

COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE LA FAMILIA
Orchidaceae DEL CANTÓN SANTIAGO DE MÉNDEZ - MORONA
SANTIAGO, ECUADOR

COMPILATION OF *Orchidaceae* FAMILY SPECIES GERMPLASM IN SANTIAGO DE
MENDEZ, MORONA SANTIAGO, ECUADOR

Marco Cerna, Silvana Cárdenas, Andrea Cruz e Ivonne Jácome

Centro de Investigación y Valoración para la Biodiversidad CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson, Telf. (593-2) 3962800. Quito, Ecuador.

Autor para correspondencia: mcerna@ups.edu.ec.

Manuscrito recibido el 25 de junio de 2013. Aceptado, tras revisión, el 16 de diciembre de 2014.

Resumen

Las amenazas antrópicas que reciben diversos hábitats 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 las especies amenazadas de este grupo taxonómico. 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, en la provincia de Morona Santiago, Ecuador, en un área total de 600m², aquí se obtuvieron 50 orquídeas de 15 géneros distintos, las mismas que fueron conservadas *ex situ* en un invernadero en la ciudad de Macas, hasta que sus cápsulas maduraron. Posteriormente, en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito, las semillas se extrajeron y desecaron; se almacenaron las semillas de 12 especies de orquídeas en tubos *vacutainers*, a través de dos métodos: a) en refrigeración a 4°C, más oscuridad y b) a temperatura ambiente 20 ± 2 °C, más luz; Se determinó que el primer procedimiento es el más eficiente para conservar semillas; esto se evidenció con la prueba de viabilidad de tetrazolium 1%, mediante conteo de semillas tinturadas en el microscopio. Durante la germinación asimbiótica *in vitro*, se evaluaron cinco tratamientos: Murashige & Skoog M&S (T1), M&S + vitaminas (T2), M&S + auxinas (T3), M&S + carbón activado 1% (T4) y Knudson C (T5), se determinó que los medios óptimos de germinación *in vitro* para todas las especies en estudio, fueron: (T4), seguido de (T1). Las orquídeas, indistintamente del tratamiento, que presentaron mayor viabilidad fueron: *Sobralia rosea* (90%), *Sievekingia marsupialis* (90%), *Maxillaria rufescens* y *Epidendrum sp 1* (75%).

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

Abstract

Anthropogenic threats to the habitat of orchids have prompted conservation initiatives such as the creation of an orchid seed germplasm bank, a key biotechnological tool for the conservation of this threatened species. The present study was divided in two stages: a field study and a lab analysis. Orchids were collected from three areas of the Santiago de Mendez, Morona Santiago region: Copal, Tres Ranchos and La Delicia; an area of 600 m² where 50 orchids of 15 different genus were collected and preserved *ex situ* in a greenhouse in the city of Macas until the capsules matured. The seeds were later removed and dried in the CIVABI lab of the Universidad Politécnica Salesiana in Quito, where 12 species were stored in vacutainer tubes using the following methods: a) refrigerated in the dark at 4°C, and b) under room temperature 20 ± 2 °C, in light conditions. By using the 1% tetrazolium viability test and microscopic counting, it was determined that the best method was to keep the seeds in the dark at 4°C. Five treatments were evaluated in the *in vitro* asymbiotic germination: M&S (T1), M&S + vitamins (T2), M&S + auxins (T3), M&S+ 1% activated carbon (T4) and Knudson C (T5), where the T4 and T1 treatments were found to be optimal for *in vitro* germination for all studied species. Notwithstanding the treatment, the orchids that showed the highest viability were: *Sobralia rosea* (90%), *Sievekingia marsupialis* (90%), *Maxillaria rufescens* and *Epidendrum sp. 1* (75%).

Keywords: *ex-situ* conservation, germplasm, orchids, *in-vitro* germination, viability, culture medium

Forma sugerida de citar: Cerna, M., S. Cárdenas, A. Cruz e I. Jácome. 2014. **Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago, Ecuador.** La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 20(2): 5-19. ISSN: 1390-3799.

1. Introducción

Los bancos de germoplasma tienen como fin conservar la biodiversidad fuera de su ambiente natural, enfocando sus esfuerzos a especies identificadas como útiles o que se ha observado que su población está en proceso de disminución. La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas del planeta, pero también tiene un número significativo de especies en peligro de extinción. De acuerdo con datos de la base de datos TROPICOS hasta el 2011 en el Ecuador están registradas unas 4 250 especies y 219 géneros de orquídeas, de los cuales, según León-Yáñez *et al.* (2011), existen 1 707 especies endémicas, es decir habitan únicamente en este lugar del planeta.

La principal amenaza que enfrentan las plantas endémicas en nuestro país es la pérdida de su hábitat, ocasionada por actividades humanas; el mayor impacto proviene de la deforestación a pequeña o gran escala, el cambio de uso del suelo para agricultura, ganadería, urbanización o minería (León-Yáñez *et al.*, 2011). La FAO (2009) establece que la tasa de disminución de la superficie forestal en el Ecuador es del 1,7% anual, afectando de forma significativa también a las especies que habitan en estas áreas boscosas.

Establecer las estrategias para la conservación de orquídeas en un país mega diverso como Ecuador constituye una tarea obligatoria y urgente, para esto nuestro país cuenta con herramientas importantes que apoyan a este fin, por ejemplo, al ser un país botánicamente bien explorado, cuenta con una lista preliminar de especies en peligro de extinción, y tiene varios herbarios activos bien mantenidos (Endara, 2008).

En este marco, el objetivo de la investigación, fue el de obtener material genético de un lugar representativo de la flora, que se encuentra en franco proceso de alteración por parte de las actividades humanas. Se colectaron muestras de plantas vivas y semillas, que fueron luego mantenidas en un invernadero con el fin de estudiar su ciclo biológico, fertilizarlas artificialmente y producir semillas. Las semillas colectadas se destinaron a procesos de estudio en laboratorio con el propósito de establecer las condiciones ideales para su almacenamiento, conservación y multiplicación *in vitro*. Como resultado de este estudio se han establecido los protocolos para manejar las especies investigadas y se dispone de

material genético que en el futuro posiblemente ya no se encontrarán en su ambiente natural.

2. Materiales y métodos

2.1 Autorización de Investigación Científica

En diciembre del 2011 se obtuvo el correspondiente permiso de investigación científica en la Dirección Provincial del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago; para colección y manejo de orquídeas.

“Autorización de Investigación Científica No. 17-2011” -Investigación - B -DPMS/MAE, Flora.

2.2 Área de estudio

La colección de especies se realizó en tres localidades del cantón Santiago de Méndez, provincia de Morona Santiago que se encuentra, en el valle del río Upano; corresponde a una formación vegetal de “Bosque siempre verde pie montano” de acuerdo con León-Yáñez *et al.* (2011), y está a una altitud de entre 650 y 1400 msnm (Anexo1).

2.3 Técnica de colección

En el mes de marzo del 2012, se recolectaron orquídeas de los tres sectores seleccionados del cantón Santiago de Méndez, mediante la técnica de muestreo por “transectos”; en cada sector se establecieron dos transectos de 50 x 2 m, (200 m² y 600m² en toda la zona de estudio); los transectos se marcaron con la ayuda una piola de 50m y se colectó los especímenes fértiles, (Con flores o cápsulas) presentes a un metro a cada lado de la piola.

Para coleccionar las muestras se usó una podadora de mano, podadora aérea y un machete; los especímenes colectados fueron marcados con cinta adhesiva de papel y un marcador permanente, se fotografió la muestra y se guardó en una bolsa plástica cubriendo las raíces, para transportar las muestras se usó una bolsa plástica grande, 5 muestras en cada bolsa.

Se colectaron 50 individuos en las tres zonas en estudio; se etiquetaron y codificaron con el número de colección del libro de campo de Marco Cerna del 2012, las especies recolectadas fueron trasla-

dadas hacia un invernadero de propiedad de Nelly Cárdenas en la ciudad de Macas, Figura 1.

2.4 Establecimiento y adecuación de las orquídeas en el invernadero

El invernadero posee una temperatura media de 25°C, humedad 60%, Luminosidad 4 000 lux; se encuentra a una altura de 1 100 msnm. Las orquídeas recolectadas en campo fueron adecuadas en macetas con musgo, esperando la formación o maduración de cápsulas, ver Figura 1. Los individuos fueron evaluados periódicamente, en espera de cápsulas maduras.

2.5 Cosecha, traslación y registro de cápsulas

Entre los meses de abril y julio del 2012, fueron cosechadas cápsulas maduras expuestas a polinización natural y artificial. 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 *et al.* (2004). Las cápsulas en el invernadero se guardaron y rotularon en sobres de papel, con las siguientes características: número de cápsula, código, lugar de recolección, fecha de recolección.



Figura 1. Adecuación de orquídeas en el Invernadero.

Las cápsulas cosechadas fueron transportadas hacia el laboratorio del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana en Quito, para el transporte se usó una caja de cartón con sobres de sílica gel para reducir la humedad.

2.6 Almacenamiento de semillas

Previamente al almacenamiento, se desinfectaron las cápsulas cerradas con hipoclorito al 3% y alcohol al 70%, luego se abrieron las cápsulas con un bisturí y se extrajo las semillas poniéndolas en tubos de en-

sayo rotulados con el respectivo código y fecha. Posteriormente se desecaron las semillas en una campana de desecación durante dos días, usando arroz deshidratado como agente adsorbente de la humedad. Luego de lo cual se tapó los tubos de ensayo con un tapón de goma y se extrajo el aire del interior

del tubo con la ayuda de una jeringuilla hipodérmica. Estas muestras se guardaron en un recipiente de cristal y se almacenaron en dos sistemas; a.- 4°C y oscuridad b.- en condiciones de laboratorio, 20 ± 2 °C más luz ambiental, Figura 2.



Figura 2. Semillas almacenadas: a) a 4°C en oscuridad y b) en temperatura ambiente 20 ± 2 °C más luz.

2.7 Viabilidad en semillas

La viabilidad de las semillas fue evaluada al iniciar el experimento y después de tres meses de ser almacenadas, a través de la prueba de Tetrazolium [2, 3, 5- cloruro trifenil tetrazolio (CTT)] al 1 %; para esto: se tomó 10 mg de semillas de cada especie en tubos eppendorf de 2ml se añadió 1,5 ml de agua destilada durante 24 horas (imbibición) a temperatura ambiente. Luego retiramos el agua destilada con una pipeta pasteur y añadimos 1,5 ml de solución de sacarosa al 10 %, durante 24 horas a temperatura ambiente. Después retiramos la solución de sacarosa y añadimos la solución de CTT al 1 % (1g en 100 ml de buffer fosfato, pH 6.5). A continuación se incubó en

baño María a 40°C, durante 24 horas, en total oscuridad. Los resultados se observaron en el microscopio, realizando un conteo de semillas tinturadas en rojo (viables) y las no tinturadas (no viables). La técnica fue adaptada en base a Ossenbach *et al.* (2007).

2.8 Determinación del medio óptimo para germinación *in vitro*

En esta fase, se evaluaron cinco tratamientos:

T1 [(M&S)]: composición en base a Murashige y Skoog (1962) **Stock I:** 1650 mg.l⁻¹ (NH₄NO₃) y 1900 mg.l⁻¹ de (KNO₃); **Stock II:** 181 mg.l⁻¹ (Mg SO₄), 17

mg.l¹ (Mn SO₄), 8,6 mg.l¹ (ZnSO₄), 0,025 mg.l¹ (Cu SO₄); del **Stock III**: 332,2 mg.l¹ (Ca Cl₂), 0,83 mg.l¹ (K I), 0,025 mg.l¹ (Co Cl₂); **Stock IV**: 170 mg.l¹ (K H₂ PO₄), 6,2 mg.l¹ (H₃ BO₃), 0,25 mg.l¹ (Na₂MoO₄); y **Stock V**: 27,8 mg.l¹ (Fe SO₄) y 37,26 mg.l¹ (Na₂ EDTA). A esta base de sales se le añadió un stock de vitaminas: Ácido nicotínico 0,25 mg/L, Piridoxina 0,25 mg/L, Tiamina 0,1 mg/L, Glicina 4 mg/L, Mioinositol 25 mg/L.

T2 [(M&S)+Vit]: A la base de sales M&S se le añadió cinco veces la concentración normal de vitaminas, es decir Ácido Nicotínico 1,25 mg/L, Piridoxina 1,25 mg/L, Tiamina 0,5 mg/L, Glicina 20 mg/L, Mioinositol 125 mg/L.

T3 [(M&S)+2,4D]: A la base de sales M&S se le añadió 0,01 mg/L de 2,4-D (auxina).

T4 [(M&S)+CA]: A la base de sales M&S se le añadió carbón activado 1000 mg/L.

T5: Knudson Comercial, composición en base a Knudson (1946): 250 mg/L (K H₂ PO₄); 694,4 mg/L (Ca (NO₃)₂); 0,016 mg/L (Mo O₃); 0,056 mg/L (H₃ BO₃); 122,125 mg/L (Mg SO₄); 5,68 mg/L (Mn SO₄); 500 mg/L ((NH₄)₂ SO₄); 0,331 mg/L (Zn SO₄); 0,0624 mg/L (Cu SO₄) y 25 mg/L (Fe SO₄).

A todos los tratamientos se les añadió 8 g/L de agar-agar, y se ajustó a un pH 5,8. Se dosificaron los medios en tubos de ensayo de vidrio (18 x 150mm), se los taponó con doble capa de papel aluminio y sellado con plástico de embalaje Rollopack. Finalmente, fueron auto-clavados a 121°C y 103 kpascales de presión por 20 minutos.

Desinfección de cápsulas cerradas: se adaptó el método de Mayo *et al.* (2010), así se lavaron las cápsulas cerradas con etanol 70 % por un minuto, se desinfectaron las cápsulas con hipoclorito de sodio 2,5 % por cinco minutos, se sumergieron nuevamente en alcohol 70 % por 30 segundos y flameó hasta

que el alcohol se quemara (3 veces), dentro de la cámara de flujo laminar evitando la diseminación de semillas en el ambiente.

Desinfección de semillas: se adaptó el método de Seaton (2000); para el caso de semillas, se las colocó en un sobre de papel filtro, este sobre se introduce en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante tres minutos, luego se sumergen los sobres en alcohol etílico al 70 % durante tres minutos; finalmente se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril. Este procedimiento se desarrolla en el interior de una cámara de flujo laminar.

Siembra *in vitro*: se tomaron las semillas de las cápsulas o de los sobres desinfectados, con la ayuda de un bisturí estéril y se inocula en los medios de cultivo preparados, además se añadió dos gotas de agua destilada estéril y una gota de agua oxigenada. Finalmente se flamea la boca del tubo de ensayo y se lo sella con papel aluminio y plástico de embalaje Rollopack.

Incubación: los tubos sembrados fueron incubados en una cámara con 3000 lux, fotoperiodo de 14 horas luz, 20 ± 2 °C y 50 % de humedad ambiental relativa, como se muestra en la Figura 3.

2.9 Evaluación del porcentaje de germinación de las semillas

En abril y septiembre del 2012, se cuantificó el número de semillas germinadas, usando el método descrito 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), por otro lado, se diseñaron fichas de evaluación de tubos contaminados, germinados y tubos sin actividad, proveyéndonos un porcentaje referencial.



Figura 3. Germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Laboratorio CIVABI

3. Resultados y discusión

3.1 Recolección e identificación de orquídeas del cantón Santiago

Se colectaron 50 individuos pertenecientes a 15 géneros y 24 morfo-especies, en un área de 600m² muestreados entre las zonas de: Sector A Copal, Sector B Tres Ranchos y Sector C La Delicia, pertenecientes al cantón Santiago de Méndez. Los géneros colectados fueron: *Maxillaria*, *Epidendrum*, *Stelis*, *Pleurothallis*, *Huntleya*, *Sobralia*, *Rodriguezia*, *Prosthechea*, *Mormodes*, *Sievekingia*, *Lycaste*, *Elleanthus*, *Cyclopogon*, *Masdevallia* y *Brassia* se detalla en la Tabla 1. Además, se encontró una especie endémica: *Sievekingia marsupialis*, esta categorización según la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), como Casi Amenazada (NT), lo que significa que: “El número de individuos de la especie está disminuyendo y en un futuro cercano será especie vulnerable”. Esta especie no está descrita dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas SNAP, se muestra en la Figura 4.

3.2 Conservación en invernadero

En el lapso de cuatro meses de experimentación en el invernadero, del total de especies de orquídeas colectadas (50), se cosecharon cápsulas maduras de 16 individuos, se detalla en la Tabla 2.

La mayor cosecha de cápsulas, se realizó entre los meses de abril y junio del 2012. El 32 % de orquídeas fructificaron en el lapso de tres meses. El 68 % restante, siguen desarrollándose.

3.3 Pruebas de almacenamiento

Después de tres meses de almacenamiento de semillas de doce morfo especies de orquídeas (Figura 5); se midió su viabilidad con la prueba de Tetrazolium al 1 %, y se determinó un promedio del 90 % de viabilidad para el tratamiento 1 en el sistema de almacenamiento a 4°C en obscuridad y un 80 % de viabilidad para el tratamiento 2 en el sistema de almacenamiento a 22°C con luz ambiental.



Figura 4. *Sievekingia marsupialis* especie endémica NT Casi Amenazada; categoría UICN. a) In situ con cápsula, b) Abertura de cápsula en la cámara de flujo, c) Floración en Invernadero. Fotos: Cárdenas y Cruz 2012.

Tabla 1. Especies colectadas en el cantón Santiago de Méndez; **Código** en base a libro de campo de Marco Cerna 2012; Lugar: Sector A (Copal), Sector B (Tres Ranchos), Sector C (La Delicia); NT Casi Amenazada (UICN); * No identificada; ** Orquídea Nativa, *** Orquídea Endémica

N	Código	Lugar	Especie	N	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**

Tabla 2. Especies colectadas y cápsulas cosechadas en invernadero

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

3.4 Prueba de viabilidad por especie

Mediante la prueba de Tetrazolium 1%, se obtuvo los siguientes valores de viabilidad para las especies: *Sobralia rosea* 90%, *Sievekingia marsupialis* 90% (Figura 6), *Maxillaria rufescens* y *Epidendrum sp1* 75%.

Una observación importante al comparar resultados entre la prueba de viabilidad y germinación, como mencionan Rao *et al.* (2007), la viabilidad no debe ser confundida con la capacidad germinativa, de hecho las semillas viables en dormancia no ne-

cesariamente germinan. Pero en este ensayo pudimos observar que todas las muestras viables germinaron.

3.5 Determinación del medio óptimo para germinación *in vitro*

El rendimiento de los medios de cultivo para germinación de semillas de orquídeas en el sistema *in vitro* fue: T4 - 97%, T1 - 89%, T2 - 71%, T3 - 69% y T5 - 64%. De acuerdo al test de Duncan con un error

de 0,05, se estableció dos grupos con diferencias significativas entre los tratamientos: el grupo A con los Tratamiento 4 y 1, y en el grupo B los tratamientos 2, 3 y 5. Esto nos indica que el T4 medio M&S con car-

bón activado y T1 medio M&S son los medios óptimos para germinación de las semillas de las especies estudiadas (Figura 7). Los resultados por especie se muestran en la Tabla 3.



Figura 5. Semillas almacenadas en tubos vacuntainers. Foto: Cárdenas y Cruz, 2012.



Figura 6. Semilla teñida de rojo, positivo tetrazolium. *Sievekingia marsupialis*.

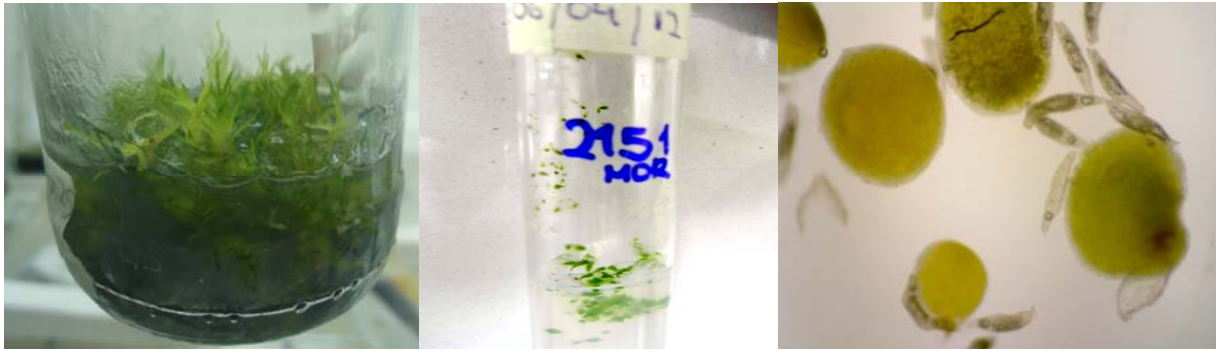


Figura 7. Medios óptimos de germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. a) M&S+CA (T4) b) en M&S (T1).

Tabla 3. Tratamientos óptimos para germinación de semillas *in vitro*, por especie.

Código	Especie	Medios óptimos de germinación <i>in vitro</i>
2131	<i>Sobralia rosea</i>	T4, T2 y T1
2113	<i>Epidendrum sp 1</i>	T4, T2 y T1
2151	<i>Sievekingia marsupialis</i>	T1 y T4
2066	<i>Brassia arcuigera</i>	T4 y T1
2097	<i>Epidendrum sp 2</i>	T4 y T1
2090	<i>Maxillaria rufescens</i>	T4 y T2

Durante la evaluación de medios de germinación *in vitro* por especie, se determinó que emplear medios con carbón activado, mostraron una tasa de germinación más alta en comparación a los tratamientos sin carbón activado. Estos resultados coinciden con lo propuesto por Margara (1988). Por otra parte, concordando con Borges *et al.* (2008), el ambiente oscuro que produce el carbón activado tiende a aparentar condiciones naturales para la germinación de las semillas de orquídeas, colabora con la formación de la clorofila y adsorbe los compuestos tóxicos.

4. Conclusiones y recomendaciones

En la zona de estudio se pudo colectar 50 individuos correspondientes a 24 morfo-especies pertenecientes a 15 géneros de orquídeas, en las especies identificadas encontramos a *Sievekingia marsupialis*, especie endémica registrada como Casi Amenazada bajo la categorización de la UICN; además no está registrada en el sistema nacional de áreas protegidas; por lo cual se recomienda hacer un estudio de la distri-

bución de la población en un sistema de información geográfica con el fin de establecer las variaciones que se darán en la zona en el futuro y establecer sitios en los que se debe priorizar la conservación.

En este estudio se obtuvieron semillas con un promedio del 85 % de viabilidad después de ser almacenadas por tres meses, en tubos de ensayo al vacío (*vacutainers*) a 4°C, con 6-10 % de humedad relativa (HR) y en condiciones de oscuridad. El protocolo ideal para determinar la viabilidad de las semillas es el de tetrazolium al 1 %, este dato se pudo corroborar con los datos experimentales obtenidos en la germinación de semillas *in-vitro*.

Los medios óptimos para germinación *in vitro* de las semillas de orquídeas en estudio, son: T4 Murashige&Skoog + 1 % carbón activado y T1 Murashige&Skoog; mientras que los mejores tratamientos para germinación *in vitro*, por especie, fueron: Para *Sobralia rosea* y *Epidendrum sp.*, (T4), (T2) y (T1); para *Sievekingia marsupialis*, *Brassia arcuigera*, *Epidendrum sp. 2*, (T1) y (T4); para *Maxillaria rufescens* (T4) y (T2).

Con la base desarrollada en este trabajo podemos iniciar los estudios para determinar los mejores protocolos para conservación a mediano y largo plazo de semillas y embriones, además es necesario

la identificación de los medios de cultivo *in vitro* para el desarrollo y mantenimiento de embriones. Debido al número elevado de especies con diferentes características de adaptación no es posible aplicar los resultados de esta investigación a todas las especies de cada género y menos a nivel de familia, pero constituyen la línea base para elaborar el protocolo para las demás especies. Recalcamos la importancia de tener un banco genético fundamentado en la posibilidad de guardar material que en la naturaleza puede desaparecer y de esta manera incrementar las posibilidades de conservación de las especies.

5. Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana, quien financió el proyecto a través de los fondos para investigación, bajo el Proyecto "Banco de Germoplasma de especies de Orquídeas Endémicas del Ecuador, fase 1"; Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI, de la Universidad Politécnica Salesiana, por toda su cooperación. Al Ministerio del Ambiente (MAE), especialmente al Zootecnista Víctor León, por su asistencia técnica y administrativa. Además Al Sr. Gil Cabrera, la Sra. Leonor Tenesaca, al Sr. Jorge Cárdenas, la Sra. Clara Rodríguez y a la Lcda. Paulina Valdivieso por su ayuda en los trabajos de colección, mantenimiento e identificación de las especies en el campo y en el invernadero.

Referencias

- Borges, M., B. Malaurie, S. Portales y D. Calzadillas. 2008. **Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación in vitro de coco (cocos nucifera L.)**. Revista Colombiana de Biotecnología, X(2): 111–119, URL <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=77610213>, consultado: 24 julio 2012.
- Codeso. 2007. **Provincias del Ecuador, Morona Santiago**. Quito, URL http://www.codeso.com/TurismoEcuador/Mapa_Morona_Santiago.html, info codeso. Peter Maye. Consultado: 6 mayo 2013.
- Endara, L. 2008. **Herbario flas**. Estados Unidos, Museo de Historia Natural de Florida, URL http://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Patrones_endemismo.htm, consultado: 27 junio 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, URL <http://www.bioversityinternational.org>, consultado: 06 junio 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. En: **Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona**, tomo 23, págs. 284–290, disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/31703/32917> Consultado: 17 septiembre 2012.
- Knudson, C. 1946. **A new nutrient solution for the germination of orchid seed**. En: **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., 15, págs. 214–217, American Orchid Society Bulletin, consultado: 17 septiembre 2012.
- León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pidman, L. Endara, C. U. Ulloa y H. N. (ads.). 2011. **Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador**. Publicaciones del Herbario QCA Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, 2 edición.
- Margara, J. 1988. **Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: los meristemos y la organogénesis**. En: **Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de Masdevallia coccinea**, tomo XII, págs. 86–102, Revista Colombiana de Biotecnología, disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/776/77617808007.pdf>. Consultado: 21 septiembre 2012.
- Mayo, A., J. Cazares, E. D. 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., URL <http://www.archivos>.

- ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf), consultado: 06 mayo 2012.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** En: **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., *Physiol. Plant*, disponible en: <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf>. Consultado: 21 mayo 2012.
- Ossenbach, C., J. Arce y J. Warner. 2007. **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*, consultado: 13 junio 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.
- Seaton, P. 2000. **Growing orchids from seed.** Part 1: Seed storage. *Orchid Review*, (108): 55–110, URL http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-suario/Edicion/40v3.104_OssenbachI.pdf, consultado: 13 junio 2012.
- Tropicos. **Tropicos.org. missouri botanical garden.** URL <http://www.tropicos.org>, consultado 10 junio 2012.

Anexos

Anexo 1: Área de estudio para la colección de las especies

Área de estudio para la colección de las especies

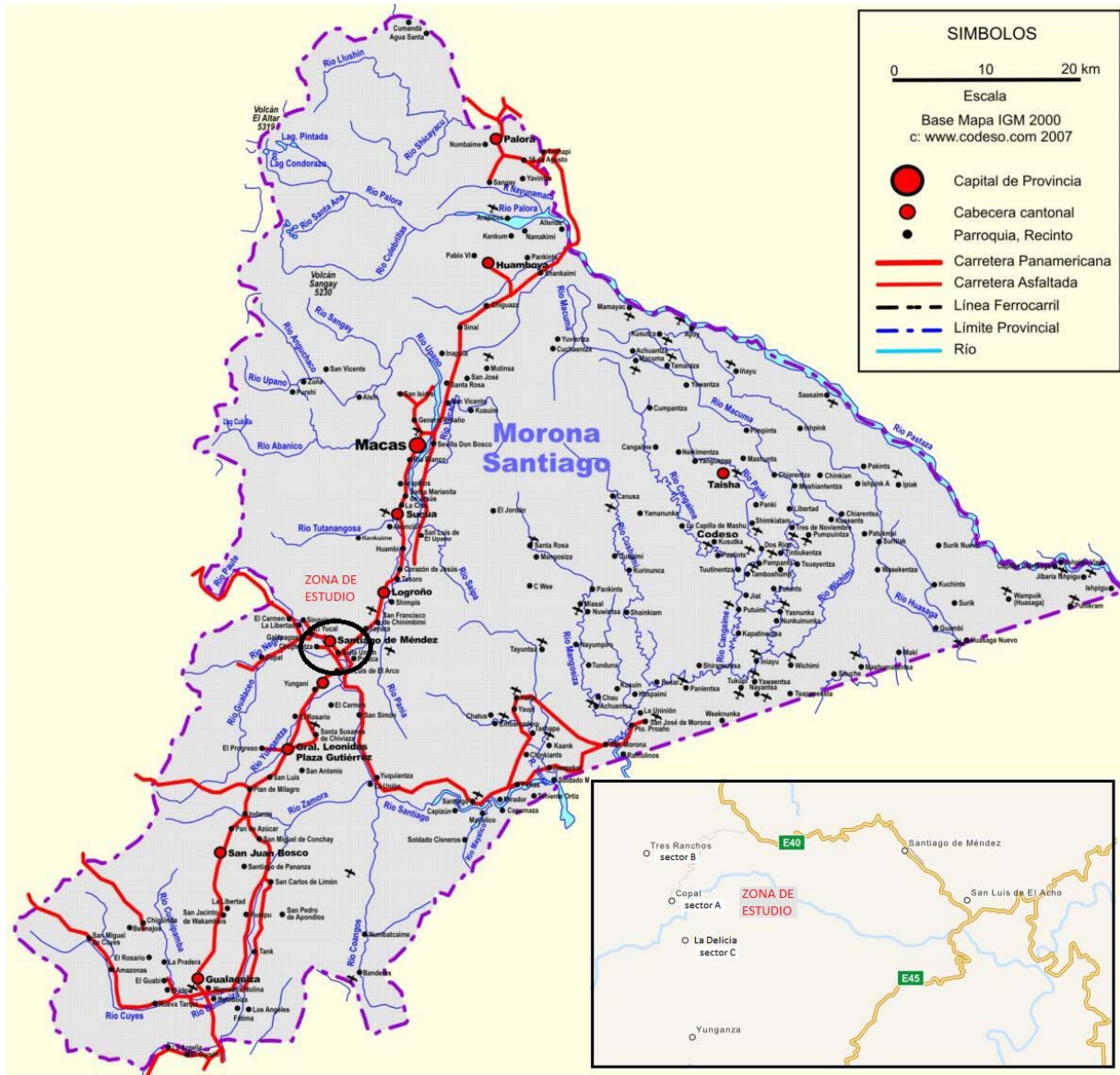


Figura 8. Ubicación de las zonas de estudio en el Cantón Santiago de Méndez (Codeso, 2007).

La zona de estudio se presenta en la Figura 8. Se establecieron tres sectores para la colección de especies:

El sector A corresponde a Copal (20° 40' 57" S - 78° 24' 00" O) tiene una altura de 1 407 msnm, es un bosque secundario con abundante vegetación arbustiva y epífita. Presencia constante de deslizamientos y derrumbes debidos a fallas geológicas activas.

El **sector B**, pertenece a Tres Ranchos ($2^{\circ} 44' 34''\text{S} - 78^{\circ} 25' 05'' \text{O}$) a una altura de 963 msnm, es un bosque secundario con abundantes arbustos y abundante vegetación epífita, con huellas de extracción de madera.

El **sector C**, La Delicia ($02^{\circ} 44' 46''\text{S} - 78^{\circ} 19' 06''\text{O}$.) con una altura de 644 msnm, es un bosque secundario con arbustos y vegetación epífita, con áreas pobladas.

Este sector está modificado por actividades humanas, destacándose áreas agrícolas y ganaderas.