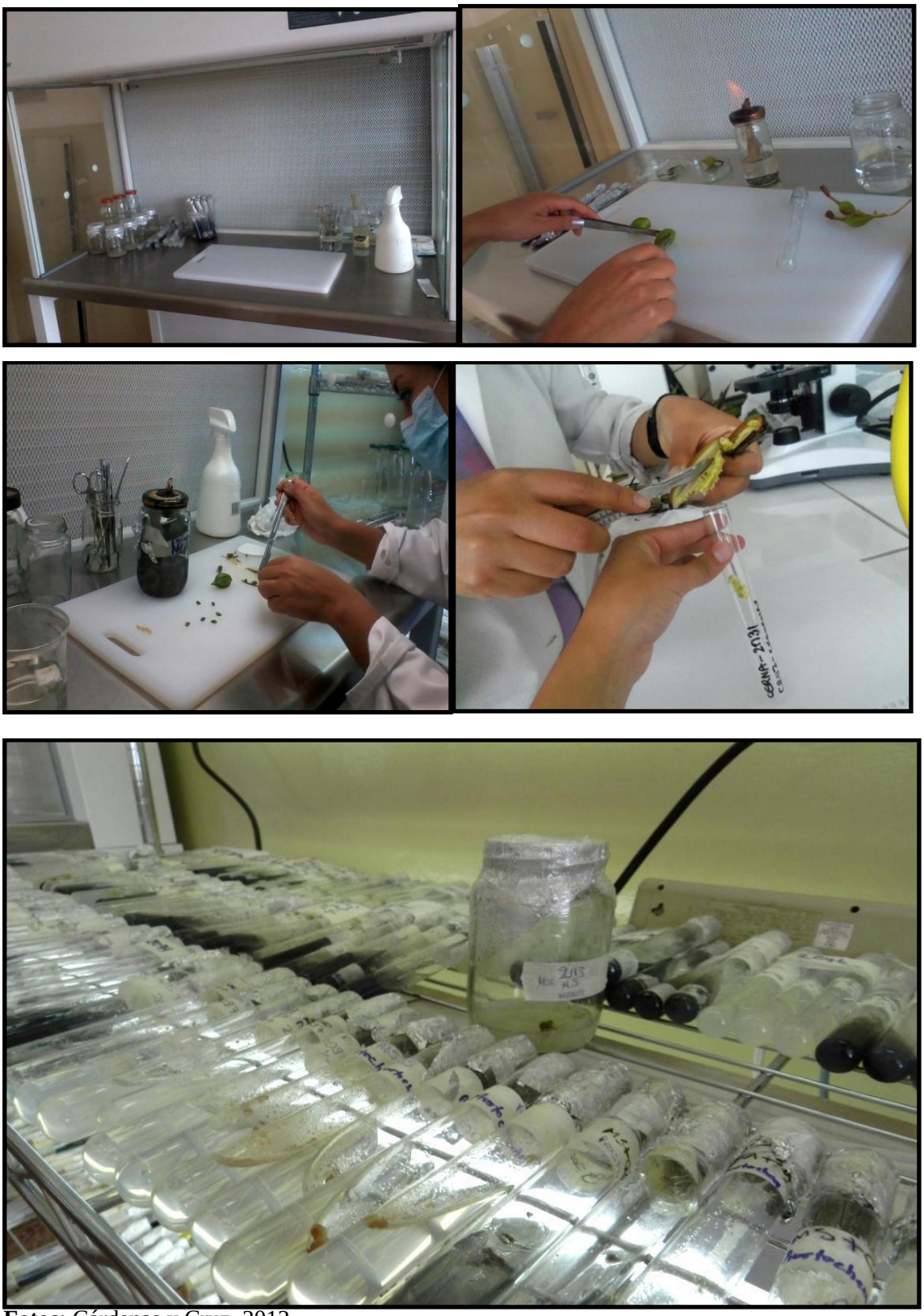
ANEXO 7: FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO EN INVERNADERO (MACAS)

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

ANEXO 7: FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO EN INVERNADERO (MACAS)

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

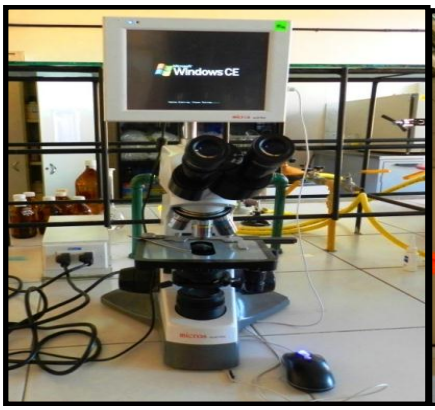
ANEXO 8: FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO EN LABORATORIO CIVABI.



Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

ANEXO 8: FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO EN LABORATORIO CIVABI.

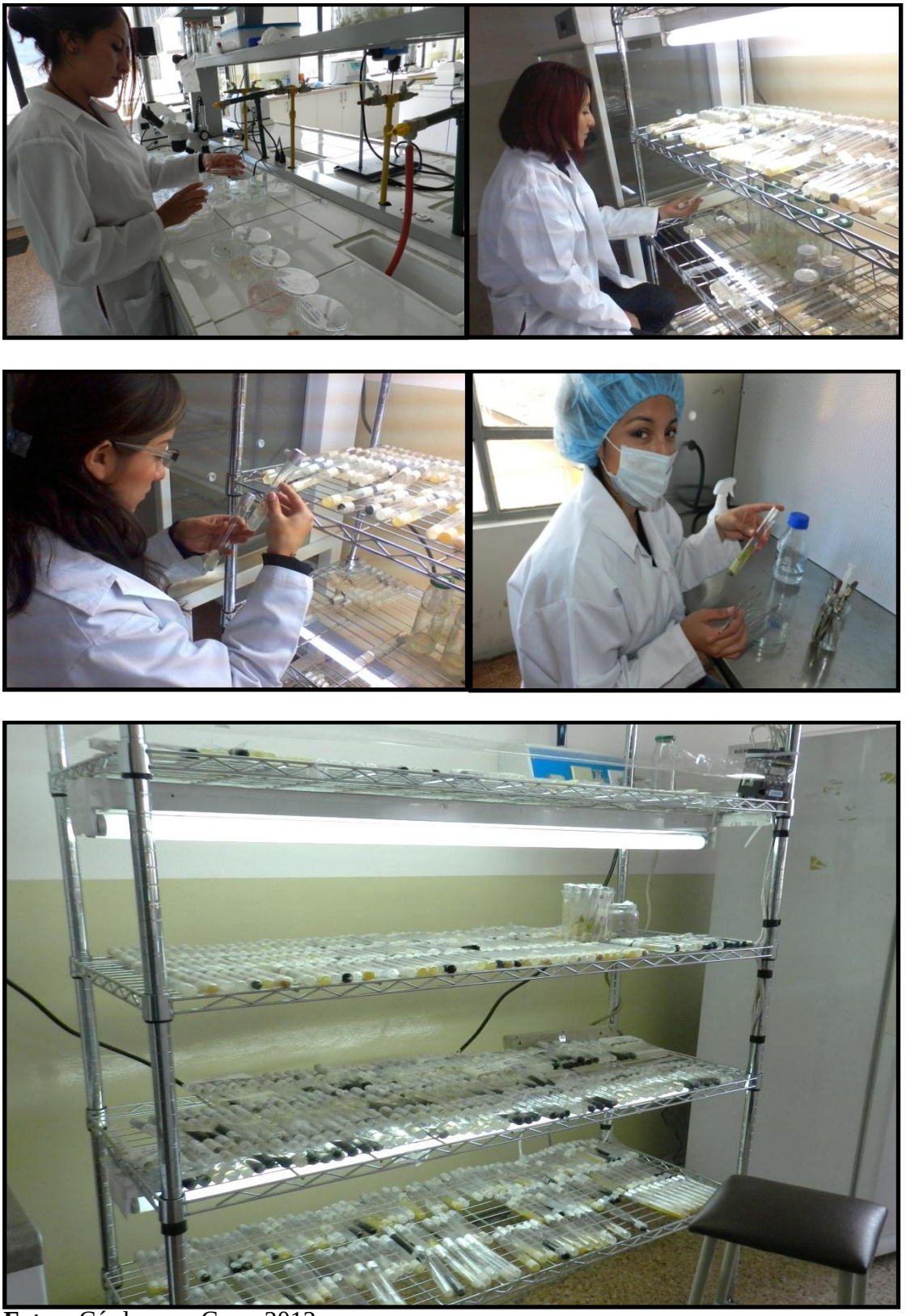
Autoclave Autoclave vertical.



Microscopio con cámara Campanas de Desecación

Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.

ANEXO 8: FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO EN LABORATORIO CIVABI.



Fotos: Cárdenas y Cruz, 2012.