



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA DE LOS RECURSOS
NATURALES.

TEMA:
DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE LA ESPECIE
CAUCAEA PICHINCHAE ORCHIDACEAE

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA DE LOS RECURSOS NATURALES

AUTORAS: CEVALLOS LÓPEZ GABRIELA ISABEL
SALTOS JARAMILLO GENESIS ARIEL

TUTOR: MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito-Ecuador

2022

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Gabriela Isabel Cevallos López con documento de identificación N° 1724326200 y Genesis Ariel Saltos Jaramillo con documento de identificación N° 0604855718; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 01 de diciembre del 2022.

Atentamente,



Gabriela Isabel Cevallos López

1724326200



Genesis Ariel Saltos Jaramillo

0604855718

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, Gabriela Isabel Cevallos López con documento de identificación N° 1724326200 y Genesis Ariel Saltos Jaramillo con documento de identificación N° 0604855718, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Desarrollo de un protocolo para el cultivo *in vitro* de la especie *Caucaea pichincha* Orchidaceae”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 01 de diciembre del 2022

Atentamente,

Gabriela Isabel Cevallos López

1724326200

Genesis Ariel Saltos Jaramillo

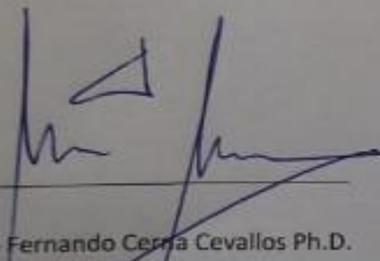
0604855718

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos con documento de identificación N 0501872071, docente de la universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo, mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **DESARROLLO DE PROTOCOLOS PARA CULTIVO IN VITRO DE ESPECIES DEL GÉNERO CAUCAEA ORCHIDACEAE**, realizado por Gabriela Isabel Cevallos López con documento de identificación N1724326200 y por Genesis Ariel Saltos Jaramillo con documento de identificación N0604855718, obtenido como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 01 de diciembre del año 2022

Atentamente



Marco Fernando Cerna Cevallos Ph.D.
C.L. 0501872071

Dedicatoria

A mi madre y a mi padrastro por haberme apoyado en el transcurso de estos años, siempre brindándome su cariño y palabras de aliento para continuar y culminar mis estudios, a mi hermana Cindy por estar para mí cuando más la he necesitado, y a Sebastian que, si bien no estuvo durante el inicio de mi carrera, me alentó para poder llegar hasta el final con toda su paciencia y amor.

Con mucho cariño a todas las personas que me acompañaron y apoyaron, incluso cuando yo misma no lo hacía, gracias por poner su confianza en mí.

Genesis

A mí misma por todo el esfuerzo y dedicación que he puesto para alcanzar mis logros, por ser valiente, seguir intentado, y por soñar ya que gracias a eso cumplo un objetivo más en mi vida.

A mi abuelita y mi mamá por las veces que me escucharon, aconsejaron y me dieron impulso, sobre todo aquellas personas que llegaron a mi vida haciéndola maravillosa pues han sido mis más grandes maestros inspirando y sacando lo mejor de mí, contribuyendo y haciendo de mí una mejor persona.

“Empieza haciendo lo necesario, después lo posible, y de repente te encontrarás haciendo lo imposible” (San Francisco de Asís).

Gabriela

Agradecimientos

Agradecemos a nuestro tutor Marco Cerna PhD, por brindarnos su apoyo, compartir sus conocimientos y por hacer posible este trabajo de investigación.

Al grupo de investigación Nunkui Wakan por abrirnos sus puertas y otorgar el financiamiento de esta investigación.

A la ingeniera Elizabeth Yugsi, quién nos brindó su apoyo y conocimientos para poder lograr este proyecto.

Especialmente a nuestras respectivas madres que siempre nos apoyaron, nos brindaron sus palabras de aliento y nunca nos dejaron caer en el transcurso de nuestra vida universitaria.

Agradecemos a Dios por darnos tranquilidad, fuerza y guiar nuestros pasos para poder enfrentar las adversidades que aparecen en nuestras vidas.

A nuestras respectivas familias por su apoyo, amor incondicional y a la vida por lo bueno y sobre todo lo malo que nos hizo aprender y crecer.

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo conservar a la especie *Caucaea pichincha*, mediante el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro*, con el fin de disponer de material genético necesario para su estudio y comercialización. La colecta del material vegetal se realizó en el mes de marzo en las faldas del volcán el Corazón del cantón Mejía en el bosque protector Umbría, utilizando cápsulas maduras, empleando la técnica de tetrazolio cuya prueba de viabilidad fue de 96,5%, posteriormente se realizó la preparación de los tres medios de cultivo: M1: Medio Knudson plus; M2: Medio Vacin and Went; M3: Lindeman, manteniendo un pH de 5,8 para favorecer la posterior absorción de nutrientes, en cuanto a la preparación de giberelinas se emplearon tres concentraciones de 0,05, 0,1 y 0,2 mg/L, a partir de una solución madre de 1 ppm. Para la desinfección de las semillas, se empleó una jeringa de 10 mL con un trozo de algodón que retenía las semillas, con una solución de hipoclorito al 3% suplementada con dos gotas de tween, luego se las enjuagó con agua destilada, posterior a esto se inoculó sobre los medios de cultivo dos gotas por tubo de ensayo, dispersando uniformemente para que cubran bien la superficie, el proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar bajo condiciones asépticas. Los resultados mostraron que el medio de cultivo M2 con la concentración de giberelinas (GA3) al 0,1 mg/L, presentó un mayor número de protocormos, por lo cual se pudo concluir que esta fitohormona incrementa la cantidad de protocormos al inducir la división celular a una baja concentración, y que el medio Vacin and Went puede ser empleado para obtener un mayor porcentaje de protocormos de la especie, en conjunto con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

Palabras clave: *Caucaea*, cultivo *in vitro*, protocormo.

Abstract

This research aimed to conserve the *Caucaea pichincha* species, through the development of in vitro culture techniques, in order to have the genetic material necessary for its study and commercialization. The plant material was collected in march on the slopes of the Corazón volcano in the Mejía canton in the Umbría protective forest, using mature capsules, employing the tetrazolium technique whose viability test was 96.5%, later prepared the three culture media: M1: Knudson plus medium; M2: Middle Vacin and Went; M3: Lindeman, maintaining a pH of 5,8 to favor the subsequent absorption of nutrients, in terms of the preparation of gibberellins, three concentrations of 0,05, 0,1 and 0,2 mg/L were used, from a 1 ppm stock solution. For the disinfection of the seeds, a 10 mL syringe was used with a piece of cotton that retained the seeds, with a 3% hypochlorite solution supplemented with two drops of tween, then they were rinsed with distilled water, after these two drops per test tube were inoculated on the culture media, dispersing uniformly so that they cover the surface well, the process was carried out inside the laminar flow chamber under aseptic conditions. The results showed that the M2 culture medium with the concentration of gibberellins (GA3) at 0,1 mg/L, presented a greater number of protocorms, for which it was possible to conclude that this phytohormone increases the amount of protocorms by inducing cell division at a higher rate. low concentration, and that the Vacin and Went medium can be used to obtain a higher percentage of protocorms of the species, together with a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness.

Keywords: *Caucaea*, *in vitro* culture, protocorm.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	1
I. Marco conceptual.....	3
1.1 Generalidades de las orquídeas	3
1.2 Hábitat	3
1.3 Distribución en Ecuador.....	3
1.4 Características botánicas de las orquídeas	4
1.4.1 Raíces	4
1.4.2 Pseudobulbos.....	4
1.4.3 Tallo	4
1.4.4 Hojas.....	5
1.4.5 Flores	5
1.4.6 Frutos y semillas.....	6
1.5 Taxonomía.....	7
1.6 Género <i>Caucaea</i> :.....	8
1.6.1 Distribución Geográfica	8
1.6.2 Descripción del género.....	8
1.6.3 Especie a estudiar: <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan.....	8
1.6.4 Descripción morfológica <i>Caucaea pichincae</i> Orchidaceae	9
1.7 Identificación, almacenamiento y conservación de semillas de Orchidaceae.....	10
1.7.1 Generalidades	10
1.7.2 Evaluación de la viabilidad de semillas	11
1.7.3 Conservación de semillas	11
1.8 Cultivo <i>in vitro</i>	12
1.8.1 Desarrollo de protocormos	12
1.8.2 Factores ambientales de los cultivos <i>in vitro</i>	13
1.8.3 Protocolo para cultivo <i>in vitro</i>	13
1.8.4 Protocolo de desinfección y siembra <i>in vitro</i> del explante.....	14
1.9 Germinación <i>in vitro</i> de semillas de Orchidaceae.....	14

1.10 Crecimiento <i>in vitro</i> de las semillas de Orchidaceae	15
1.11 Medios de cultivo	15
1.11.1 Macronutrientes.....	16
1.11.2 Micronutrientes	16
1.11.3 Vitaminas	16
1.11.4 Reguladores de crecimiento	17
1.11.5 Materiales de soporte	18
1.12 Medios de Cultivo para orquídeas.....	18
1.13 Cámara de flujo laminar	19
1.14 Manejo <i>in vitro</i> de las plántulas a nivel de cámara de crecimiento.....	19
II. Metodología.....	21
2.1 Área de estudio.....	21
2.2 Recolección material vegetal	21
2.3 Viabilidad en semillas	21
2.4 Preparación medios de cultivo y giberelinas.....	22
2.5 Desinfección de semillas.....	23
2.6 Cámaras de crecimiento	24
2.7 Análisis estadístico.....	24
2.7.1 Diseño experimental.....	24
2.7.2 Factores de estudio	26
2.7.3 Variable evaluada.....	26
3.2 Viabilidad de semilla.....	27
3.3 Evaluación de los medios de cultivo para el desarrollo de protocormos de la especie <i>Caucaea pichincha</i>	29
3.4 Evaluación del efecto de giberelinas sobre la formación de protocormos.....	32
Conclusiones:	34
Recomendaciones.....	35
Bibliografía:	36
Anexos:.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos en función a los siguientes factores planteados, concentraciones de giberelinas, medios de cultivos, cámara de crecimiento abierta y cerrado se diseñaron los siguientes tratamientos.	25
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación gráfica de las partes de una flor representante de Orchidaceae	5
Figura 2: Representación gráfica de una semilla de Orchidaceae.....	7
Figura 3: Descripción morfológica de <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan	10
Figura 4: Prueba viabilidad tetrazolio código 4434	27
Figura 5. Interacción de tratamientos código 4434.....	29
Figura 6: Desarrollo protocormos	31
Figura 7: Análisis de concentración de giberelinas código 4434.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Formulación de medio Knudson modificado	44
Anexo 2. Formulación de Medio Vacin y Went Medio de orquídea modificado	45
Anexo 3. Formulación del medio Lindemann Orquídea Basal Medio	46
Anexo 4. Recolección de las muestras de la especie <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan, en las faldas del volcán el Corazón del cantón Mejía en el bosque protector Umbría.	47
Anexo 5. Medios de cultivo empleados para el desarrollo de protocormos de <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan.	49
Anexo 6. Prueba de tetrazolio para la viabilidad de las semillas	48
Anexo 7. Protocolo de desinfección de las semillas de de <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan.	50
Anexo 8. Formación de protocormos en los medios de cultivo.	51

Introducción

En la actualidad se han registrado 4187 especies de orquídeas en Ecuador, de estas 1707 son endémicas, la mayoría de orquídeas ecuatorianas habitan en un rango de 300 a 3000 m s.n.m, en cambio en altitudes superiores se han encontrado 588 especies que representan el 18% de la población de orquídeas del país, las zonas con mayor abundancia en cuanto a la familia Orchidaceae corresponden a las estribaciones occidental y oriental de la Cordillera de los Andes (Mites et al., 2022).

La deforestación de los bosques Andinos, la destrucción de su hábitat y la comercialización ilegal, ha hecho que varias especies de orquídeas se encuentren amenazadas (Tejeda-Sartorius et al., 2017). Siendo probable que entre el 50% y 80% de las especies endémicas se encuentren en las categorías de vulnerabilidad (Orejuela-Gartner, 2010). Además, el tamaño pequeño de sus semillas y escasas reservas alimenticias representan algunas limitantes para la propagación de orquídeas de la familia Orchidaceae, ya que en condiciones naturales el proceso de germinación puede ser únicamente de 2-3% (Pérez & Castañeda, 2016).

Para contribuir en la solución de esta problemática el uso de propagación *in vitro* es una opción viable, puesto que permite la obtención de mayor cantidad de germoplasma, sin que ello implique un riesgo para la especie en cuestión, es por eso que para su conservación se aplicaron protocolos de germinación de semillas *in vitro*, ya que la ventaja de este es obtener material libre de patógenos, tasas de multiplicación altas y conservar su integridad genética (Bonilla et al., 2015).

Este trabajo de investigación, fue desarrollado con el propósito de ayudar a la conservación y brindar mayor información sobre la especie *Caucaea pichincae* Orchidaceae, mediante el desarrollo de un protocolo de cultivo *in vitro*, esto a través de la identificación de la identificación de muestras de germoplasma, una evaluación de medios de cultivo óptimos, concentración de

giberelinas adecuada y un fotoperiodo conveniente para esta especie, con el fin de disponer material genético necesario para su estudio y comercialización.

I. Marco conceptual

1.1 Generalidades de las orquídeas

Las orquídeas son conocidas como plantas con flores que presentan gran diversidad de tamaños, colores y formas, la palabra orquídea proviene del término griego *orchis* que significa testículo, haciendo referencia a los pseudobulbos (Esqueviel et al., 2021).

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos más extendidos de plantas que comprende especies terrestres, saprofitas y epifitas, se encuentran en todas las regiones del mundo con excepción de la Antártida, con una mayor distribución en las zonas tropicales y subtropicales, mantienen un alto valor ornamental debido a la belleza de sus flores, además esta familia es considerada como la más diversa de las monocotiledóneas angiospermas (Palareti et al., 2016).

1.2 Hábitat

Las orquídeas pueden desarrollarse en casi cualquier hábitat, la mayoría de las epífitas y algunas especies terrestres son tolerantes a un alto grado de sequía, el mismo que sería mortal para cualquier otro grupo de plantas, también pueden crecer en sitios con deficiencia de nutrientes y minerales, algunas especies pueden crecer en lugares bastante sombreados (Lorea et al., 2005).

1.3 Distribución en Ecuador

Ecuador es un país pequeño con una elevada diversidad de hábitats y microclimas los cuales favorecen a la biodiversidad, se encuentra entre unos de los 17 países megadiversos del mundo y consta con una mayor biodiversidad por kilómetro cuadrado que cualquier otro país (Bravo, 2019). Con respecto a la biodiversidad de las orquídeas, factores como la altura de la Cordillera de los Andes y la influencia de corrientes oceánicas atmosféricas cálidas (El Niño) y frías (Humboldt), permiten la proliferación de estas especies en el país (Mites & Oña, 2018).

La distribución y riqueza de estas plantas en Ecuador se encuentra restringida debido a las actividades humanas que destruyen su hábitat, en especial la región andina donde debido a la

deforestación se pone en riesgo la permanencia de sus ecosistemas nativos, como es el caso de los bosques montanos, debido a la expansión agrícola y ganadera (Jadán et al., 2016).

1.4 Características botánicas de las orquídeas

Las orquídeas son perennes herbáceas, debido a su crecimiento lento y capacidad fotosintética reducida, algunas especies tienen un periodo vegetativo prolongado, tienen simetría bilateral (zigomorfas), algunas resupinan, un pétalo el cual está muy modificado, estambres y carpelos fusionados y con semillas extremadamente pequeñas (De, L.C., 2020).

1.4.1 Raíces

Estructuras vegetativas carnosas, simples o ramificadas, surgen del tallo y su función es la de almacenar y absorber nutrientes y agua, en especies epífitas y litófitas fijan a la planta al árbol hospedero o sustrato, presentan un tejido especializado llamado velamen que es de color blanco, estas raíces están en contacto y/o albergan a las micorrizas que se asocian a las orquídeas (Esqueviel et al., 2021).

1.4.2 Pseudobulbos

En algunas especies de orquídeas, uno o más entrenudos de los tallos se espesan para formar pseudobulbos, los cuales pueden almacenar nutrientes y agua en períodos secos (Zhang et al., 2018).

1.4.3 Tallo

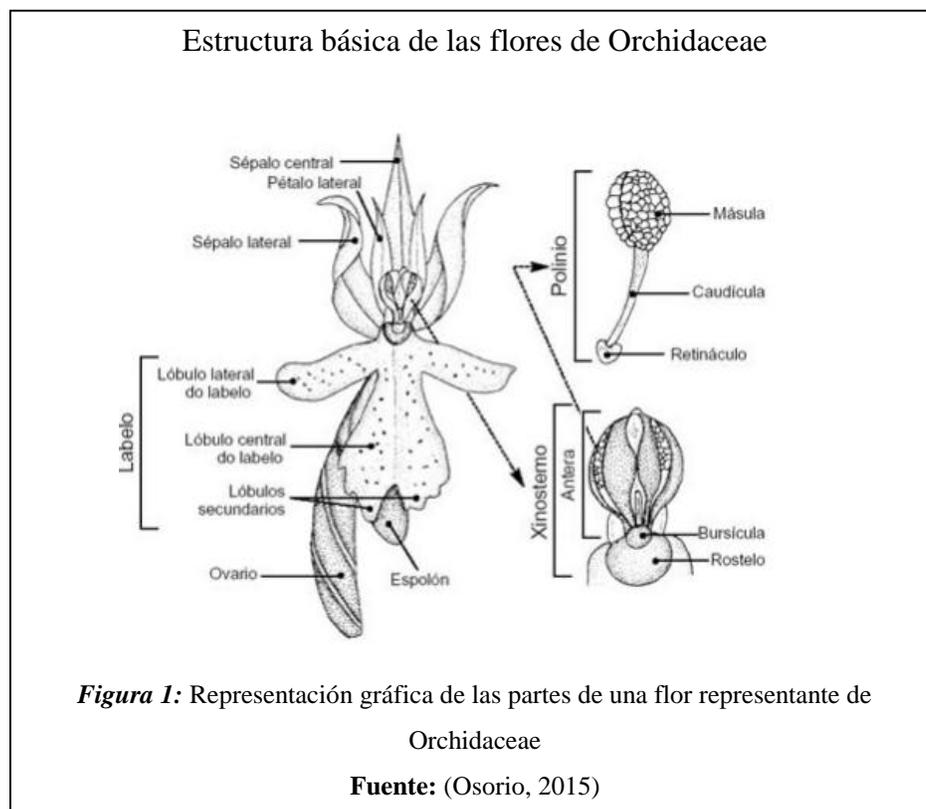
Dependiendo de su hábito de crecimiento, se dividen en orquídeas monopodiales y simpodiales, el tallo de las orquídeas monopodiales nace de un solo brote, se alarga y produce sus hojas desde el ápice cada año, en las orquídeas simpodiales, estas producen una serie de brotes adyacentes que crecen hasta un tamaño específico, florecen y luego dejan de crecer para posteriormente ser reemplazadas (De, L.C., 2020).

1.4.4 Hojas

Muestran hojas con venación paralela o venación reticulada, con bordes enteros, por lo general se observan tres tipos de hojas: plegada, conduplicada y cilíndrica o terete (Ministerio del Ambiente, 2017).

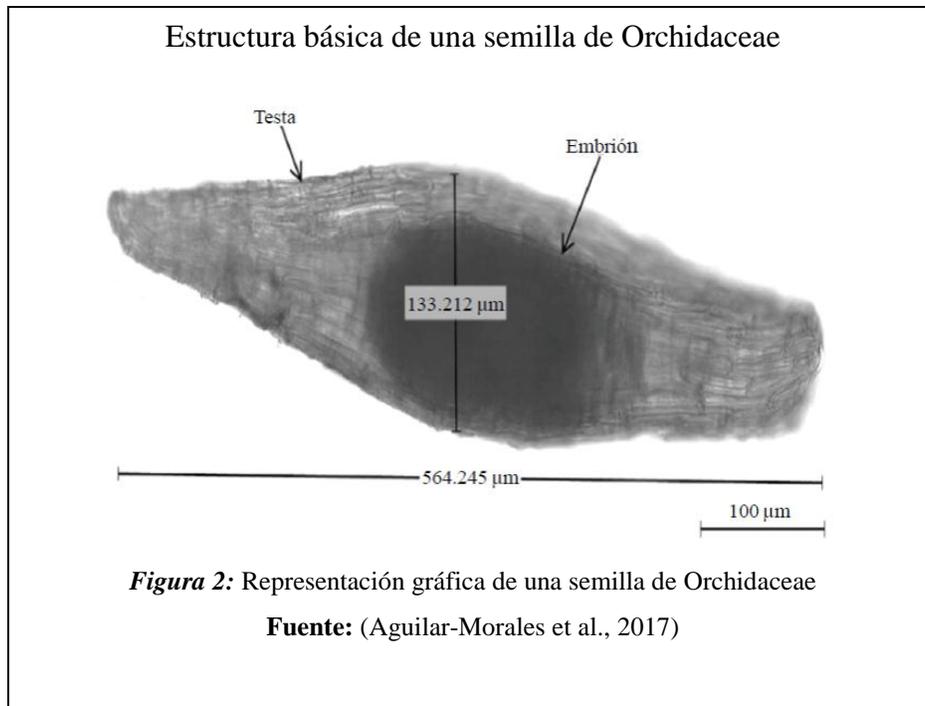
1.4.5 Flores

Sus flores tienen 3 sépalos y 3 pétalos, con simetría bilateral (zigomorfas), los sépalos en algunas especies presentan coloración, el pétalo central es el labelo, que presenta mayor protagonismo en el proceso de atracción a los polinizadores, el polen se produce en la columna y se encuentra empaquetado en entre 4 y 8 paquetes en masas que se denominan polinios, el labelo llega a presentar formas y estructuras variadas que son clave al momento de identificar a las especies, las flores son hermafroditas y son las estructuras reproductoras que en su conjunto reciben el nombre de ginostemo, el ovario tricarpelar se dispone por debajo de los pétalos y sépalos (ovario ínfero), como se observa en la Figura 1, (Moya & París, 2018).



1.4.6 Frutos y semillas

Los frutos de las orquídeas se encuentran en cápsulas que se encuentran recorridas longitudinalmente por tres nervios de tamaño prominente y tres pequeños que corresponden a los del ovario, cuando el fruto madura se abre (dehiscente), a través de hendiduras longitudinales que se encuentran en los laterales de estos engrosamientos (Ayuso, 2017). El fruto de las orquídeas se compone de al menos dos carpelos que contienen miles o millones de semillas diminutas de 0,05 mm a 0,06 mm de longitud con un peso de 0,31 μg a 24 μg , no cuentan con endospermo, estas características hacen que la gran mayoría de semillas de orquídeas sean disipadas por el viento (Banda-Sánchez et al., 2017).



1.5 Taxonomía

La clasificación taxonómica de la familia *Orchidaceae* de acuerdo a Chase et al. (2016) es de la siguiente forma:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Monocotyledoneae

Orden: *Asparagales*

Familia: *Orchidaceae*

Subfamilias: *Apostasioideae*, *Cipripedioideae*, *Orchidoideae*, *Spiranθοideae* y *Epidendroideae*.

La familia *Orchidaceae* cuenta con aproximadamente 26 985 especies, distribuidas en alrededor de 800 géneros (Angiosperm Phylogenetic Group, 2022).

1.6 Género *Caucaea*:

1.6.1 Distribución Geográfica

Las especies del género *Caucaea*, generalmente se encuentran creciendo como epífitas en bosques montanos fríos y húmedos o bosques nubosos andinos montanos altos, con mayor frecuencia arriba 2500 m s.n.m, el género se distribuye a través del Noroccidente de América del Sur, por lo general en Colombia, Ecuador y Venezuela (Szlachetko & Kolanowska, 2015). Comprende 23 especies descritas y de estas: 9 son aceptadas y tres son endémicas (Fernandez et al., 2018).

1.6.2 Descripción del género

Actualmente al género *Caucaea* se las identifica por pseudobulbos ovoides a cilíndrico ovoides revestidos basalmente con 1–3 brácteas y 2 hojas conduplicadas en su parte superior, inflorescencias con 1 hasta muchas flores, brácteas florales más cortas que los pedicelos y los ovarios, los sépalos laterales se encuentran parcial o completamente fusionados, el sépalo dorsal como los pétalos están libres, el labelo es panduriforme o profundamente trilobulado, con un callo basal que consiste más a menudo de 2-3 crestas, el ginostemo está ligeramente arqueado y bastante robusto, con la parte de la columna 2-3 veces más largo como la antera, alado y agrandado en la base, la antera subapical es titular, operculada o elipsoide, se producen dos polinias ligeramente comprimidas dorsiventralmente, el estigma es transversalmente elíptico y profundamente cóncavo (Szlachetko & Kolanowska, 2015).

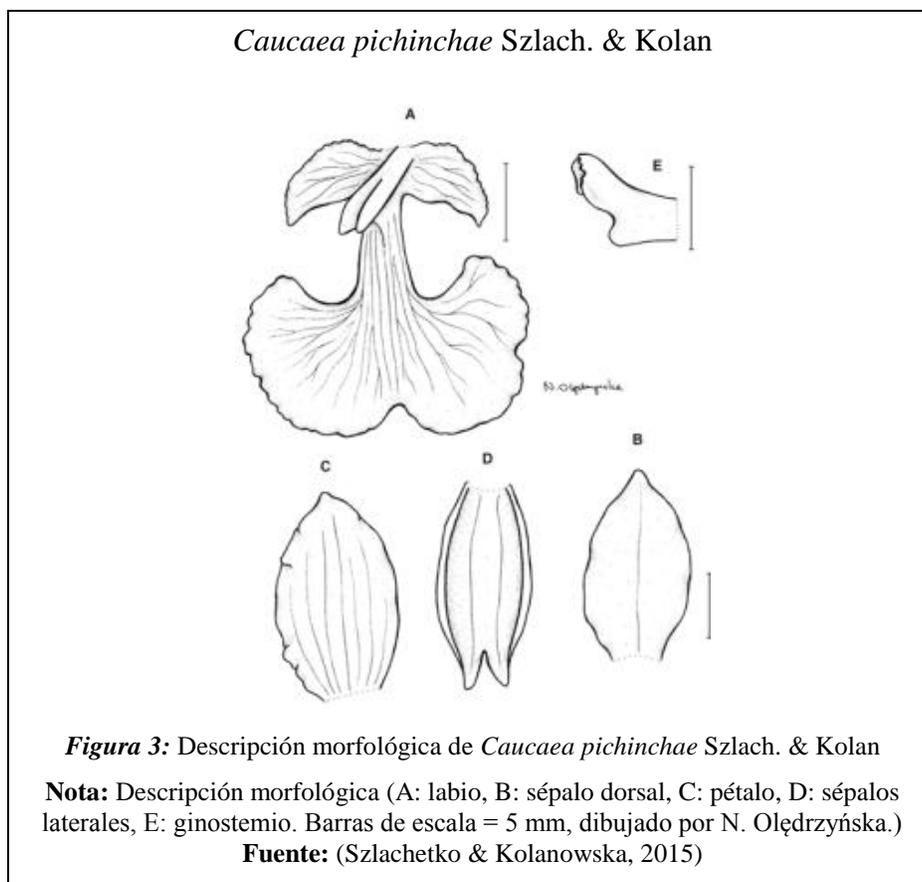
1.6.3 Especie a estudiar: *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan

Según la información obtenida por Szlachetko & Kolanowska (2015), la especie al ser nueva no ha sido totalmente evaluada, existen registros de colección en dos localidades las faldas del volcán el corazón y en Tabacundo la quebrada Chimburlo debido a que el ambiente circundante

está muy alterado. Para Dodson (2003) el acceso para este género resulta prácticamente imposible debido a que actualmente las locaciones propias del género se encuentran en constante amenaza por la deforestación de su hábitat, todo esto ha limitado su estudio, lo que hace que exista poca información para comprender a este grupo. Otero (2018), indica que es necesario realizar más investigaciones ya que hay mucho por descubrir acerca de este género.

1.6.4 Descripción morfológica *Caucaea pichincae* Orchidaceae

Presenta una similitud con *C. cucullata* (Lindl.) N. H. Williams & M. W. Chase, sus principales diferencias son: sépalo dorsal ovado-elíptico, obtuso y callo glabro en forma de dos crestas paralelas, la especie consta de las siguientes partes: pseudobulbo de 7 cm de largo por 1.8 de ancho, cilíndrico-ovoide, comprimido bilateralmente y bifoliado, sus hojas son lineales y lanceoladas de hasta 42 cm de largo por 2.7 cm de ancho; inflorescencias llegan hasta los 100 cm de largo, racimosas, ramificadas de color rosa y manchas moradas; una bráctea floral de 3 mm de largo, aguda y ovada-triangular, con un pedicelo y ovario de 27 mm de largo; su sépalo dorsal es nervado ovado-elíptico de 15 mm por 6.5 mm de ancho; sus pétalos miden 15 mm de largo por 8 mm de ancho, gruesos, elípticos y de forma obtusa, ligeramente oblicuos con sus márgenes levemente ondulados y con 7 nervaduras; sus sépalos laterales miden 15 mm de largo por 7.5 mm de ancho, se encuentran juntos, connados; el labio mide 20 mm de largo por 17 mm de ancho; con lóbulos laterales de 3.5 mm de ancho de márgenes crenados; un ápice subagudo, istmo prominente con 7 mm de largo y estrecho; el lóbulo medio mide 12 mm de largo y en la base cordado, flabelado, poco bifido, con márgenes ondulados; el callo está formado por dos crestas paralelas en forma de quilla extendidas hasta cerca de 1/3 de la longitud del labio; y el ginostemio mide 7 mm de largo, apicalmente se encuentra doblado hacia atrás y el clinandrio poco dentado, como se observa en la Figura 2, (Szlachetko & Kolanowska, 2015).



1.7 Identificación, almacenamiento y conservación de semillas de Orchidaceae

1.7.1 Generalidades

Las semillas pueden ser colectadas a partir de cápsulas verdes o maduras, preferiblemente se deben coleccionar cápsulas que han estado expuestas al sol, cuando las semillas estén secas, se las puede almacenar durante muchos meses en frascos cerrados dentro de un refrigerador a 4 o 5 °C, el tiempo desde el florecimiento hasta la maduración de las semillas varía de manera significativa de acuerdo a la especie y el lugar, las semillas de las orquídeas varían de forma (filiforme, fusiforme y elipsoidal), y sus dimensiones se encuentran desde 1 a 2 mm de largo y 0,5 a 1 mm de ancho, sus frutos contienen hasta 4000000 de semillas por cápsula dependiendo de la especie de orquídea (Banda-Sánchez et al., 2017). El establecimiento de estrategias para la conservación de especies en un país megadiverso como el Ecuador, es una tarea imprescindible, para esto el

país mantiene una lista de especies en peligro de extinción debido a que es un país botánicamente bien explorado (Cerna et al., 2014).

1.7.2 Evaluación de la viabilidad de semillas

Es necesario brindar información acerca de la viabilidad de las semillas para su conservación *ex situ* e *in situ*, por lo general las pruebas de viabilidad de las semillas dan a conocer si una semilla está viva y si cuenta con enzimas cuya función es catalizar reacciones metabólicas necesarias para la germinación y crecimiento de las plántulas, de esta manera las pruebas evalúan la viabilidad del tejido y de la semilla completa (Pradhan et al., 2022). Para evaluar la viabilidad se puede aplicar el método del Tetrazolio, una prueba que permite conocer aspectos fundamentales de un lote e identificar la confiabilidad de las semillas al momento de su siembra o almacenamiento, esta es una prueba eficaz y fácil de usar, obtiene de forma rápida la viabilidad de las semillas mediante una coloración roja generada por la reducción del tetrazolio a formazán en el proceso de respiración causada por la actividad deshidrogenasa (Duarte et al., 2017). Este color rojizo muestra la actividad respiratoria en la mitocondria y consecuentemente la viabilidad del tejido, los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución y conservan su color natural (Soares et al., 2021).

1.7.3 Conservación de semillas

Dependiendo del método de conservación, la vía más adecuada para la preservación de las especies es la conservación *in situ* en su ambiente natural, pero en casos donde el deterioro de su hábitat es alto las poblaciones de alguna especie se ha reducido drásticamente y se encuentra cerca de la extinción, los métodos de conservación *ex situ*, pueden ser una alternativa considerable, estos son diversos en cuanto a su forma y efectividad, siendo necesario emplear los que logren conservar la mayor cantidad genética posible, los bancos de germoplasma tienen

diversas modalidades y se simplifican en: a) preservación de semillas a baja humedad y temperatura, b) conservación de plantas en viveros o invernaderos y c) la preservación de células, tejidos y órganos bajo cultivo *in vitro* y en nitrógeno líquido (Ortega-Larrocea et al., 2007).

1.8 Cultivo *in vitro*

El uso del cultivo *in vitro* ha sido empleado ampliamente para la conservación de recursos fitogenéticos, además se considera importante a la germinación *in vitro* para la producción comercial de muchas especies de orquídeas, por esto su implementación es una alternativa para la propagación de especies en problemas, siendo importante para la conservación y comercialización de diversas especies (López & Rangel-Villafranco, 2018). Para conseguir que una conservación sea eficaz se pueden controlar temperatura, oxígeno, la humedad y el estado de las semillas para que tengan condiciones aptas de viabilidad y capacidad de sobrevivencia, se pueden emplear en tubos de ensayo, plásticos o fundas ziploc para conservar la calidad de las semillas (Magrini et al., 2019).

El cultivo *in vitro* de plantas significa cultivar plantas al interior de un frasco y presenta dos características fundamentales como son asepsia y condiciones controladas (Sharry, 2020). La técnica de micropropagación se emplea con mucho éxito ya que además del tamaño reducido de las plántulas minimiza los requerimientos de espacio y costos de mantenimiento en los bancos de germoplasma (Pedraza-Santos, 2017).

1.8.1 Desarrollo de protocormos

Posterior a la siembra de las semillas se observa una hidratación y aumento de tamaño de las semillas, así como la ruptura de la testa seminal que dio lugar a la formación de estructuras esféricas, una estructura tuberizada o masas de células indiferenciadas producidas por el aumento de volumen, se observan cambios en la coloración, pasando por diferentes tonalidades,

comenzando por el blanco-amarillento, amarillo, verde-amarillento y verde (Fochi et al., 2017). Esta estructura se encuentra envuelto en una epidermis la cual puede llegar a producir otros protocormos por gemación adventicia a partir de los tejidos superficiales, el protocormo puede seguir creciendo en semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie, hasta llegar a la edad adecuada para producir raíces y hojas, lo cual indica que tiene la función de actuar como órgano de almacenamiento de lo cual permitirá la aparición de los brotes foliares y radicales (Yeung, 2017).

1.8.2 Factores ambientales de los cultivos *in vitro*

La temperatura óptima para el crecimiento de las orquídeas se encuentra en $27^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$, la luz fluorescente que se utilizará con una duración en el día de 12 a 16 horas, aunque en ocasiones se empleará luz continua, se podrá emplear una baja irradiación para el aislamiento, el cual deberá ser intensificada cuando las plántulas se vayan desarrollando a partir de los protocormos (Tiza, 2010).

1.8.3 Fotoperiodo

Promueve el desarrollo vegetativo al aumentar el número de pseudobulbos, de brotes y sus hojas. Asimismo con relación a la floración, ayuda al incremento de número de escapos, inflorescencias y el diámetro del escapo floral (Hernández, 2017).

Es la respuesta de las plantas al tiempo de luz del día, una forma de modificar las condiciones de éste es mediante la interrupción de la noche, la cual interrumpe un período largo y oscuro para promover una iluminación fotoperiódica, resultando en una modificación de las condiciones de día largo para las plantas (Londoño-Lopera & Villanueva-Mejía, 2018).

1.8.4 Protocolo para cultivo *in vitro*

El desarrollo de protocolos de cultivo, permite elevar la proliferación y minimizar los tiempos de

propagación de las plantas que se da en forma natural, iniciando con explantes como son: semillas, yemas, fragmentos de hoja o tallo para colaborar con la conservación de la biodiversidad y también salvaguardar bancos de germoplasma importantes, la creación de estos protocolos para la reproducción de orquídeas *in vitro*, ha logrado estandarizar los procedimientos y medios empleados y así conservar varias especies (Gómez et al., 2010).

1.8.5 Protocolo de desinfección y siembra *in vitro* del explante

La contaminación fúngica del medio de cultivo es un problema al emplear las técnicas de cultivo *in vitro*, por esto es necesario implementar una etapa de desinfección de las semillas antes de su siembra (Márquez-Bravo, 2000).

Para el protocolo de desinfección se emplea el uso de un cepillo de dientes, solución jabonosa, agua estéril, hipoclorito de sodio al 3%, alcohol al 90%; para la siembra se corta de forma longitudinal la cápsula, se utiliza un bisturí desinfectado y pinzas dando golpes suaves para dejar caer las semillas (McKendrick, 2000).

Las semillas expuestas en el caso de las orquídeas, deben ser tratadas con un desinfectante, se dispone de papel filtro o frasco pequeño, solución de hipoclorito de calcio o de sodio con cinco a diez veces su volumen y también con una o dos gotas de un agente humectante, agua estéril, haza de alambre o con una espátula se realiza la siembra (Billard et al., 2014).

1.9 Germinación *in vitro* de semillas de Orchidaceae

Las semillas de las orquídeas debido a su diminuto tamaño son denominadas “semillas de polvo”, a pesar de esto presentan un sin número de variedades en cuanto a su forma, color, peso y testa, en general los embriones de las orquídeas son pequeños y algunas veces consisten en unas pocas células y en su mayoría sin endospermo (Utami & Hariyanto, 2020). Además, no todas las semillas de una cápsula son fértiles o se desarrollan completamente, lo que hace que sea difícil su

reproducción natural ya que por lo general únicamente germina el 1% de las semillas producidas por estas, sumado a esto requieren la simbiosis con hongos micorrícicos y condiciones ambientales favorables (Pedraza-Santos, 2017).

La germinación de diversas especies de orquídeas ha sido posible gracias a las técnicas de germinación *in vitro*, la germinación asimbiótica es un sistema ideal para estudiar el crecimiento y desarrollo de las semillas de orquídeas (Vudala & Ribas, 2017).

El proceso de germinación de las orquídeas consta de cuatro etapas, la Etapa 0 son semillas sin germinar, la Etapa 1 ocurre el crecimiento del embrión (protocormo) y se da la ruptura de la testa, Etapa 2, se da el desarrollo del protocormo y la aparición de rizoides, Etapa 3, crecimiento del protocormo y se desarrolla una yema apical, terminada esta etapa se da la aparición de las hojas y el desarrollo de las raíces las cuales permiten el establecimiento de las plántulas (Crispa et al., 2007).

1.10 Crecimiento *in vitro* de las semillas de Orchidaceae

Las semillas absorben agua a través de la testa, lo que genera un aumento en el volumen del embrión y posteriormente una división celular en la región anterior lo que provoca la ruptura de la testa, dando lugar a una estructura esférica denominada protocormo, seguido a esto se da la formación de rizoides alrededor de la parte inferior del protocormo, las hojas fotosintéticas se desarrollan a partir de un primordio foliar, luego en la parte basal del protocormo se desarrollan las raíces dando lugar a una planta completa (Rodríguez, 2013).

1.11 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un elemento del cultivo *in vitro* que funciona como sustrato y fuente de energía para el desarrollo de los tejidos (Oseni et al., 2018). Uno de los factores determinantes en el desarrollo de plántulas es la composición del medio de cultivo, en general se encuentran

básicamente conformados por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos y una fuente de carbono (Gonçalves et al., 2016).

1.11.1 Macronutrientes

Por lo general los macronutrientes necesarios para alcanzar un crecimiento estructural óptimo por parte de las células vegetales son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), su dosis va a variar dependiendo del medio de cultivo, las concentraciones de nitrógeno en la mayoría de los medios nutritivos son elevadas, pero en algunas especies su exceso genera desórdenes fisiológicos como la vitrificación de los tejidos (Perea, 2009).

1.11.2 Micronutrientes

Los micronutrientes esenciales para las plantas son: zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y níquel (Ni), de estos el hierro es el más necesario (Shukla et al., 2018). Este es fundamental para el crecimiento de las plantas y la producción de clorofila e indispensable para algunas actividades fisiológicas, como la síntesis de clorofila, las reacciones bioquímicas, la fotosíntesis, la respiración y la actividad enzimática (Al-Mayahi, 2021).

1.11.3 Vitaminas

Las plantas en su estado natural satisfacen sus necesidades vitamínicas, pero en el caso de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* necesitan de suplementos externos de estos componentes para lograr sus procesos de crecimiento y desarrollo, las vitaminas más comunes son las siguientes: Tiamina (Vitamina B₁), es un cofactor que actúa en el ciclo de Krebs y se encuentra en la mayoría de medios de cultivo; Acido nicotínico (Niacina o Vitamina B₃), es un componente de las enzimas involucradas en las reacciones activadas por la luz; Mio-inositol, es un constituyente del complejo B y es un componente regular de la mayoría de medios de cultivo; Acido ascórbico

(Vitamina C), se usa como antioxidante en cultivos de especies que generan grandes cantidades de fenoles *in vitro* (Suárez, 2020).

1.11.4 Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas u hormonas vegetales actúan como mensajeros químicos al intervenir en la regulación de procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas, dependiendo de su concentración pueden inhibir o estimular su desarrollo, el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento depende del objetivo del cultivo celular (Aucapiña & López, 2016). Las principales fitohormonas empleadas en el crecimiento vegetal son auxinas, giberelinas, citoquinas, entre otras (Alcantara et al., 2019).

1.11.4.1 Auxinas

Forman parte de todos los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, como la organogénesis, embriogénesis, patrón de tejidos y el tropismo, el ácido indol-3-acético (IAA) es su forma natural más abundante, la cual se encuentra ampliamente distribuida en plantas, le sigue el ácido indol-3-butírico (IBA), estudios han demostrado que IAA tiene control sobre la arquitectura del sistema de raíces y algunas etapas del desarrollo de raíces, en cambio IBA fomenta el desarrollo de raíces adventicias (Kondhare et al., 2021).

1.11.4.2 Giberelinas

Son diterpenoides que por lo general se sintetizan en el mismo sitio de acción, en su síntesis intervienen los plastidios, retículo endoplasmático y el citosol, todos los tipos de giberelinas se sintetizan en la ruta del ácido mevalónico, esta hormona se encuentra relacionada con la germinación de semillas, elongación del tallo, maduración del polen, expansión de las hojas y el desarrollo de flores, frutos y semillas (Ricardo et al., 2020).

1.11.4.3 Citoquinas

Actúan en la interrupción de la dominancia apical, desarrollo de yemas axilares, retardo de la senescencia de las hojas y división celular, se sintetizan en los ápices radicales y son transportadas a las yemas apicales y axilares (Suárez, 2020).

1.11.5 Materiales de soporte

Los materiales de soporte determinan la consistencia de los medios de cultivo y pueden ser líquidos que generalmente se encuentran conformados por la formulación del medio disuelta en agua sin adicionar ningún medio de soporte, o medio semisólido que adquieren cierta dureza generada por agentes gelatinizantes, en medios semisólidos por lo general se emplea agar (0,6% a 1,0%), es necesario considerar la pureza del agar, ya que frecuentemente puede contener impurezas de naturaleza variada (Suárez, 2020).

1.12 Medios de Cultivo para orquídeas

Los medios de cultivo más comunes para la germinación de orquídeas son: Knudson C y Vacin y Went, se puede adicionar fitohormonas al medio de cultivo para estimular la germinación como las giberelinas, estas estimulan el crecimiento del embrión y la germinación de las semillas, mediante la producción de hidrolasas que provocan la ruptura de la estructura de alrededor al embrión, uno de los métodos de suministro de las giberelinas se encuentra la aplicación de estas en el proceso de inhibición, durante el cual la semilla deshidratada absorbe agua para estimular el desarrollo del embrión (Quintero et al., 2018). Además después de la germinación los protocormos de las orquídeas pueden ser subcultivados en un medio de cultivo suplementado con un regulador de crecimiento vegetal (PGR) con auxinas y citoquininas para la multiplicación de protocormos o en un medio de cultivo sin PGR (Franceschi et al., 2019).

En esta investigación se emplearon tres medios de cultivo (Medio Knudson, Medio Vacin y Went y Medio Lindemann), los cuales han sido ampliamente utilizados para procesos de cultivo *in vitro* de orquídeas, según Aguirre-Bolaños et al.(2017), la composición de estos medios de cultivo (macro y micronutrientes), cumplen con los requerimientos nutritivos necesarios para el proceso de germinación, sin embargo, difieren en cuanto a la cantidad (mg) de sus componentes (Anexos 1,2,3), lo que sirve para hacer las respectivas comparaciones acerca de qué medio de cultivo es el adecuado para obtener un mayor número de protocormos de *Caucaea pichincha*.

Los medios de cultivo Lendeman y Knudson C, mantienen la menor cantidad de fosfato la cual es una fuente de fósforo, a diferencia del medio Vacin and Went, además Chelate (2014) indica la existencia de una baja capacidad amortiguadora del pH en el medio Knudson C, el cual afecta la calidad del material vegetal. Sin embargo, estudios demuestran que se deben determinar medios adecuados para cada especie (Stancato et al., 2008).

1.13 Cámara de flujo laminar

La cámara de flujo laminar brinda condiciones de asepsia, ya que disminuye el número de agentes contaminantes, este es un equipo dotado de una turbina la cual toma el aire del exterior y lo impulsa a través de un filtro de alfa eficiencia, para luego expulsarlo hacia el interior de la cámara, el filtro que permite el paso del aire, retiene partículas que normalmente se encuentran en suspensión y que pueden convertirse en contaminantes potenciales deteriorando la calidad de los cultivos (Suárez, 2020).

1.14 Manejo *in vitro* de las plántulas a nivel de cámara de crecimiento

Este tipo de cámaras permiten simular las condiciones ambientales variables de temperatura y humedad, de acuerdo a los entornos de investigación que se pretenden estudiar, luego de aproximadamente un año después de la siembra, es posible que las plantas jóvenes sean trasladadas

a macetas o recipientes adecuados para su tamaño (Llorente, 2002). El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas, los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz (Tiza, 2010). La luz es un factor determinante en el desarrollo de algunas plantas con semillas pequeñas, debido a que promueve la división celular (Villacréz, 2022), además tanto el desarrollo como el crecimiento de las especies vegetales se encuentran bajo el control de la luz a causa de dos procesos: la fotosíntesis aunque en los medios de cultivo *in vitro* es considerablemente baja ya que la mayoría de los medios son nutridos con sacarosa y la fotomorfogénesis en la que la luz promueve el desarrollo y la forma de las estructuras vegetales (Pardo, 2020).

II. Metodología

2.1 Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) iniciando el 25 de abril del 2022 y finalizando el día 17 de junio del 2022.

2.2 Recolección material vegetal

Se colectaron 8 cápsulas de la especie *Caucaea pichincha* orchidaceae, el materia vegetal se obtuvo en marzo del 2022 en las faldas del volcán el Corazón del cantón Mejía en el bosque protector Umbría (anexo 4), siguiendo la técnica descrita por Valencia (2018), para lo cual se usó una tijera de podar con la que se colectó un ejemplar completo fértil y diez cápsulas maduras, según Banda-Sánchez et al. (2017), el número de semillas puede variar de 13 000 a 4 000000 por cápsula y el rango de tamaño de una semilla de orquídea varía alrededor de 0,7 mm de largo por 0,3 mm de ancho, luego con cinta masking y marcador indeleble se etiquetó cada individuo, a los que se les asignó el código 4434 del libro de campo de Marco Cerna, las muestras fueron prensadas, etiquetadas en el sitio con papel periódico, luego se deshidrataron y procesaron en el herbario de la UPS. Para las cápsulas se modificó la técnica de Cruz et al. (2017), y fueron colectadas en sobres de papel Kraft con su respectivo código de libro de campo 4434, se almacenaron en fundas ziploc, posteriormente se las trasladó al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UPS.

2.3 Viabilidad en semillas

Se adaptó la técnica descrita por Cerna et al. (2014), para el caso se pesaron 10 mg de semillas del código 4434 en microtubos de 2mL se añadió 1,5 mL de agua destilada durante 24 horas a temperatura ambiente. Posterior a eso se eliminó el agua destilada con una pipeta Pasteur y se añadió 1,5 mL de solución de sacarosa al 10 %, durante 24 horas a temperatura ambiente,

después se retiró la solución de sacarosa y se añadió la solución de tetrazolio 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) (anexo 5).

2.4 Preparación medios de cultivo y giberelinas

En esta investigación se emplearon tres medios de cultivo (Medio Knudson, Medio Vacin y Went y Medio Lindeman), los cuales han sido ampliamente utilizados para procesos de cultivo in vitro de orquídeas, por ejemplo el medio Vacin y Went su composición es una mezcla de nutrientes de sales inorgánicas, vitaminas, carbohidratos y agentes gelificantes (HiMedia, 2017), en el caso del medio Knudson contiene carbón vegetal el sacarosa, polvo de plátano, agente gelificante etc. (Knudson, 2007). Por otro lado, el medio Lindeman comparte alguno de los componentes anteriormente mencionados los cuales se pueden observar en (anexos 1,2,3). según Aguirre-Bolaños et al. (2017), la composición de estos medios de cultivo (macro y micronutrientes), cumplen con los requerimientos nutritivos necesarios para el proceso de germinación, sin embargo, difieren en cuanto a la cantidad (mg) de sus componentes (Anexos 1,2,3), lo que sirve para hacer las respectivas comparaciones acerca de qué medio de cultivo es el adecuado para obtener un mayor número de protocormos de *Caucaea pichincha*.

Para la elaboración de los medios de cultivo se siguió la metodología descrita por Garcia (2011) con modificaciones. Se trabajó con el medio Knudson C plus modificado (Medio1), el cual se pesó en una balanza analítica 47.46 g; el medio medio Vacin and Went modificado (Medio2) en el cual se pesó 17.20 g y por último se preparó el medio basal Lindeman (Medio3) pesando 13.5 g suplementado con 22.2 g de Agar Agar (anexo 6), a estos medios se los llevó a un vaso de precipitación con 600 mL de agua destilada por cada medio en donde se los calentó sobre una

plancha agitadora durante 20 minutos alcanzando el punto de ebullición, a continuación se los ajustó a un pH de 5.8 con gotas de NaOH y se vertió 5mL a cada tubo de ensayo, a continuación se selló con papel aluminio como tapa, y se trasladó al autoclave durante 25 minutos, a una temperatura de vapor aproximada de 121 °C y 15 PSI posteriormente se los llevó a un refrigerador donde se colocaron de forma inclinada con un ángulo de 60 grados para su solidificación y ampliar la superficie de contacto de siembra.

En cuanto a las giberelinas (GA3), se modificó la técnica descrita por Aucapiña & López (2016), a partir de una solución madre de 1 ppm se prepararon 3 concentraciones de 0,05; 0,1 y 0,2, posteriormente se colocaron dos gotas de cada concentración de hormonas en los tubos de ensayo a los 30 días a partir de la siembra.

2.5 Desinfección de semillas

Se tomó como guía el método descrito por PhytoTechnology Laboratories (2003), realizando modificaciones, donde dentro de la cámara de flujo laminar horizontal se tomó una jeringa de 10 mL que contenía un trozo de algodón en la punta como tampón (anexo 7), con el fin de retener a las semillas que entran en contacto con las soluciones, se absorbieron 4 mL de semillas que entraron en suspensión con hipoclorito al 3 % suplementado con dos gotas de tween 20 por 3 minutos en agitación, luego se expulsó la solución y se lavó tres veces con agua destilada estéril.

Posterior a eso se inoculó sobre los medios de cultivo una gota por tubo de ensayo y se los dispersó de tal forma que cubran bien la superficie del medio, inmediatamente cada tubo de ensayo fue tapado y cubierto con rolo pack, los tubos inoculados fueron llevados a dos cámaras de crecimiento.

2.6 Cámaras de crecimiento

Se tomó como guía el trabajo de investigación de Hernández (2017), se trabajó con dos cámaras una abierta de 16 horas luz, 8 horas de obscuridad con una temperatura de 27 °C, y una cámara cerrada de 14 horas luz, 10 horas de obscuridad con una temperatura de 24 °C, donde se evaluó el número de protocormos a los 45 días (anexo 8).

2.7 Análisis estadístico

2.7.1 Diseño experimental

Los datos se analizaron mediante una ANOVA con un nivel de significancia de α : 0.05. Se aplicó un diseño completamente al azar en función a los factores planteados (Tabla 1), con análisis factorial 4x2x3 y pruebas de diferenciación de medias de Duncan al 5 %.

Tabla 1.

Tratamientos en función a los siguientes factores planteados, concentraciones de giberelinas, medios de cultivos, cámara de crecimiento abierta y cerrado se diseñaron los siguientes tratamientos.

Tratamiento	Cámara	Medio	Giberelina (GA3)
T1	CC	Medio 1	0,05
T2	CC	Medio 1	0,1
T3	CC	Medio 1	0,2
T4	CC	Medio 1	0
T5	CC	Medio 2	0,05
T6	CC	Medio 2	0,1
T7	CC	Medio 2	0,2
T8	CC	Medio 2	0
T9	CC	Medio 3	0,05
T10	CC	Medio 3	0,1
T11	CC	Medio 3	0,2
T12	CC	Medio 3	0
T13	CA	Medio 1	0,05
T14	CA	Medio 1	0,1
T15	CA	Medio 1	0,2
T16	CA	Medio 1	0
T17	CA	Medio 2	0,05
T18	CA	Medio 2	0,1
T19	CA	Medio 2	0,2
T20	CA	Medio 2	0
T21	CA	Medio 3	0,05
T22	CA	Medio 3	0,1
T23	CA	Medio 3	0,2
T24	CA	Medio 3	0

Nota. CC: Cámara cerrada; CA: Cámara abierta; Medio1: Knudson Plus; Medio2: Vacin and Went; Medio3:

Lindeman.

Fuente: Las autoras, (2022)

2.7.2 Factores de estudio

a) Medios de cultivo

Se evaluó tres medios de cultivo el Medio1(Knudson modificado), Medio2 (Vacin and Went) y Medio3 (Lindeman).

b) Concentración giberelinas

Se evaluó tres concentraciones de giberelinas (GA3) a (0,05; 0,1; 0,2) mg/L.

c) Cámaras de crecimiento

Se evaluó dos cámaras de crecimiento, una cámara abierta con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad y la otra una cámara cerrada con un fotoperiodo de 14 horas luz, 10 horas de oscuridad.

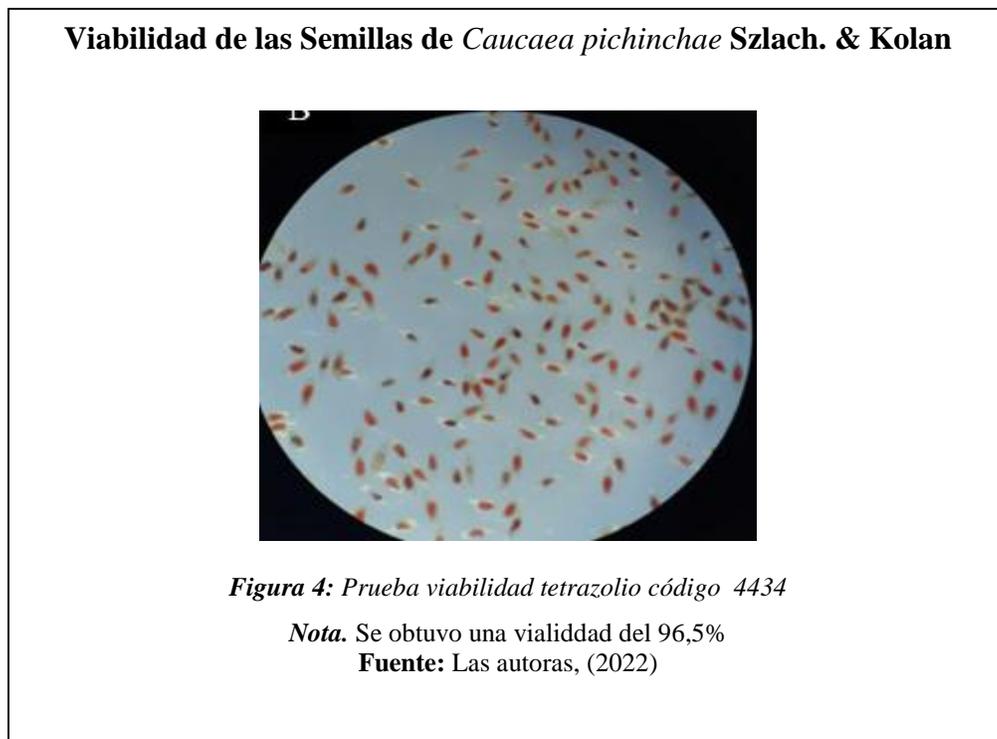
2.7.3 Variable evaluada

Se evaluó el porcentaje de protocormos desarrollados a los 45 días bajo la influencia de los tres factores en estudio anteriormente mencionados.

III. Resultados y Discusión

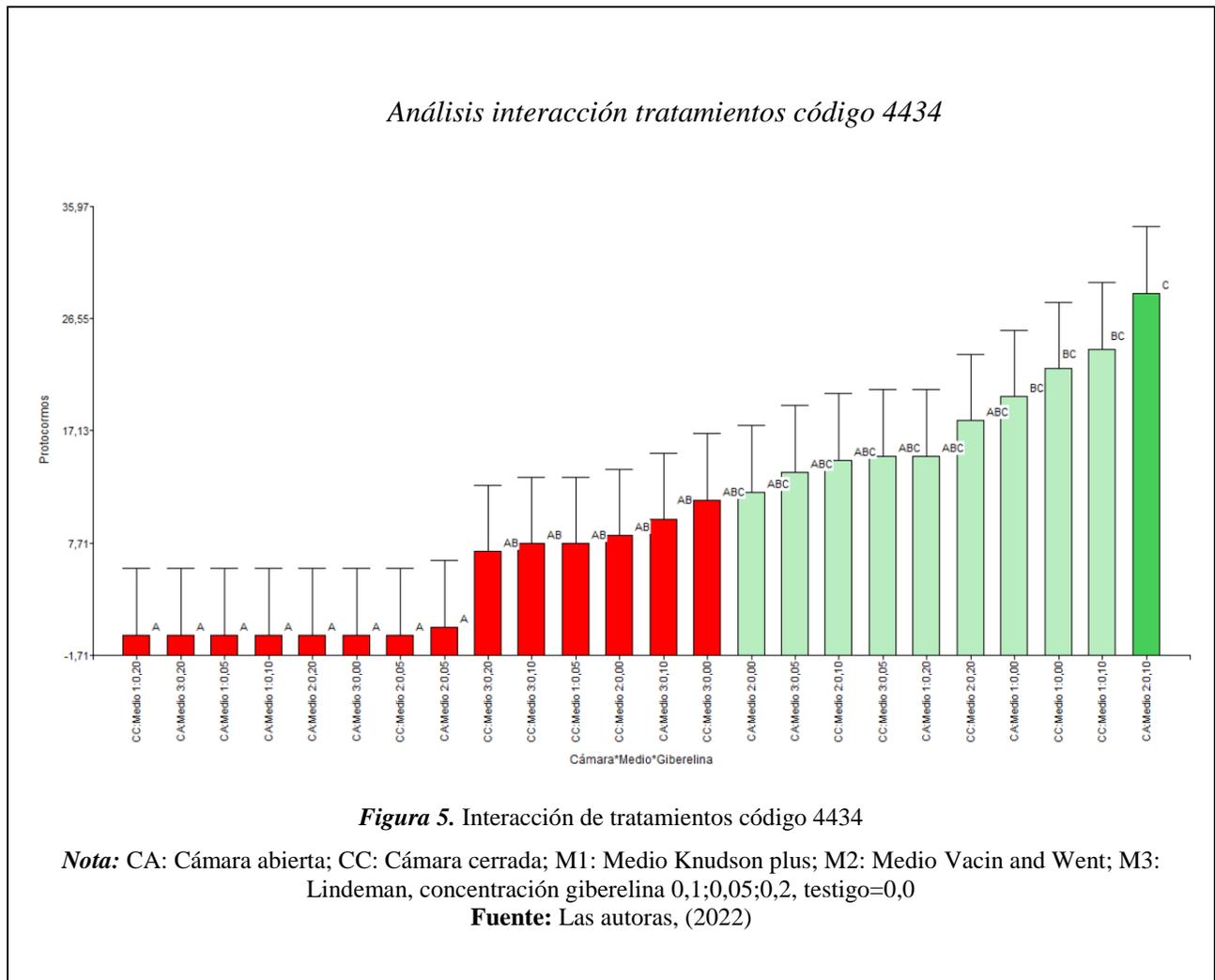
3.2 Viabilidad de semilla.

La prueba de tetrazolio (Figura 4) permitió conocer la viabilidad de las semillas de la especie *Caucaea pichincha*, de un total de 173 semillas, el 96,5% se tornaron de un color rojizo, mediante este resultado podemos evidenciar que la viabilidad es alta ya que a niveles sobre el 90 % se les considera adecuado de acuerdo a los estudios planteados de viabilidad de diferentes



especies de orquídeas (Salazar & Gélvez, 2015).

3.3 Evaluación de los medios de cultivo para el desarrollo de protocormos de la especie *Caucaea pichincae*.



En función del análisis estadístico se observa que existe un grupo de tratamientos que comparte características similares al estar dentro del grupo C (Figura 5), sin embargo, se puede resaltar como la mejor interacción al tratamiento (CA; cámara abierta; Medio 2: Vacin and Went; y concentración de giberelinas al 0,10 mg/L) con mayores diferencias significativas cuyo Fisher es de 2,45 y un p-valor de 0,0044. Los resultados obtenidos con el medio de cultivo Vacin and Went (VW) que fueron de 14,09%, tiene similitud con los estudios realizados por Lakshmanan et al.(1995), donde detalla que obtuvo una cantidad favorable de protocormos utilizando el medio

VW con un 13,6%, resultados superiores fueron obtenidos por Utami y Hariyanto (2019), quienes reportaron que al utilizar el medio VW en *P. amboinensis* se obtuvo el 51,4% de número protocormos, sus resultados reflejaron que el medio VW contiene una concentración más elevada de P (fósforo) que los otros medios, esto coincide con informes realizados por Sinha y Roy (2004); Pakum et al. (2016), los cuales resaltan una relación entre el desarrollo de protocormos con una alta concentración de P en el medio VW promoviendo el desarrollo de semillas en *Vanda teres* y *Bulbophyllum nipondhii*.

A la concentración de 0,10 mg/L Aucapiña y López (2016), obtuvieron resultados favorables para la germinación de semillas de orquídeas con un 96%. De la Cruz et al.(2017), en su investigación nos informa que las giberelinas cortan la interfase del ciclo celular al inducir a las células a sintetizar ácido desoxirribonucleico, Valencia (2018), indica que estas fitohormonas regulan la germinación induciendo la producción de enzimas hidrolasas y logran romper la testa.

Por otro lado el mejor fotoperiodo resulto ser el de cámara abierta con ciclo de de 16 horas luz, 8 horas de obscuridad a una temperatura de 27 °C, Dutra et al. (2008), y Cazarez-Favela et al. (2016), reportaron resultados similares con el desarrollo de protocormos empleando un fotoperiodo de 16 horas de luz con 8 de obscuridad con el medio VW. Pardo (2014), menciona que las cámaras de crecimiento intervienen en los procesos fisiológicos evitando a su vez la dormancia y proveen en algunas especies un manejo del ciclo reproductivo y vegetativo.

Diferentes medios de cultivo empleados en el desarrollo de protocormos

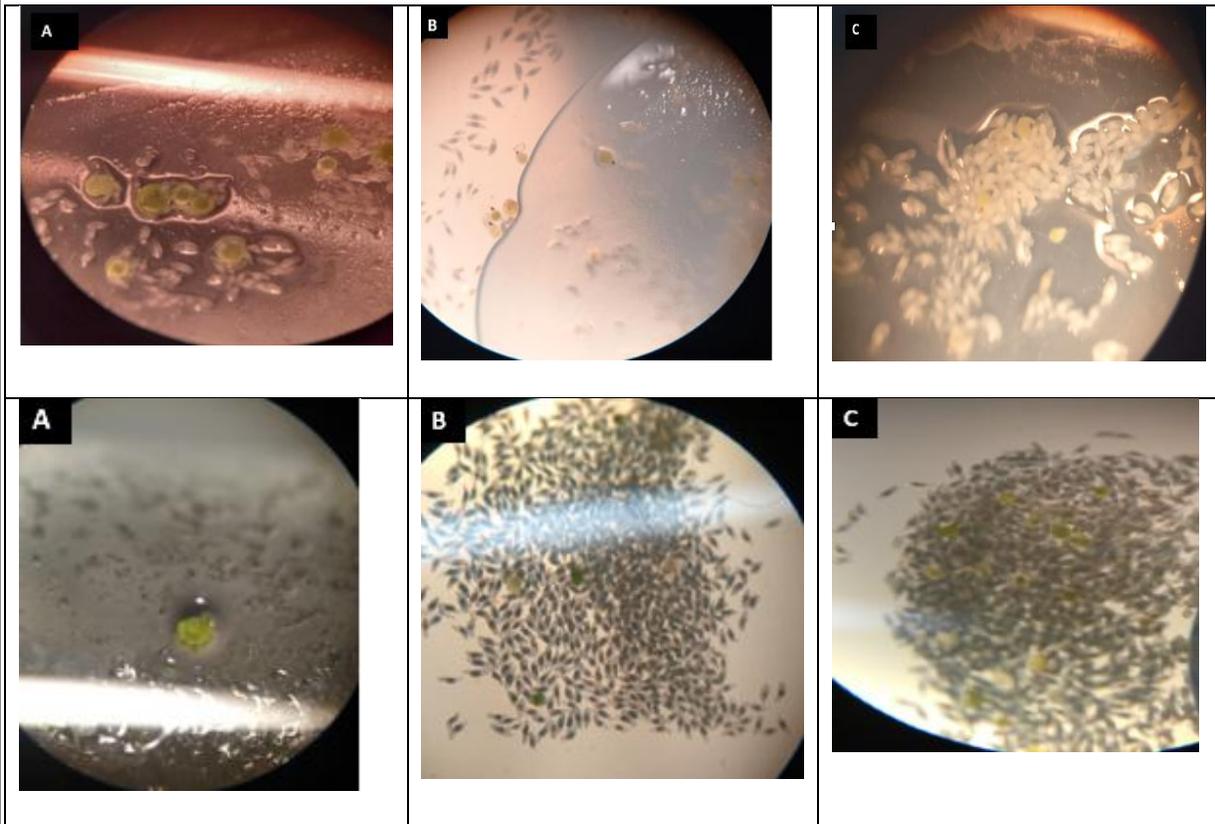
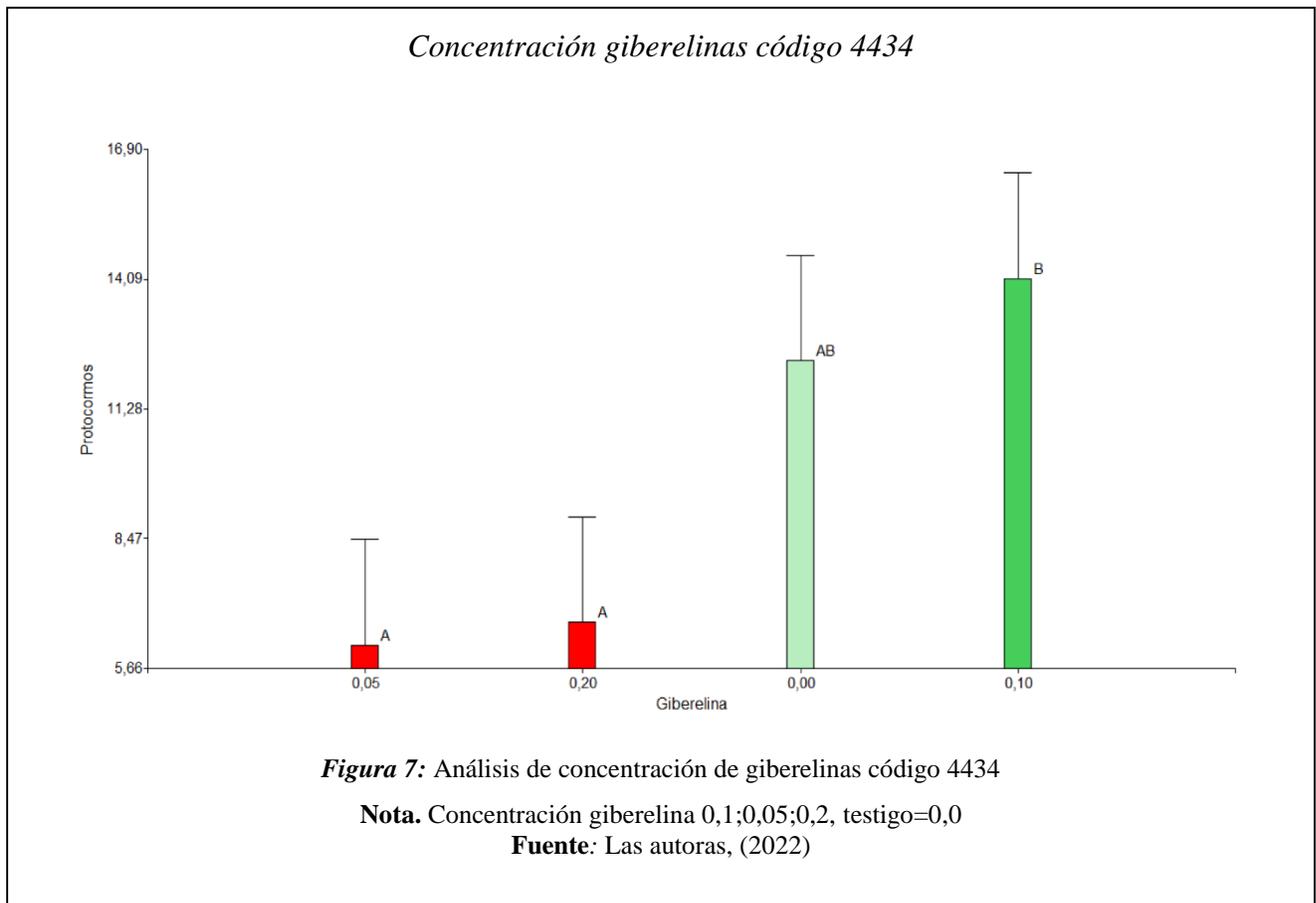


Figura 6: Desarrollo protocormos

A: Medio Plus concentración 0,1; B: Medio Vasin y Went concentración 0,1 C: Medio Lindeman concentración 0,2.

Fuente: Las autoras, (2022)

Se observó en los medios de cultivo (figura 6), (anexos 6,8) mediante un microscopio el aumento de protocormos viables, cuya coloración verde acentuada del embrión es resultado del inicio del proceso de germinación.



3.4 Evaluación del efecto de giberelinas sobre la formación de protocormos

Según el análisis estadístico se puede observar que existen diferencias significativas con la concentración de 0,1 mg/L(B) (figura 7), al obtener un 14,09% de porcentaje de protocormos, Kang et al. (2020), obtuvieron resultados similares, registrando que la germinación de semillas se vio afectada positivamente por un bajo nivel de giberelinas. También se analiza que con las concentraciones de 0,05 mg/L (A) y 0,20 mg/L (A) se obtendría un bajo rendimiento. Por lo tanto se puede decir que a menor concentración de giberelinas mejor inducción de protocormo ya que favoreció positivamente el aumento y desarrollo de protocormos de la especie *Caucaea pichincha* Orquidaceae, según Pedroza-Manrique (2016), una característica de las giberelinas es que en concentraciones bajas, estimulan el metabolismo y desarrollo de los embriones, en cambio

a concentraciones altas lo reprime, además Pedroza et al. (2007), menciona que estas fitohormonas atenúan el efecto inhibitorio en el desarrollo del embrión.

Conclusiones:

Se logró coleccionar muestras de germoplasma de la especie *Caucaea pichincha* en las zonas de estudio, y al emplear la técnica de tetrazolio para evaluar la calidad de las semillas se obtuvo un 96,5% de viabilidad, lo cual eleva la probabilidad de que se formen protocormos con los medios empleados.

El medio Vacin and Went, presenta una mayor producción de protocormos a diferencia de los medios Knudson plus y Lindeman, esto confirma la relación que existe entre el desarrollo de protocormos y una alta concentración de P en el medio.

Al emplear fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, se obtuvieron mejores resultados que con el de 14 horas luz y 10 de oscuridad, indicando que es el mejor fotoperiodo para la especie *Caucaea pichincha*, esto confirma el papel de la luz en el cultivo *in vitro* promoviendo el desarrollo de los protocormos.

La concentración ideal de giberelinas (GA3) para la especie *Caucaea pichincha*, fue de 0,1 mg/L, indicando que a bajas concentraciones de esta fitohormona se obtuvo un desarrollo considerable de protocormos.

Recomendaciones

Se recomienda recolectar muestras de la especie *Caucaea pichincae* en las faldas del volcán el Corazón del cantón Mejía, en la zona del Río Pita y Cochasquí, entre los meses de abril y junio donde hay mayor cantidad de cápsulas.

Se pueden ensayar los tres medios empleados en el estudio, en otras especies del género *Caucaea* para el desarrollo de protocormos, ya que los resultados pueden variar dependiendo de la especie y el medio.

Se recomienda seguir evaluando el uso de las giberelinas (GA3), con otras especies del género *Caucaea*, a bajas concentraciones (0,1 mg/L), y realizar ensayos sobre el desarrollo de protocormos.

Es recomendable emplear más horas de luz lo que correspondería a un fotoperíodo igual al de la investigación, ya que la luz juega un papel fundamental en el proceso de división celular y desarrollo *in vitro*.

Bibliografía:

- Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C., & Lee-Espinosa, H. E. (2017). Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación ex situ. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(7), 1741–1747. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i7.166>
- Aguirre-Bolaños, M., Benítez-Flores, José, González-Valle, M., Hernández-Portilla, L., Quintanar-Zúñiga, R., & Flores-Ortíz, C. (2017). Efecto del almacenamiento prolongado sobre la viabilidad y perfil de ácidos grasos en semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. *Fitotec*, 40(2)(1), 152–160. https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625
- Al-Mayahi, A. M. W. (2021). In vitro plant regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.): effect of chelated iron sources. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00177-4>
- Alcantara, J., Acero, J., Aláantara, J. onathan, & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Angiosperm Phylogenetic Group. (2022). *Orchidaceae Family*.
- Aucapiña, C., & López, P. (2016). Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel in vitro. *Tesis*, 1–63. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Ayuso, J. (2017). Los frutos y las semillas de las orquídeas. *Orquídeas Silvestres Del Sistema Ibérico*, October.
- Banda-Sánchez, L., Pinzón-Ariza, Y., & Venegas-Martínez, L. (2017). Características físicas y germinativas de la semilla de *Prosthechea* sp. (Orchidaceae) nativa de Fusagasugá. *Biota Colombiana*, 18(1), 79–86. <https://doi.org/10.21068/c2017.v18n01a6>
- Bonilla, M., Mancipe, C., & Aguirre, A. (2015). Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 67. <https://doi.org/10.22490/21456453.1264>

- Bravo, E. (2019). *La biodiversidad en el Ecuador*.
- Cazarez-Favela, T. L., Graciano-Luna, J. de J., Solís-González, S., Díaz-Ramírez, B., Nájera-Luna, J. A., & Montoya-Ayón, J. B. (2016). Propagación in vitro de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 67, 19–25. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2016672269>
- Cerna, M., Cardenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. (2014). 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. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 20(2), 5–19.
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabblerley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S., Stevens, P. F., Briggs, B., Brockington, S., Chautems, A., Clark, J. C., Conran, J., Haston, E., Möller, M., Moore, M., Olmstead, R., ... Weber, A. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Chelate, I. (2014). *Quelato de hierro y agua de coco en la germinación in vitro de Rossioglossum grande (Orchidaceae)*. *Cm*, 229–237.
- Crispa, C., Orchidaceae, L., Characterization, M., Chloraea, O. F., Lindl, C., Verdugo, G., Marchant, J., Cisternas, M., Calderón, X., & Peñaloza, P. (2007). *Caracterización morfológica de la germinación de Chloraea Crispa Lindl. (Orchidaceae) usando analisis de imagen*. 64(2), 232–238.
- Cruz, J., Anaya, J., Montero, V., & Ruiz, F. (2017). Extracción de DNA de plántulas de papaya preservadas con silica gel: una alternativa para descartar el uso de nitrógeno líquido. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21(63), 65–69. https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas63/NotaCientifica-2_T63ExtracciondeDNAdeplantasdepapaya.pdf
- De, L. . (2020). Morphological Diversity In Orchids. *International Journal of Botany Studies International*, 5(5), 299–238. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24041.31849>
- De la Cruz, A., López, A., & López, E. (2017). *Efecto del ácido giberélico en la propagación in vitro de Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni , Effect of gibberellic acid in the in vitro*

- propagation of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni , “ stevia .” 24(2), 599–608.*
- Dodson Calaway. (2003). *Native Ecuadorian Orchids. Volume IV: Oncidium - Restrepiopsis.*
- Duarte, E. R., Mangeón, V., Küppers, G., Rocha, P., & Niella, F. (2017). Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae). *Caldasia*, 39(2), 388–399. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v39n2.62184>
- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9382-0>
- Esqueviel, J., Castañeda, M., Castro, R., & Cetzal, W. (2021). *Orquídeas Generalidades y Peculiaridades. June.*
- Fernandez, D., Garzon, C., Yáñez, M., González, D., Mena, J., Tobar, F., & Freire, E. (2018). Orquídeas Y Bromelias De La Provincia De El Oro. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Fochi, V., Falla, N., Girlanda, M., Perotto, S., & Balestrini, R. (2017). Cell-specific expression of plant nutrient transporter genes in orchid mycorrhizae. *Plant Science*, 263, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.06.015>
- Franceschi, C. R. B., Smidt, E. C., Vieira, L. N., & Ribas, L. L. F. (2019). Storage and in vitro germination of orchids (Orchidaceae) seeds from atlantic forest – Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(3), 1–11. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180439>
- Garcia, R. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. *Comision Nacional Forestal, I(Micropropagación de orquídeas), 30–38.* <http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/>
- Gómez, G., Cristiani, E., & Villegas, T. (2010). Establecimiento de protocolos para la propagación in vitro de plantas de *Acourtia cordata* (Cerv.) Turner (Compositae), colectadas en la Sierra de Guadalupe. *Polibotánica*, 30, 89–110.
- Gonçalves, L. M., Machado, M. F. P. S., Ballesta, P., Mora, F., Gutierrez, M. A. M., & Mangolin, C. A. (2016). Organic supplement for in vitro propagation of the hybrid *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia*, 34(1), 47–54. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>
- Hernández, I. (2017). *Efecto del fotoperiodo y el ácido giberélico sobre el desarrollo de*

- Cymbidium sp.* Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- HiMedia. (2017). *Vacin and Went Medium*. <https://himedialabs.com/TD/PT082.pdf>
- Jadán, O., Cedillo, H., Zea, P., Quichimbo, P., Peralta, Á., & Vaca, C. (2016). Relación entre deforestación y variables topográficas en un contexto agrícola ganadero, cantón Cuenca. *Bosques Latitud Cero*, 6(1), 1–13.
- Kang, H. J., Kang, K. W., Kim, D. H., & Sivanesan, I. (2020). In vitro propagation of *gastrochilus matsuran* (Makino) schltr., an endangered epiphytic orchid. *Plants*, 9(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/plants9040524>
- Knudson, L. (2007). Phyto Technology Laboratories. *Technology*, 66282–66282.
- Kondhare, K. R., Patil, A. B., & Giri, A. P. (2021). Auxin: An emerging regulator of tuber and storage root development. *Plant Science*, 306(February), 110854. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110854>
- Lakshmanan, P., Loh, C. S., & Goh, C. J. (1995). An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid Aranda Deborah using thin section culture. *Plant Cell Reports*, 14(8), 510–514. <https://doi.org/10.1007/BF00232785>
- Lindemann EG, JE Gunckel, O. D. (2010). Phyto Technology Laboratories ® Product Information Sheet NLN Basal Medium. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 8682(June), 1002–1004.
- Llorente, B. E. (2002). *Cultivo de células y tejidos vegetales: generalidades*. 28–42. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4/_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y)
- Londoño-Lopera, P. A., & Villanueva-Mejía, D. F. (2018). *Evaluación de marcadores moleculares de cloroplastos y nucleares, para su uso en identificación molecular de germoplasmas de orquídeas*. 7, 23.
- López, C., & Rangel-Villafranco, M. (2018). Propagación in vitro de *Galeandra greenwoodiana* y *Stanhopea hernandezii*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 5(2), 28–38.
- Lorea, F., Hernández, V., & Morales, J. (2005). La biodiversidad en Veracruz: Estudio de Estado. *Comisión Nacional Para El Conocimiento y Uso de La Biodiversidad*, I, 266.
- Magrini, S., De Vitis, M., Torelli, D., Santi, L., & Zucconi, L. (2019). Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. *Plant Biology*, 21(3), 544–550. <https://doi.org/10.1111/plb.12936>
- Ministerio del Ambiente. (2017). Orquídeas Del Perú Y Herramientas Para Su Identificación.

Ministerio Del Ambiente, 11.

- Mites, M., García-Mozo, H., Galán, C., & Oña, E. (2022). Analysis of the Orchidaceae Diversity in the Pululahua Reserve, Ecuador: Opportunities and Constraints as Regards the Biodiversity Conservation of the Cloud Mountain Forest. *Plants*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/plants11050698>
- Mites, M., & Oña, E. (2018). Diversidad de Orquídeas de los Bosques Deciduo y Siempre Verde Estacional en Manabí, Ecuador. *Revista Científica Hallazgos*, 3(2), 154–168. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7148200&info=resumen&idioma=ENG%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7148200&info=resumen&idioma=SPA%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7148200>
- Moya, I., & París, V. (2018). *Orquídeas de la comarca de Requena-Utiel*. 301–328.
- Orejuela-Gartner, J. E. (2010). La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali , municipio de Santiago de Cali , Valle del Cauca ,. *El Hombre y La Maquina*, 35, 53–66.
- Ortega-Larrocea, M. P., Martínez, A., & Chávez, V. M. (2007). Conservación y propagación de orquídeas. *Conservación y Propagación de Orquídeas*, 483–495.
- Oseni, O. M., Pande, V., & Nailwal, T. K. (2018). A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 3778–3786. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.438>
- Osorio, G. (2015). Manual de prácticas de Angiospermas. *Universidad Autonoma Del Estado de Hidalgo [TESIS]*, 122.
- Otero, J. (2018). *Investigaciones Sobre Orquídeas en Colombia*. 89. [http://bdigital.unal.edu.co/70401/1/investigación de orquídeas en Colombia.pdf](http://bdigital.unal.edu.co/70401/1/investigación%20de%20orquídeas%20en%20Colombia.pdf)
- Pakum, W., Watthana, S., Srimuang, K. O., & Kongbangkerd, A. (2016). Influence of medium component on in vitro propagation of thai's endangered orchid: *Bulbophyllum nipondhii* seidenf. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 26(1), 37–46. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v26i1.29765>
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Toso, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study.

- International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49.
<https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Pardo, S. (2014). La Universidad Católica de Loja. *Evaluar Un Proceso de Adaptación Alternativo En Dos Especies de Orquídeas Cattleya Iricolor y Gongora Sp. Germinadas in Vitro*, 1–42.
- Pardo, S. (2020). *Evaluar un proceso de adaptación alternativo en dos especies de orquídeas Cattleya iricolor y Gongora sp. germinadas in vitro*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Paredes, E. (2013). Determinación de los protocolos para cultivo in-vitro de las especies *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium cultratum*. *Universidad Politécnica Salesiana*, 1–100.
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Pedraza-Santos, M. (2017). The massive propagation of orchids (Orchidaceae): an alternative for the conservation of wild species. *Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 6, 10*, 31–36.
- Pedroza-Manrique, J. (2016). Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación in vitro de *Masdevallia auropurpurea* Reich. *Ciencias Básicas Revista Científica*, 9, 117–141.
- Pedroza, J., Fernández, C., & Silva, A. (2007). Influencia del AIA, AG3 y Kinetina en el color, forma y tamaño de los protocormos de *Compantia falcata* (Orchidaceae) durante su germinación bajo condiciones in vitro. *Revista Científica*, 10, 119.
<https://doi.org/10.14483/23448350.301>
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro. In *Universidad Nacional de Colombia* (Vol. 9, Issue 19).
http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf
- Pérez, B. A., & Castañeda, S. L. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Biotecnología Vegetal*, 16(3), 143–151.
- PhytoTechnology Laboratories, I. (2003). *Orchid Seed Germination*. 5–7.
- Pradhan, N., Fan, X., Martini, F., Chen, H., Liu, H., Gao, J., & Goodale, U. M. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical Studies*, 63(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40529-022-00333-0>
- Quintero, S., Pico, J., & Diaz, S. (2018). Efecto de diferentes concentraciones de giberelina en la germinación y crecimiento longitudinal de *Prunus subcorymbosa* Ruiz ex Koehne. *Boletín*

Semillas Ambientales, 12(1), 174–182.
<https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/bsa/article/view/13630>

- Ricardo, B.-V., Alberto, J.-O., Leonel, A.-H., Del, D., Resumen, A., & De, D. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura The plant hormones, an important component of the agriculture development Editado por: Selva Andina Research Society. *Journal of the Selva Andina Biosphere* ®. Bolivia. All Rights Reserved.
- Rodríguez, B. (2013). Inducción de la germinación in vitro de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. In *Unam*.
- Salazar, S., & Gélvez, J. (2015). *Determining the Viability of Orchid seeds using the Tetrazolio and Carmín Índigo Tests*. 2.
- Sharry, S. (2020). Plantas de probeta. *Plantas de Probeta*. <https://doi.org/10.35537/10915/46738>
- Shukla, A. K., Behera, S. K., Pakhre, A., & Chaudhari, S. K. (2018). Micronutrients in soils, plants, animals and Humans. *Indian Journal of Fertilisers*, 14(4), 30–54. <https://www.researchgate.net/publication/324497356>
- Sinha, P., & Roy, S. (2004). Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. through in vitro culture. *Plant Tissue Cult*, 14(1), 55–61.
- Soares, J. S., Sorgato, J. C., Ribeiro, L. M., & Ramos, J. M. C. (2021). Seed viability test of orchids native to the Brazilian savanna. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 51, 1–7. <https://doi.org/10.1590/1983-40632021v5167069>
- Stancato, G. C., Abreu, M. F., & Furlani, Â. M. C. (2008). Crescimento de orquídeas epífitas in vitro: adição de polpa de frutos. *Bragantia*, 67(1), 51–57. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052008000100006>
- Suárez, I. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. In *Fondo editorial, Universidad de Cordoba*.
- Szlachetko, D. L., & Kolanowska, M. (2015). Five new species of *Caucaea* (orchidaceae) from Colombia and Ecuador. *Polish Botanical Journal*, 60(2), 127–134. <https://doi.org/10.1515/pbj-2015-0026>
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velazco, M., & Escobar-Aguayo, J. (2017). Estado de Conservación de orquídeas silvestres (Orchidaceae). *Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 6, 10*, 3–12.
- Utami, E., & Hariyanto, S. (2019). In vitro seed germination and seedling development of a rare indonesian native orchid *phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. *Scientifica*, 2019, 6. <https://doi.org/10.1155/2019/8105138>

- Utami, E., & Hariyanto, S. (2020). Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. *International Journal of Agronomy*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>
- Vacin & Went. (2007). Phyto Technology Laboratories , LLC TM Product Information Sheet Knudson C Orchid Medium Morel Modification. *Technology*, 66282–66282.
- Valencia, N. (2018). Germinación asimbiótica y cultivo in vitro de la orquídea epífita *Epidendrum jamiesonis* y de la orquídea terrestre *Pleurothallis pulchella*. *Universidad San Francisco de Quito USFQ*, 22(4), 20–41.
- Villacr ez, T. (2022). Evaluación del fotoperíodo y de la temperatura en la germinación in vitro de tres especies presentes en el Parque Nacional Cayambe-Coca: *Werneria pygmaea* Gillies ex Hook. & Arn., *Werneria nubigena* Kunth. y *Senecio chionogeton* Wedd. (Asteraceae). *Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE*, 33(1), 1–12.
- Vudala, S. M., & Ribas, L. L. F. (2017). Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, 108, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.008>
- Yeung, E. C. (2017). A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, 58(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, 40(4), 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>

Anexos:

Anexo 1. Formulación de medio Knudson modificado

Cantidad (mg)	Componente
500	Sulfato de amonio
0.056	Ácido bórico
694.4	Nitrato de calcio
0.0624	Sulfato cúprico 5 H ₂ O
25.0	Sulfato ferroso 7 H ₂ O
122.125	Sulfato de magnesio
5.682	Sulfato de manganeso H ₂ O
0.016	Trióxido molibdeno
250.0	Fosfato de potasio monobásico
0.031	Sulfato de zinc 7 H ₂ O
20000	Sacarosa
2000	Phytigel
pH: 4.7	

Fuente: (Paredes, 2013)

Anexo 2. Formulación de Medio Vacin y Went Medio de orquídea modificado

Formulación	Cantidades
Sulfato de amonio	500
Fosfato de calcio, tribásico	200
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37.26
Sulfato ferroso•7H ₂ O	27.8
Sulfato de magnesio, anhidro	122.1
Sulfato de Manganeso•H ₂ O	5.6
Nitrato de potasio	525
Fosfato de potasio, monobásico	250
Sucrose	20
Tiamina•HC	0.4

Fuente: (Vacin & Went, 2007)

Anexo 3. Formulación del medio Lindemann Orquídea Basal Medio

Componentes	Cantidades
Fosfato de potasio, monobásico	135
Cloruro de aluminio•6H ₂ O	0.0561
Sulfato de amonio	1000
Ácido bórico	1.014
Nitrato de calcio	347.2
Sulfato cúprico•5H ₂ O	0.019
Citrato férrico	4.4
Sulfato de magnesio, anhidro	58.62
Sulfato de Manganeso•H ₂ O	0.0515
Cloruro de níquel•6H ₂ O	0.0312
Cloruro de potasio	1050
Yoduro de potasio	0.099
Tiamina•HCl	10
Sulfato de zinc•7H ₂ O	0.565
Glicina (Base Libre)	2
mioinositol	100
Ácido nicotínico (ácido libre)	1
Piridoxina•HCl	1
sacarosa	20

Fuente: (Lindemann EG, JE Gunckel, 2010)

Anexo 4. Recolección de las muestras de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan, en las faldas del volcán el Corazón del cantón Mejía en el bosque protector Umbría.



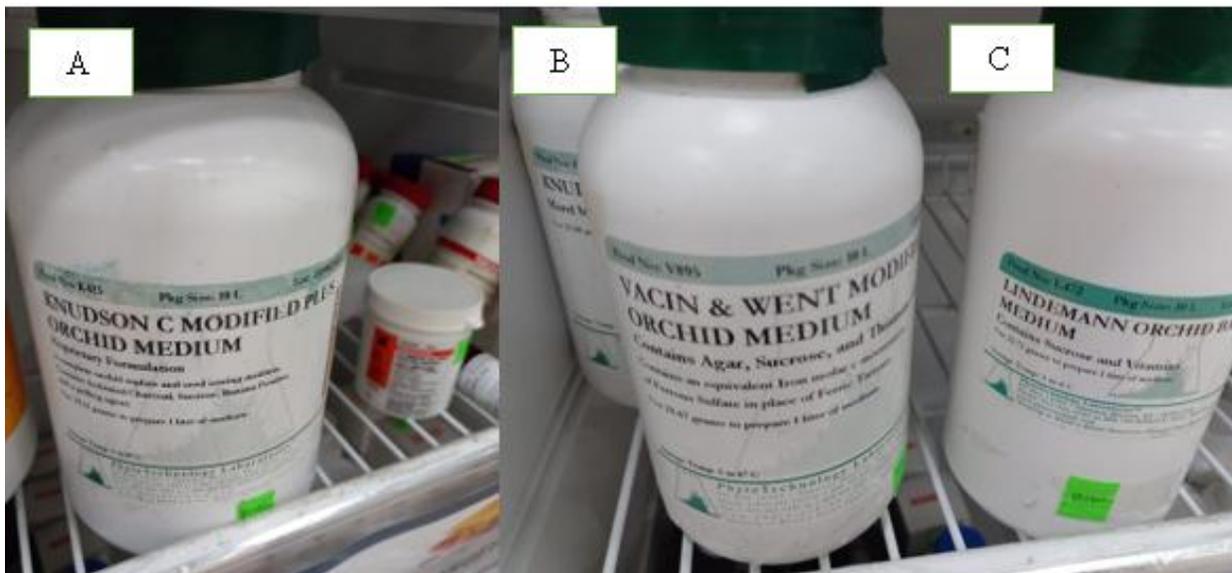
Nota. a: Uso de la tijera de podar para alcanzar las muestras. B: Especimen de *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan
Elaborado por: Las autoras, (2022)

Anexo 5. Prueba de tetrazolio para la viabilidad de las semillas



Nota: Se emplea la técnica de tetrazolio para evaluar la calidad de las semillas, las semillas viables se tornan de un color ligeramente rojizo. A: Muestra de semillas con tetrazolio salidas del congelador, B: Colocación de semillas en el portaobjetos para observar con el estereoscopio el porcentaje de viabilidad.

Anexo 6. Medios de cultivo empleados para el desarrollo de protocormos de *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan.



Nota: Los medios de cultivo fueron empleados a un pH de 5.8 para mejores resultados, a: Medio Knudson modificado, b: Medio Vacin and Went. C: Medio Lindeman
Elaborado por: Las autoras, (2022)

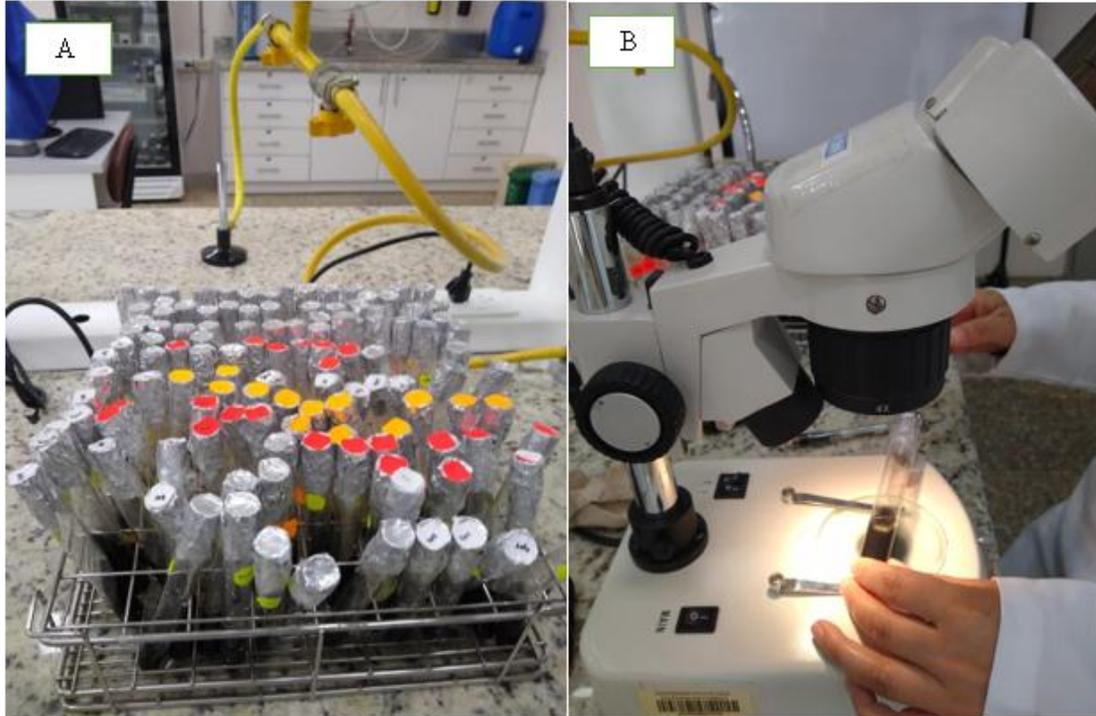
Anexo 7. Protocolo de desinfección de las semillas de de *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan.



Nota. Se lleva a cabo un protocolo de desinfección de las semillas en la cámara de flujo laminar. A: Absorción empleando la jeringa de la solución de hipoclorito al 3% con dos gotas de tween, B: Expulsión y lavado de la solución con agua estéril.

Elaborado por: Las autoras, (2022)

Anexo 8. Formación de protocormos en los medios de cultivo.



Nota: Medios de cultivo en rejilla para la cámara de crecimiento abierta CA, b: Conteo de protocormos empleando estereoscopio.

Elaborado por: Las autoras, (2022)