

# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERÍAS EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

**ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TEMA:** EFECTO DE DOS FITOHORMONAS EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN  
DE LA ORQUÍDEA *Epidendrum* sp BAJO CONDICIONES In Vitro

**AUTOR:** MARÍA CECILIA PLACENCIA CARRERA.

**DIRECTOR:** ING. OSWALDO ROMERO.

**ASESORES:** Dra. Lucía Toromoreno  
Ing. Jheny Quiroz  
Ing. Galo Varela

**AÑO:** 2010

**LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN:** Laboratorio de Biotecnología de la Universidad  
Técnica del Norte.

**BENEFICIARIOS:** Estudiantes de la Universidad, Fonsalci, cultivadores de orquídeas.

## HOJA DE VIDA



**APELLIDOS:** Placencia Carrera.

**NOMBRES:** María Cecilia.

**C. CIUDADANÍA:** 100286712-3

**TELÉFONO CONVENCIONAL:**

**TELÉFONO CELULAR:** 088103268 o 086955966.

**E-mail:** [ozy2008c777@hotmail.com](mailto:ozy2008c777@hotmail.com)

**DIRECCIÓN:**

**Provincia:** Imbabura.

**Cantón:** Antonio Ante.

**Parroquia:** Imbaya.

**Calle:** Vía Urcuqui km. 5 Entrada al barrio Guayllabamba

**AÑO:** 05 de Febrero 2010.

**DATOS DE LA EMPRESA DONDE TRABAJA:**

Cumplo con las funciones de vocal principal en la Junta Parroquial de Imbaya por el período 2009-2014.

**DIRECCIÓN:**

**Provincia:** Imbabura.

**Cantón:** Antonio Ante.

**Parroquia:** Imbaya.

**Calle:** Cornelio Chiriboga.

**Teléfono:** (06) 2606-147

## INTRODUCCIÓN

La familia de las orquídeas es el grupo más diverso y extenso de plantas con flor que existe sobre el planeta. La diversidad en tamaño, forma y colores, especialmente de sus flores, las convierte en un atractivo como plantas ornamentales, aunque también se han utilizado como comestibles, aromatizantes y medicinales.

Ecuador es reconocido por poseer una gran diversidad de orquídeas, sin embargo, muchas de las especies que existen en su territorio (al igual que sucede en otras partes del mundo) están en peligro de extinción. La deforestación ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas epífitas, las cuales, al ser tan especializadas en su ecología, se ven seriamente afectadas por los cambios ambientales.

El género *Epidendrum* sp., según White (1996), está compuesto por epífitas, endémicas de América tropical. Su hábitat se extiende desde la península de la Florida hasta el Norte de Argentina. Su tallo puede llegar a medir hasta 2m de altura y sus flores perfumadas, aparecen en el extremo del tallo cubierto de hojas y duran varios meses, sus colores son el blanco, verde, amarillo, rojo y fucsia; sus inflorescencias llevan docenas de flores diminutas, pero muy elaboradas.

La especie *Epidendrum* sp. en Ecuador, es conocida comúnmente como “mayitas”; esta flor es utilizada en medicina tradicional para malestares febriles y molestias de riñón, es una de las especies en peligro de extinción actualmente. La urbanización, la extracción de individuos silvestres de los bosques y el mal manejo que se le ha dado por parte de aquellos que poseen ejemplares, ha determinado esta realidad.

El cultivo *in vitro* se perfila como una serie de técnicas alternativas para la reproducción de orquídeas bajo condiciones asépticas controladas. La propagación masiva *in vitro* de orquídeas, ya sea por medio de semillas o tejidos, produce altos niveles de multiplicación en períodos de tiempo cortos, además asegura la sanidad del material en multiplicación. Por lo tanto, el cultivo *in vitro* se perfila como una respuesta alternativa para el problema de las especies en peligro de extinción y en el mantenimiento de híbridos de gran valor.

Conociendo esta realidad el presente trabajo tuvo la finalidad de contribuir con un aporte investigativo y científico cuyo propósito fue medir el efecto del ácido naftaelenacético (ANA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de segmentos nodales de la orquídea *Epidendrum* sp., bajo condiciones de laboratorio, *in vitro*.

### OBJETIVO:

Determinar el efecto de dos fitohormonas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum* sp., bajo condiciones *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Se utilizaron como fuente de segmentos nodales, la orquídea *Epidendrum* sp. provenientes del invernadero del Fonsalci ubicado en la loma de Guayabillas.

### Cultivo *in vitro*

### Segmentos nodales y desinfección

Se utilizaron como explantes segmentos nodales de tallo entre (3cm de longitud) vigorosos y vegetativos con una yema axilar.

El proceso de desinfección del material vegetal fue el siguiente:

- Los segmentos de tallo fueron lavados y sumergidos con agua corriente y jabón líquido en una solución de 50ml/litro, durante 30 minutos.
- Se colocaron los segmentos de tallo en Tween<sup>®</sup>20, en la dosis de 15ml/litro, durante 20 minutos y se agitó ocasionalmente.
- Se sumergieron los segmentos de tallo en Captan<sup>®</sup> 80%DF a una concentración de 1 g/litro, durante 5 minutos.
- Los segmentos de tallo fueron lavados tres veces, por dos minutos, con agua estéril.

**a) Desinfección de los segmentos de tallo y obtención de segmentos nodales de *Epidendrum* sp.**

- Los segmentos de tallo fueron sumergidos por un minuto en alcohol de 70° se agitó ocasionalmente y se enjuagó tres veces con agua estéril.
- Los segmentos de tallo se colocaron en agua oxigenada al 3% durante 1 minuto se agitó ocasionalmente y se enjuagó tres veces con agua estéril durante dos minutos.
- Se realizó un corte transversal utilizando la parte media del segmento de tallo, para obtener un segmento nodal con su respectiva yema en estado latente, en una longitud 2cm a partir del entrenudo a cada lado, para evitar su deterioro como fue evidenciado en los pre-ensayos al utilizar segmentos pequeños nodales pequeños.

### **Diseño Experimental**

Los datos se analizaron aplicando Análisis de la Varianza a un criterio de clasificación (diseño completamente al azar), para todas las variables a excepción de la variable número de tubos contaminados. Los tratamientos contenían diferentes dosis de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalénacético (ANA) excepto el testigo. Se utilizaron seis tratamientos, diez repeticiones, cuatro tubos por unidad experimental. La prueba de tukey al 5% fue aplicada en el caso de encontrar diferencias significativas y DMS al 5% para la variable número de tubos contaminados. Las variables analizadas fueron: numero de tubos contaminados, longitud de yema, sobrevivencia.

### **Preparación de Medios de Cultivo**

- Se preparó medio Murashige Skoog (MS), 200ml para cada tratamiento utilizando los siete stocks, sucrosa y agar.
- Se adicionó las fitohormonas; ácido naftalénacético (ANA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) en dosis diferentes excepto el testigo (Cuadro 2).
- Se reguló el pH a 5.5 con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en una concentración de 0,0001ppm, e hidróxido de Sodio (NaOH) en la misma concentración.
- El medio de cultivo fue calentado para luego adicionar agar a una concentración de 7.5gr/l.
- El medio de cultivo se repartió en 40 tubos de ensayo 5ml/tubo.
- Los tubos de ensayo se sellaron con papel aluminio y se colocaron en una funda plástica, para su esterilización en el autoclave a 15 libras de presión durante quince minutos.
- Los tubos de ensayo fueron llevados al refrigerador durante quince minutos previo a su utilización.
- Los segmentos nodales se colocaron en medio de cultivo.
- Los tubos de ensayo se sellaron con plástico osmótico, con el fin de evitar contaminación y deshidratación de los segmentos nodales.
- Los tubos fueron trasladados al cuarto de incubación con una humedad relativa del 60% y una temperatura de 24 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

#### Dosis de BAP y ANA

TRATAMIENTOS	BAP x ANA
T1	0* x 0*
T2	0.5* x 1.0*
T3	1.0* x 1.5*
T4	1.5* x 2.0*
T5	2.0* x 2.5*
T6	2.5* x 3.0*

\*mg/l

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### EFFECTO DE LA CITOQUININA 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) Y LA AUXINA ÁCIDO NAFTALÉNACÉTICO (ANA) EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN

##### Número de Tubos contaminados.

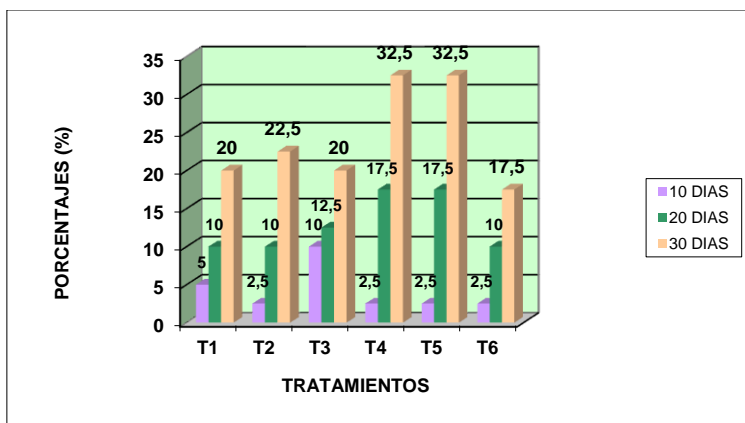
El análisis de varianza, determinó que existe una diferencia significativa al 1% para días. No se detectaron diferencias significativas para tratamientos, por lo que se asume que los componentes de cada formulación no influyeron en la contaminación de los segmentos nodales. El coeficiente de variación fue del 30.96%.

Prueba de significación de DMS al 5% para días.

DÍAS	MEDIAS	RANGOS
30	9.66	A
20	5.17	B
10	1.67	C

La prueba DMS al 5% para tratamientos detectó la presencia de tres rangos. En el primer rango se ubicó los 30 días, en el segundo los 20 días y en el tercero los 10 días en que fueron evaluados el número de tubos contaminados.

Esto permite señalar que a medida que transcurre el tiempo, también se incrementa el número de tubos contaminados. Básicamente, hasta el momento se puede afirmar que la contaminación fue causada por hongos, pues se evidenció la presencia de micelio, esta contaminación estaría atribuida a que el material vegetal empieza a necrosarse en la cicatriz de corte, sitio en el cual se observó la contaminación.



Porcentaje de contaminación a los 10, 20 y 30 días en segmentos nodales de *Epidendrum* sp.

### Longitud de yemas

Medias Longitud de yemas en cm.

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T1	1.17
T2	1.22
T3	1.27
T4	1.33
T5	1.29
T6	1.19

En el análisis de varianza detectó que existen diferencias significativas al 1% entre tratamientos. El coeficiente de variación fue del 8.30%,. El promedio de longitud del brote desarrollado a partir de la yema fue de 1.24cm.

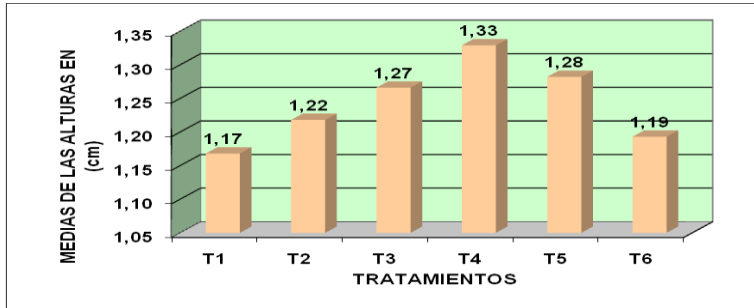
Prueba de Tukey al 5% para longitud de yemas

TRATAMIENTOS	MEDIAS	RANGOS
T4	1.33	<b>A</b>
T5	1.28	<b>AB</b>
T3	1.27	<b>AB</b>
T2	1.22	<b>AB</b>
T6	1.19	<b>AB</b>
T1	1.17	<b>B</b>

La prueba de Tukey al 5% para tratamientos detectó la presencia de dos rangos. Siendo los tratamientos que ocupan el primer rango T4, T5, T3, T2 y T6, los que desarrollaron una mayor longitud de yema en relación al T1 que ocupa el segundo rango.

El desarrollo de las yemas en los segmentos nodales fue evidente a los 15 días de haber sido tratados con reguladores de crecimiento. Se observó un mayor desarrollo de yemas en el T4 en concentraciones de 1.5mg/litro de BAP y 2.0mg/litro de ANA que alcanzó un promedio de 1.33cm de longitud. Esto concuerda con lo encontrado por (Jiménez y Guevara 1996) quienes reportaron un mayor crecimiento de yemas a concentraciones combinadas de 1.5mg/litro de BAP y 2.0mg/litro de ANA en *Phalaenopsis* sp, usando segmentos nodales como explantes.

Se hace evidente que existe una interacción de las fitohormonas utilizadas con la capacidad de absorción de los tejidos por difusión, observación que ya fuera señalada por Chico *et al*, (2002), quien trabajando con segmentos nodales de *Vitis vinífera* var. "borgoña" expuestos a diferentes concentraciones de BAP y ANA, observó un desarrollo de yemas distinto para cada formulación.



Medias para la longitud de yemas de *Epidendrum* sp.

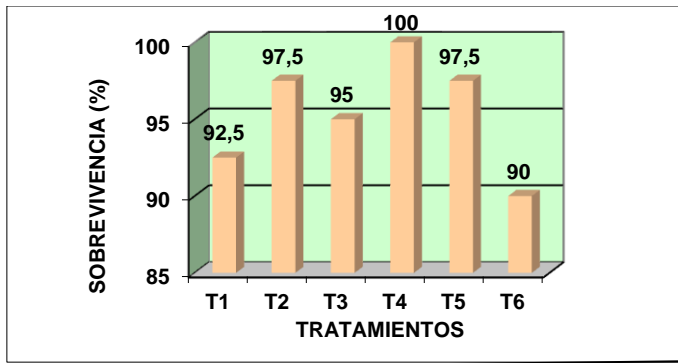
### Sobrevivencia

Porcentaje de sobrevivencia en la Fase de Introducción.

TRATAMIENTOS	MEDIAS (%)
T1	92.5
T2	97.5
T3	95.0
T4	100
T5	97.5
T6	90

En el análisis de varianza determina que no existen diferencias significativas entre tratamientos por lo que se considera que no hay influencia de los componentes de los tratamientos en el porcentaje de sobrevivencia. El coeficiente de variación fue del 11.22%.

A pesar de que T4 fue el tratamiento con mayor porcentaje de contaminación, alcanzó el 100% de sobrevivencia. Se puede afirmar que la contaminación, al estar presente en tejido necrosado de la cicatriz de corte ubicada fuera del medio no afectó a la yema en crecimiento ubicada en la parte central del segmento nodal, que se desarrolló normalmente, mientras que, en los trabajos realizados por Pierick (1960), la contaminación del medio y la mala desinfección, provocó la muerte de los explantes de *Cymbidium* sp., por la deficiente absorción de los nutrientes.



Porcentajes de supervivencia de los segmentos nodales a los 30 de duraci3n de la Fase de Introducci3n.

### CONCLUSIONES

Las dos fitohormonas utilizadas en la fase de introducci3n de la orquídea *Epidendrum* sp., bajo condiciones *in vitro* promovieron el crecimiento de las yemas en estado latente consiguiendo consigo la formaci3n de una vitro-planta completa con la formaci3n de raíces.

En cuanto al n3mero de tubos contaminados el T6 obtuvo el menor porcentaje de contaminaci3n en relaci3n de los dem3s tratamientos, debido a que no existi3 necrosamiento en la cicatriz de corte, sitio donde se present3 la contaminaci3n por hongos en los dem3s tratamientos.

Se logró la mayor longitud de yema con 1.5mg/l de 6- Benzilaminopurina (BAP) y 2.0mg/l de Ácido naftalénacético (ANA), correspondientes a T4 a pesar que fue el tratamiento que present3 mayor contaminaci3n con esto se concluye que la contaminaci3n de los segmentos nodales no influye en su desarrollo, cuando esta no sea proveniente del medio o por una mala desinfecci3n de los segmentos nodales, adem3s se alcanz3 un desarrollo de raíces consiguiendo la formaci3n de una vitroplanta completa.

En lo que respecta a la variable porcentaje de supervivencia, no se detectaron diferencias significativas, pero cabe recalcar que el tratamiento T4 alcanz3 el 100% de supervivencia al final de la Fase de Introducci3n.

### RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones acerca de cultivo *in vitro* de orquídeas se recomienda lo siguiente:

Realizar la continuaci3n del estudio con las fases de micropropagaci3n y acondicionamiento *ex - vitro* de la orquídea *Epidendrum* sp.

Realizar la preparaci3n de las plantas madre por lo menos tres meses dentro de un ambiente adecuado, para que no existan problemas al momento de introducir el material vegetal al cultivo *in-vitro*, para lo cual se necesita un invernadero con acceso restringido y con riego localizado para cada planta y realizar la aplicaci3n de fungicidas sist3micos para aumentar las probabilidades de éxito en la Fase de Introducci3n.

Probar con dosis intermedias de las Fitohormonas 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido naftaelenacético (ANA) y comparar con los resultados ya obtenidos.

Transferir los segmentos nodales antes de los treinta días para evitar la contaminaci3n en la cicatriz de corte.



## BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. ABDELNOUR, A. Y MUÑOZ, A. 1997. Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión. pp 4-10. Disponible: [www.cultivo.org.htm](http://www.cultivo.org.htm) (consulta 10-07-09)
2. ABDELNOUR, A. Y VINCENT, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 38 p.
3. AMERICAN ORCHID SOCIETY. 1995. El cultivo de las cattleyas y sus híbridos. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. Por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 48-49.
4. AMERICAN ORCHID SOCIETY. *Cattleya maxima* comment. (<http://www.orchidworks.com/orchids/cattleya/maxima-c.htm>). 1996. (Consulta 07-07-09)
5. ARENA, M., y MARTINEZ, G., (1992). El cultivo in Vitro en la propagación de plantas. PROVEG (Programa de recursos vegetales y desarrollo fruti hortícola) del CADIC. Disponible en: [www.cadicush.org.ar/proveg.htm](http://www.cadicush.org.ar/proveg.htm).(Consulta 03-03-08).
6. ARDITTIT, J Y ERNETS, R. 1993. Micropropagation of orchids. New York, United States of America. John Waley & Sons, Inc. pp 25-86,199-240.Disponible:[www.cultivo.org/htm](http://www.cultivo.org/htm).(Consulta 05-06-09)
7. BARRAGAN, R., (1997) Principios de Diseño Experimental. 12-25pp.
8. CANERA, (1984) Generalidades de las orquídeas.
9. DRESSLER, R.L. 1993. Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. New York, Estados Unidos de América. Cornell University Press. 374 p.  
Disponible en: (<http://www.orchidworks.com/orchids/cattleya/maxima-c.htm>). (Consulta 09-10-09)
10. DYCHDALA, G.R. 1977. Disinfection, Sterilisation and Preservation. In: Block ss (ed). Philadelphia, United States of America. Lea and Sebigier. pp 167-195.Disponible: [www.protocolos](http://www.protocolos.org) de desinfección orquídeas.
11. ECHEVERRÍA, M., (1997) Propagación in Vitro de Nogal (Junglas neotropica diles) Tesis de Ingeniería Forestal. UTN. Ibarra- Ecuador. 64pp.
12. FAST, 1980. Orchideen Kulture. Verlag E. Ulmer, Stuttgart: 1-460. Flores, E. 1998. La Planta: estructura y función. 2 ed. Cartago, Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 501 p. Disponible: [www.plantas](http://www.plantas.org) estructura htm.. (Consulta 18-08-09).
13. FÉRRAES, L., (2000), Las Orquídeas en los Tuxtla. Edición libre. Documento circulación limitada, 65pp.
14. FOLDATS, (1969), Orchidaceae, flora of Venezuela. Volumen 5.
15. GARCÍA, J. 1995. La Subtribu Laeliinae: las *Epidendrum* y sus parientes. En: Orquídeas de y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. Disponible en [www.orquideoteca.com](http://www.orquideoteca.com) (Consulta 05-05-09).
16. GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture Part 1: The Technology. 2ed. England. Exegetics Ltda. 574 p. Disponible en: [www.Tecnología.org](http://www.Tecnología.org) del cultivo de orquídeas. 2003. (Consulta 07-07-09)
17. GONZÁLEZ, F. 1995. Presentación. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 4-5.
18. GUTIÉRREZ, C. y CHEN-HAN, J. 1994. Propagación clonal *in vitro* de *Cattleya* por medio de meristemos. Instituto Nacional de Aprendizaje. 13 p.
19. HOMES *et al.* 1972. Bull. Soc. Roy. Belg. 106: 123-128
20. HORICH, C. 1980. Las Cattleyas en Costa Rica. En: Orquídeas: su cultivo en Costa Rica. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Impresora Delta, S.A. pp 9-11. Disponible en: [www.orquideas.com](http://www.orquideas.com) (consulta 05-05-09).
21. HUANG, L. C. 1984. Alternative media and method for *Cattleya* propagation by tissue culture. American Orchid Society Bulletin. 53:167-170. Disponible: [www.propagacion](http://www.propagacion.org) orquídeas (Consulta 14-12-08).
22. HUDSON, T., Hartmann y DALE, E. Kester, (1987) Propagación de plantas, principios y prácticas. Primera edición. Compañía Editorial Continental. S.A. México 575, 576, 576 pp.
23. INTUWONG, O.; KUNISAKI, J.T.; Y 1972. Vegetative propagation of Phalaenopsis by flower stalk cuttings. Na Okika of Hawaii 1:13-18. Disponible: [www.orquideas.org](http://www.orquideas.org) [http://invitro](http://invitro.org) (consulta 12-11-08).

24. JIMENEZ y GUEVARA: Propagación in vitro de Phalaenopsis mediante cultivo in vitro.
25. KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin. 15: 214-217.
26. KRİKORIAN, A.D. 1991a. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 41-78.
27. KRİKORIAN, A.D. 1991b. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 95-125.
28. KUAN, C. y GONZÁLEZ, L. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. pp 1-16, 47-53, 75-76.
29. LEFFRING. 1968. Meded. Dir. Tuinbouw. 31: 392-395.
30. LINDEMANN, E. G. P.; GUNKENL, J. E. y DAVISON, O. W. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin. 39: 1002-1004.
31. LITZ, R.E y JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura.
32. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 143-172.
33. MORA, D y WARNER, J. 1995. La conservación de las orquídeas en el Jardín Botánico
34. LANKESTER. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. Litografía e Imprenta LIL. pp 54-55.
35. MORA-RETANA, D. y García, J. 1992. Lista actualizada de las orquídeas (Orchidaceae). En: Brenesia. (37). Ed. Por Departamento de Historia Nacional. pp 79-124.
36. MOREL, G. M. 1960. American Orchid Society Bulletin. 29: 495-497.
37. MOREL, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymb. Soc.
38. MOREL, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. En: The Orchids: Scientific studies. Ed. por Withner C.L. New York, United States of America. John Wiley and Sons. pp 169-222.
39. MROGINSKI, L. A. y Roca, W. M. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 19-40.
40. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiology. 25:135-166.
41. MURASHIGE, T. 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. Botanical Bulletin of the Academia Sinica. 18:1-24.
42. MURASHIGE, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15:473-497.
43. PIERIK, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. 343 p.
44. QUESADA, A. 1997. Interpretación de los sectores y senderos del Jardín Botánico
45. LANKESTER. Tesis para optar el grado de licenciatura con énfasis en interpretación ambiental. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 137 p.
46. Reinert, R. A. y Mohr, H. C. 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem. Pro. Am. Soc. Sci. 91: 664-671.
47. RODRÍGUEZ, R. 1995. Orquídeas y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. Litografía e Imprenta LIL. Pp 31-35.
48. RODRÍGUEZ, R.; Mora, D; Barahona, M. y Williams, N. 1986. Orquídeas de Costa Rica. San José, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 336 p. Disponible en: <http://www.orchidworks/maxima-c.htm>. (Consulta 06-03-09)
49. SCULLY, R.M. Jr. 1967. Aspects of meristem culture un *Cattleya* Alliance. American Orchid Society Bulletin. 36: 103-108.

## RESUMEN EJECUTIVO

Ecuador es reconocido por poseer una gran diversidad de orquídeas, sin embargo, muchas de las especies que existen en su territorio (al igual que sucede en otras partes del mundo) están en peligro de extinción. La deforestación ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas epífitas, las cuales, al ser tan especializadas en su ecología, se ven seriamente afectadas por los cambios ambientales.

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo para el cultivo inicial de la orquídea *Epidendrum* sp., mismo que consiste en obtener la desinfección adecuada, para los segmentos nodales y observar la respuesta de estos sometidos a diferentes dosis de fitohormonas.

La investigación se desarrolló durante el año 2009, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en la Provincia de Imbabura, Cantón Ibarra, Parroquia Caranqui, a una altitud de 2 254 msnm.

El trabajo comprendió dos partes. En la primera se determinó el Protocolo de desinfección para segmentos de tallo. El 85% de eficiencia correspondió a la combinación de 50 ml/l de jabón líquido durante por 30 minutos; inmediata inmersión por 20 minutos en solución de 15ml/l de Tween<sup>®</sup> 20; y, lavado con una solución de 1000 mg/l de Captan<sup>®</sup> 80, durante 5 minutos. Dentro de la cámara de flujo laminar se utilizó alcohol al 70% y agua oxigenada al 3% por un minuto; y, enjague con agua estéril por dos minutos, en tres ocasiones. En la segunda parte, se probaron seis tratamientos en dosis combinadas de la auxina ácido naftalenacético (ANA) y la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones incluyendo el testigo sin fitohormonas. Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar las variables: longitud de la yema y porcentaje de sobrevivencia y el Diseño Bloques Completos al Azar (DBCA) para la variable número de tubos contaminados. Se realizaron diez repeticiones y cuatro tubos de ensayo por unidad experimental. Cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey al 5%.

Los segmentos nodales preparados dentro de la cámara de flujo laminar, se insertaron en medio de cultivo; los tubos de ensayo se sellaron con plástico osmótico y se trasladaron al cuarto de incubación alternando 16 horas luz con ocho de oscuridad a una temperatura de 25° C.

El ADEVA detectó diferencias significativas al 1% en la variable Número de tubos contaminados debidas a bloques (días). Al no encontrar diferencias entre tratamientos, se concluyó que los componentes del medio no influyen en la contaminación. En la variable Longitud de yemas se detectaron diferencias significativas atribuidas a tratamientos. T4 (1.5mg/l BAP x 2.0mg/l ANA) alcanzó la media más alta con 1,33cm de longitud y la presencia de raíces, obteniéndose de esta forma una vitro-planta completa. En cuanto a la Sobrevivencia de los segmentos nodales, no se detectaron diferencias significativas. T4 obtuvo el 100% de sobrevivencia.

Se recomienda utilizar el Protocolo de desinfección desarrollado, para estudios de multiplicación in vitro de *Epidendrum* sp. y otras orquídeas; probar la longitud de los segmentos nodales para el proceso de incubación; evaluar el comportamiento de la vitroplanta en las fases de micropropagación y acondicionamiento *ex -vitro*; y, asegurar la idoneidad del material a utilizar, mediante la ejecución de un programa de desinfección de plantas madre.

## SUMMARY

Ecuador have more orchids, but is in extinction for deforestation and extraction the plants of nature.

The objective of the present study was to This following investigation was developed in Laboratory of Biotechnology Vegetal of the Technical University the one which located in the Province of Imbabura, City Ibarra, and Parish Caranqui with an altitude 2254msnm.

The investigation consisted in two parts: In the one part was determinate disinfecting treatment to stem segments of *Epidendrum* sp., with during the year 2009. In the part not used analysis statistical but perceptual analysis, the effective disinfecting treatment consisted in 50ml/l liquid soap (30 minutes respectively), immediately immersion in Captan 80% @ 1gr/l (5 minutes). Within camera the explants were immersed in Alcohol 70% and peroxide hydrogen for (one minute) and wash to sterile water for two minutes. In the Second Part was developed the experimental work with six treatments contained Murashige Skoog (MS) much different doses the fitohormenes auxin naftalenacetic acid (ANA) and cytokinin 6-Bencilaminopurine (BAP) excepting of witness. The evaluation factors were the number of contamination tubes, length leaf and perceptual survive. Used (DCA) and (DBCA) for variable number of contamination tubes, for the evaluate variables in which it was determinate significant differences used the Tukey test at 5%.

The nodal segments was inoculate in aseptic medium, and collocated en the room incubation with temperature 25 °C and 16 hours lux, eight hours of obscure.

In the variable number of contamination tubes detected significant differences at 1% for days, in evaluate variable not detected significances for treatments, but not influence the components of the medium. There were significant differences found in the variable length leaf, considered of T4 obtain the 1,33cm the length, the vegetative buds produced leaves and roots. In the perceptual survive not detected differences but T4 obtained 100% of survive.

For future investigations recommend continue with other phases micropropagation and conditioned *ex-vitro* the orchid *Epidendrum* sp., besides make treatment the plants with systemic poison before introduction *in vitro* and used the treatment disinfecting developed for *Epidendrum* sp.