



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS DE
Epidendrum atacazoicum Schltr. ORQUÍDEA ENDÉMICA DEL AZUAY

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORAS: PAULA MAITÉ CALLE YUMBLA

ANABEL ALEJANDRA PUCHA AUQUILLA

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D.

Cuenca - Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotras, Paula Maité Calle Yumbla con documento de identificación N° 1400697809 y Anabel Alejandra Pucha Auquilla con documento de identificación N° 0106504731; 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.

Cuenca, 21 de agosto del 2023.

Atentamente,



Paula Maité Calle Yumbla
1400697809



Anabel Alejandra Pucha Auquilla
0106504731

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

Nosotras, Paula Maité Calle Yumbla con documento de identificación N° 1400697809 y Anabel Alejandra Pucha Auquilla con documento de identificación N° 0106504731, 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 autoras del Trabajo experimental: “Evaluación de dos protocolos de desinfección de semillas de *Epidendrum atacazoicum* Schltr. orquídea endémica del Azuay”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería 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.

Cuenca, 21 de agosto del 2023.

Atentamente,

Paula Maité Calle Yumbla

1400697809

Anabel Alejandra Pucha Auquilla

0106504731

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS DE *Epidendrum atacazoicum* Schltr. ORQUÍDEA ENDÉMICA DEL AZUAY, realizado por Paula Maité Calle Yumbra con documento de identificación N° 1400697809 y por Anabel Alejandra Pucha Auquilla con documento de identificación N° 0106504731, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 21 de agosto del 2023.



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D.

0102291044

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

Agradecimientos de Paula:

El éxito de una persona reside no solo en su esfuerzo y perseverancia, sino también en rodearse de personas que lo ayuden a crecer. La persona que llegue a ser hoy en día se debe gracias a mi familia y a las personas que han llegado a mi vida sin esperar nada a cambio, aquellos que me ayudaron a sobrellevar cada una de las etapas de mi vida, mis amigos. Agradezco a Dios por guiarme y cuidarme en cada paso que he dado, a la Dra. Inés Malo por guiarme en este complicado camino que es la universidad y ayudarme a llegar a cumplir mi objetivo. A mis abuelitos, que han sido mis pilares, mi refugio, mi modelo a seguir y me han brindado amor incondicional. A mi madre que me ha enseñado a ser una mujer fuerte y firme ante cualquier situación. Agradezco a la vida por haberme rodeado de experiencias y gente maravillosa que me aceptado como soy. Agradezco finalmente a mi compañera de tesis, quien estuvo para apoyarme desde el primer día de universidad y se quedó conmigo hasta el final, por creer en mí.

Agradecimientos de Anabel:

Al finalizar este camino lleno de aprendizaje, crecimiento personal y desarrollo. Solo tengo palabras de agradecimiento a las personas que formaron parte de esta aventura y las que estuvieron hasta el final.

A mis padres por el apoyo infinito, por sentirse orgullosos de cada uno de mis logros y ser un pilar fundamental en mi vida.

A mí familia paterna por estar a mi lado apoyándome en lo que estuvo en su alcance.

A mi tutora Dra. Inés Malo por la paciencia y seguir el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos que me acompañaron en este proceso compartiendo experiencias, anécdotas y tareas a lo largo de la carrera; a los amigos que siempre se preocuparon por mi incluso sin entender cuál era el problema.

Finalmente, a mi compañera de tesis, porque la amistad que se hacen el primer día de clases puede ser la que te acompañe incondicionalmente hasta el último proyecto de pregrado.

Buena caza y largas lunas.

Resumen

La micropropagación es una técnica utilizada para una siembra a gran escala de plantas mediante el cultivo de tejidos en condiciones controladas de laboratorio, permitiendo la producción masiva en poco tiempo. En particular, la micropropagación de orquídeas es una técnica importante para la producción de plantas ornamentales y la conservación de la flora endémica y nativa del país en peligro de extinción. La desinfección de las semillas es un paso crucial, ya que pueden estar contaminadas con microorganismos que pueden impedir el crecimiento y desarrollo de los cultivos.

Epidendrum atacazoicum es una orquídea endémica de la provincia del Azuay en Ecuador, a pesar de haber sido galardonada en un festival de Japón, no dispone de información relevante fuera de su taxonomía. La micropropagación de esta especie puede ser una herramienta importante para su conservación y propagación en condiciones controladas gracias a su capacidad de adaptación en diferentes climas.

En este contexto, siguiendo una revisión bibliográfica evaluamos dos protocolos de desinfección, lo que puede contribuir al desarrollo de una metodología efectiva para la propagación de esta especie y su conservación a largo plazo. Se enfocarán dos protocolos de desinfección para determinar aquel que produzca mejores resultados. Se analizarán los resultados a las nueve semanas, considerando las muestras que no presenten contaminación y que se encuentren en proceso de germinar.

Palabras claves

Micropropagación, semillas, contaminación, protocolos de desinfección, asepsia, germinar.

Abstract

Micropropagation is a technique used for large-scale seeding of plants through tissue culture under controlled laboratory conditions, allowing mass production in a short time. In particular, orchid micropropagation is an important technique for the production of ornamental plants and the conservation of endemic and native flora of the country in danger of extinction. The disposal of the seeds is a crucial step, since they can be contaminated with microorganisms that can prevent the growth and development of the crops.

Epidendrum atacaicoicum is an endemic orchid from the province of Azuay in Ecuador, despite having been awarded at a festival in Japan, there is no relevant information outside of its taxonomy. The micropropagation of this species can be an important tool for its conservation and propagation under controlled conditions thanks to its adaptability in different climates.

In this context, following a bibliographical review, we evaluated two disinfection protocols, which can contribute to the development of an effective methodology for the propagation of this species and its long-term conservation. Two disinfection protocols will be focused to determine the one that produces the best results. The results will be analyzed at nine weeks, considering the samples that do not present contamination and that are in the process of germinating.

Keywords:

Micropropagation, seeds, contamination, disinfection protocols, asepsis, germinate.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO	4
RESUMEN	6
Palabras claves	6
ABSTRACT	7
Keys words	7
INTRODUCCIÓN	15
1.1 Problema.....	15
1.1.1 Importancia y alcances	15
1.1.2 Importancia y generalidad del problema para los sectores:	16
1.2 Delimitación	17
1.2.1 Delimitación geográfica (espacial), temporal, sectorial e institucionalmente	17
1.3 Pregunta de investigación.....	18
1.4 Objetivos	18
1.4.1 General.....	18
1.4.2 Específicos:.....	18
1.5 Hipótesis.....	19
FUNDAMENTACIÓN TEORÍCA	20
2.1 Las orquídeas en Ecuador	20

2.1.1 Distribución de las orquídeas endémicas de la Región Interandina	21
2.2 Género <i>Epidendrum</i>	22
2.2.1 Diversidad y distribución.....	23
2.2.2 Morfología	23
2.3 <i>Epidendrum atacazoicum</i> Schltr	23
2.4 Micropropagación <i>in vitro</i>	25
2.4.1 Viabilidad de las semillas con tetrazolio	26
2.4.2 Protocolos de desinfección y siembra en medio de cultivo	26
MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Materiales	30
3.1.1 Implementos de oficina	30
3.1.2 Reactivos	30
3.1.3 Material vegetal	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Protocolo de extracción de semillas	31
3.2.2 Prueba de viabilidad	32
3.2.3 Protocolos de desinfección de semillas	32
3.2.4 Siembra en la cámara de flujo laminar	33
3.2.5 Cámara de crecimiento	33
3.2.6 Metodología de observación microscópica	34

	10
3.3 Diseño.....	35
3.3.1 Población y muestra.....	37
3.3.2 Protocolos	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 Análisis de datos.....	40
4.1.1 Protocolo de extracción de semillas	40
4.1.2 Prueba de viabilidad	40
4.1.3 Protocolos de desinfección de semillas	41
4.1.4 Siembra en la cámara de flujo laminar	41
4.1.5 Cámara de crecimiento	42
4.1.6 Observación por el estereomicroscopio.....	43
4.2 Presentación de datos	45
4.2.1 Comparación de las semillas con pretratamiento de secado en relación con las muestras contaminadas	45
4.2.2 Comparación de las semillas recién recolectadas en relación con las muestras contaminadas	46
4.2.3 Comparación de las semillas en relación con las muestras contaminadas	47
4.2.4 Comparación de los protocolos en relación con las muestras contaminadas	51
4.2.5 Conteo de semillas germinadas por muestra	52
4.3 Discusión.....	55

	11
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
5.1 Conclusiones	58
5.2 Recomendaciones.....	60
6 REFERENCIAS.....	61
7 ANEXOS	69

TABLA DE ILUSTACIONES

Ilustración 1 Resultado de test Fisher relación semillas secas y la contaminación de las muestras en R	45
Ilustración 2 Resultado de test Fisher relación semillas recién recolectas y la contaminación de las muestras en R	46
Ilustración 3 Resultado de test Fisher relación semillas recién recolectas y secadas y contaminación de las muestras en R	47
Ilustración 4 Resultado de test Fisher relación semillas recién recolectas con TTC y secadas, y, la contaminación de las muestras en R	48
Ilustración 5 Resultado de test Fisher relación semillas secas con TTC, las recién recolectadas, y, la contaminación de las muestras en R	49
Ilustración 6 Resultado de test Fisher relación semillas que pasaron por prueba de viabilidad, y, la contaminación de las muestras en R	50
Ilustración 7 Gráfico de barras del tipo de semillas en relación a la contaminación	50
Ilustración 8 Resultado de test Fisher relación protocolos y contaminación de las muestras en R	51
Ilustración 9 Gráfico de barras de los protocolos en relación a la contaminación.....	52
Ilustración 10 ANOVA en RStudio	53
Ilustración 11 Resumen de ANOVA en RStudio.....	53
Ilustración 12 Test de Tukey en R	55
Ilustración 13 Test de Tukey.....	55
Ilustración 14 Caja Petri con semillas germinadas	70
Ilustración 15 Semillas obtenidas de las cápsulas.....	70

Ilustración 16 Semillas después de realizar la prueba de TTC	71
Ilustración 17 Muestra contaminada	71
Ilustración 18 Preparación de semillas para protocolo de desinfección	81
Ilustración 19 frascos ámbar para la prueba de viabilidad	72
Ilustración 20 semillas germinadas vistas por el estereoscopio	72
Ilustración 21 Muestra de semillas con TTC	73
Ilustración 22 Semillas secas germinadas vistas desde el estereoscopio	73
Ilustración 23 Muestra después de dos meses de siembra	74
Ilustración 24 Muestra de semillas recién recolectadas después de dos meses	74
Ilustración 25 Caja Petri que presenta contaminación	75
Ilustración 26 Muestra de semillas secas después del primer mes	75
Ilustración 27 Muestra del Protocolo 1 después de dos meses	76
Ilustración 28 Muestra del protocolo 2 después de dos meses	76
Ilustración 29 Semillas germinadas de la muestra de Recién recolectadas	77
Ilustración 30 Semillas recién recolectadas del protocolo 1	77
Ilustración 31 Semillas con TTC después de dos meses.....	78
Ilustración 32 Muestra de semillas sin crecimiento	78
Ilustración 33 Muestra de semillas sin poder germinativo después de dos meses.....	79
Ilustración 34 Semillas con TTC sin germinación después de dos meses	79
Ilustración 35 Comparación de protocolos entre semillas con TTC y sin selección previa	80
Ilustración 36 Tallo y hojas de <i>Epidendrum</i>	80
Ilustración 37 Vara floral de <i>Epidendrum</i>	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Especies con mayor cantidad de especies endémicas de la Sierra	22
Tabla 2	. Taxonomía de <i>E. atacazoicum</i> Schltr	25
Tabla 3	Distribución de las muestras en la cámara de crecimiento	34
Tabla 4	. Diseño de Bloque Completamente al Azar	37
Tabla 5	Presencia de contaminación en las muestras.....	43
Tabla 6	Conteo de semillas germinadas.....	44
Tabla 7	Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog 1962.....	69

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Problema

Actualmente, en Ecuador hay poca información e implementación de protocolos de Biotecnología Vegetal para desarrollar, propagar y manejar la flora endémica y nativa del país, considerando que esto ayuda a la sostenibilidad y mantenimiento de especies en peligro de extinción o amenazadas, y, la conservación de plantas que están en vulnerabilidad como indica el Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador (León & Endara, 2023).

Al ser nuestro país megadiverso se busca conservar y propagar especies endémicas y nativas de Ecuador; gracias a la Biotecnología Vegetal que desarrolla técnicas para el cultivo de tejidos o semillas, por lo que se requieren protocolos adecuados para la desinfección de semillas como paso previo a la micropropagación, asegurando que las semillas no sean contaminantes evitando pérdidas económicas y de material vegetal (Rivero, 2020).

1.1.1 Importancia y alcances

En la actualidad la industria ornamental tiene un gran impacto a nivel mundial sobre todo las flores de orquídeas por su gran variedad de formas y colores; una de las formas de obtención de estas plantas es la propagación *in vitro* que se puede realizar desde las semillas o meristemas, el problema es que su desarrollo puede presentar una gran cantidad de inconvenientes entre ellos la contaminación por hongos y bacterias después de la siembra en el medio de cultivo ya sea por un mal protocolo de desinfección del material vegetal o por una mala asepsia de materiales y equipos (Chávez et al. 2021).

El presente trabajo es importante porque ayuda a identificar un protocolo óptimo para que en un futuro se pueda desarrollar una micropropagación *in vitro* que no tenga inconvenientes por contaminación. Es necesario que haya un procedimiento correcto de esterilización de las cápsulas y semillas para que no exista inconveniente relacionado por una mala desinfección del material vegetal o de instrumentos cuando se realiza una siembra *in vitro* (Mamani & Nova, 2022).

1.1.2 Importancia y generalidad del problema para los sectores:

El sector agrícola es uno de los más importantes del país, porque abarca una gran cantidad de productos que son exportados a Estados Unidos, Europa y Asia; siendo las flores naturales el cuarto producto con mayor venta, teniendo como principales consumidores Estados Unidos, Alemania y Singapur; en el año 2021 hubo un ingreso de más de 684 millones de dólares, teniendo un crecimiento del 7% con respecto al año 2020 (Escobar, 2021).

Además, es el tercer país con mayor exportación de flores en el mundo (Zabala y Ekos, 2019). Si se aplicaran los cultivos *in vitro* habría una mayor producción de plántulas en un menor tiempo lo que ayudaría a optimizar su producción evitando que exista extracción ilegal de ejemplares endémicos de orquídeas lo que puede generar la desaparición de varias especies (Harris et al., 2021).

Es fundamental establecer protocolos de desinfección efectivos debido a su importancia en el sector agrícola, especialmente en la producción de orquídeas. Estos protocolos garantizarán un desarrollo adecuado de las plantas desde sus primeras etapas, es decir, durante su reproducción *in vitro*, minimizando así las pérdidas ocasionadas por la contaminación microbiana. Se busca tener la mayor cantidad de semillas limpias que posterior a su siembra en el medio, no genere crecimiento de colonias de bacterias y hongos, permitiendo así el desarrollo de semillas (Oblitas, 2019).

1.2 Delimitación

Se van a comparar dos protocolos de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio para analizar cómo van a interactuar con las semillas de *E. atacazoicum* obtenidas de 16 cápsulas las cuales, la mitad fueron sometidas a un pretratamiento de secado por un mes y las demás se recolectaron días antes de su siembra en el medio de cultivo de Murashige y Skoog con vitaminas, y se observó su desarrollo hasta el mes de julio para poder examinar su poder germinativo y si existió contaminación por hongos o bacterias.

Se va a utilizar como grupo de control semillas de la primera y la segunda recolección inmersas en una solución de cloruro de tetrazolio al 1% para poder comparar y revisar si las semillas tienen poder germinativo.

1.2.1 Delimitación geográfica (espacial), temporal, sectorial e institucionalmente

Se seleccionaron 16 cápsulas sanas de dos plantas silvestres de *Epidendrum atacazoicum* Schltr. que presentaban vara floral de más de 90 días de la parroquia de San Felipe de Molleturo de la provincia del Azuay; de las cuales ocho fueron cortadas el 31 de marzo del 2023 y pasaron por un tratamiento previo de secado a temperatura ambiente, en ausencia de humedad y de luz solar directa en la ciudad de Cuenca y las otras ocho fueron cortadas el 30 de abril del 2023.

Las cápsulas se llevaron a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana en Cuenca, donde se realizó su procedimiento de desinfección y siembra desde el jueves 04 de mayo del 2023. Posteriormente se pasó a la cámara de crecimiento del laboratorio de Biotecnología en donde se las observó durante dos meses para ver su desarrollo en condiciones controladas hasta la tercera semana de julio del 2023.

1.3 Pregunta de investigación

¿Qué protocolo de desinfección demuestra menor porcentaje de contaminación de muestras y mayor poder germinativo?

Para poder determinar cuál es el mejor protocolo de desinfección de semillas se harán revisiones bibliográficas de diferentes metodologías de tratamientos de lavado de semillas para designar dos protocolos a usarse y comparar su efectividad y poder germinativo.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Evaluar dos metodologías de desinfección de semillas de *Epidendrum atacazoicum* como paso previo a la micropropagación de esta especie silvestre.

1.4.2 Específicos

Decidir el uso de dos protocolos para la descontaminación de las cápsulas de *Epidendrum atacazoicum* atribuyendo su uso a la revisión bibliográfica previamente realizada en base a casos del proceso de micropropagación de plantas con similitudes taxonómicas.

Comparar dos tratamientos de descontaminación comprobando el procedimiento más efectivo de desinfección premicropropagación logrando la obtención de la mayor cantidad de semillas germinadas.

Evaluar estadísticamente los datos obtenidos determinando el protocolo óptimo de desinfección de semillas.

1.5 Hipótesis

La concentración de hipoclorito de sodio influye en los protocolos de desinfección igual que el tiempo de contacto que tenga con las semillas de *Epidendrum atacazoicum* lo que puede provocar que la contaminación disminuya sin causar daños a los tejidos vegetales o este sea el mínimo.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTACIÓN TEORICA

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae que son plantas monocotiledóneas teniendo más de 25 mil especies y alrededor de 700 géneros repartidas por todo el mundo excepto en la Antártida siendo la que presenta mayor variedad en todas las angiospermas que es el grupo más grande y variado de todo el reino Plantae (Zambrano et al., 2019).

Las orquídeas son reconocidas por la forma de sus flores y sus colores vívidos. Entre su gran gama de variedades, se pueden encontrar plantas que durante el invierno se encuentran debajo de la superficie, otras en zonas tropicales son epífitas y toman sus recursos de la planta a la que se adhieren sin causarle daño (Cox & Sageth, 2020).

En el caso de las plantas epífitas necesitan de pseudobulbos para poder captar nutrientes y agua lo que genera que se engrose el tallo para almacenar los carbohidratos para evitar la pérdida de humedad. Sin embargo, en los climas cálidos varias orquídeas terrestres no presentan esta característica (Mazza, 2023).

2.1 Las orquídeas en Ecuador

Ecuador cuenta con una gran diversidad de orquídeas, siendo uno de los países con mayor biodiversidad de estas plantas en el mundo; existen unas 4200 especies de orquídeas, lo que representa aproximadamente el 16% de las conocidas a nivel mundial; 4 de cada 10 plantas endémicas del país son orquídeas (Reina et al., 2017).

En el año 2012 el gobierno de Ecuador y la comunidad científica lo declaró como el país de las orquídeas en el decreto 172 firmado por el expresidente Rafael Correa, se le acuñó este

nombre porque alberga en sus 283 km² más de 4 mil especies distribuidas en sus cuatro regiones esto se ve influenciado por la cordillera de Los Andes, y corrientes marinas cálidas. Algunos de estos ejemplares se encuentran amenazadas por factores antropogénicos o naturales (Borja, 2020).

Una de las flores más pequeñas del mundo es una orquídea que se encuentra en la provincia de Napo, es del género *Stelis* y mide 0.7 mm y la flor más grande es *Phragmipedium wallisii*, esta planta se puede encontrar en los bordes de las carreteras del Oriente del país (Redacción B.S.F., 2022). Otra orquídea destacada por su peculiar forma de cara de mono es del género *Dracula*, endémica de la provincia del Carchi, abarcando el 6% del total de especies endémicas de Ecuador (Guevara et al., 2019).

Actualmente, en Ecuador, la mayoría de sus orquídeas endémicas son epífitas con un 82%, un 8% terrestres y un 5% facultativas; pueden ser terrestres como epífitas; están a una altitud de 84 a 351 m.s.n.m. (Mites & Oña, 2018).

Sin embargo, estas plantas se encuentran en riesgo por las actividades antropológicas como: la extensión de la frontera agrícola, deforestación, ganadería, introducción de nuevas especies como es el caso del pino y el eucalipto, implementación de carreteras, y, el incremento de la minería ilegal en zonas protegidas provocan que casi el 80% de las orquídeas endémicas sean clasificadas con algún grado de amenaza ya sea en peligro crítico, vulnerable, casi amenazada o preocupación menor (León et al., 2019).

2.1.1 Distribución de las Orquídeas Endémicas de la Región Interandina

La provincia que presenta mayor endemismo es Pichincha con 94 especies seguida por Azuay con 89 y Loja con 83. Otra manera de clasificar es por la altitud: páramo de pajonal entre 3400 a 4000 m.s.n.m. aquí se encuentra la mayor cantidad de endemismo con 230, es la zona con

mayor extensión territorial; el páramo de almohadillas y arbustos (4000-4500 m.s.n.m.) con 19 especies, y la última es la zona del páramo desértico con una altitud de 4500 a 4900 metros con 24 variedades (León et al., 2019).

Tabla 1 con mayor cantidad de especies endémicas de la Sierra.

Género	Especies endémicas
<i>Gentianella</i>	7.17%
<i>Draba</i>	3.93%
<i>Epidendrum</i>	3.58%
<i>Lysipomia</i>	3.23%
<i>Berberis</i>	2.87%
<i>Puya</i>	2.87%
<i>Geranium</i>	2.87%
<i>Brachyotum</i>	2.87%
<i>Lapantes</i>	2.87%
<i>Gynoxys</i>	2.15%
<i>Lupinus</i>	2.15%
Total	36.56%

Fuente: León et al., 2019.

2.2 Género *Epidendrum*

La palabra *Epidendrum* proviene del griego *Epi* sobre y *dendron* árbol, es decir, son epifitas porque pueden crecer en ramas y troncos (Vargas et al., 2018). Sin embargo, existen orquídeas que tienen crecimiento litófito que crecen sobre rocas o su desarrollo es terrestre sobre diferentes tipos

de sustratos entre los más comunes corteza de pino, carbón, grava, fibra de coco entre otros (Aguirre, 2018).

2.2.1 Diversidad y Distribución

El género *Epidendrum* abarca alrededor de 2400 especies siendo la más representativa de la familia Orchidaceae. Crecen en ambientes tropicales con gran humedad; el país con mayor cantidad de este tipo de orquídeas es Colombia con 527 especies siendo el 12% (Vargas et al., 2018).

2.2.2 Morfología

Muruaga y Parrado (2019), explica que las raíces son carnosas, basales y delgadas de un grosor de 0.3 cm. Su tallo es fino en modo de cañas y su tamaño oscila entre los 30 a 55 cm, algunos de sus tallos son engrosados por sus pseudobulbos se encuentran rodeadas de 6 a 12 hojas.

Las inflorescencias se encuentran al final de la vara floral, es un racimo simple que puede ir de 1 a varias flores; los pétalos son más delgados que los sépalos (Vargas, 2018).

Las semillas de las *Epidendrum* son pequeñas que pueden variar de tamaño o forma por lo general son elipsoidal y miden de 1 a 2 mm, no contienen endospermo por cada cápsula se pueden encontrar de 1300 a 4 000 000 semillas esto va a depender de la especie (Banda et al., 2017). Pero, para que las semillas puedan germinar en condiciones naturales, es necesario que se relacionen con microorganismos, por lo general, hongos capaces de dirigir y transportar las fuentes de carbono hacia el embrión (Muriel et al., 2022).

2.3 *Epidendrum atacaoticum* Schltr.

La orquídea *Epidendrum atacaoticum* Schltr. fue descrita por primera vez por el botánico Rudolf Schlechter en 1921 en su viaje por Sudamérica publicado en su colección de *Orchidaceae*

of South America, crece en ambientes tropicales y se puede adaptar en condiciones extremas de clima, siendo necesario investigar una metodología de esterilización que sea efectiva y proporciones mayor viabilidad de semillas antes de su siembra *in vitro* (Ossenbach & Jenny 2019).

Esta orquídea también es conocida como la flor de Cristo, se caracteriza por crecer en bosques que presentan gran humedad a una altitud de 1500 a 3000 m.s.n.m., se puede adaptar en condiciones extremas de clima. Su período de floración es en el mes de mayo; sus flores son pequeñas de 6 mm en forma de racimo de color rosadas o lilas, cada inflorescencia puede crecer hasta 23 cm (Explorador de plantas, 2023).

Epidendrum atacazoicum es una orquídea endémica de la provincia del Azuay en Ecuador, las parroquias que contienen mayor cantidad de ejemplares son: Chaucha y Molleturo, a pesar de haber sido galardonada en un festival de Japón, no dispone de información relevante fuera de su taxonomía. La micropropagación de esta especie puede ser una herramienta importante para su conservación y propagación en condiciones controladas gracias a su capacidad de adaptación en diferentes climas (Ministerio de Turismo, 2017).

Tabla 2 Taxonomía de *E. atacazoicum* Schltr.

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Subfilo	Angiospermae
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Orchidaceae
Género	<i>Epidendrum</i> L.
Especie	<i>Epidendrum atacazoicum</i>

Fuente: WCVP, 2022.

2.4 Micropropagación *in vitro*

El cultivo de orquídeas presenta varias complicaciones entre ellas la baja tasa de germinación, sus dificultades en la sobrevivencia en estado natural y el establecimiento de las plantas (Benavidez & Hernández, 2021).

Para lograr que exista una germinación *in vitro* de orquídeas exitosa se requiere de métodos de desinfección de semillas óptimos para obtener cultivos libres de contaminación y viables; en el género *Epidendrum* debido al pequeño tamaño de las semillas resulta difícil su manipulación, se debe tener en cuenta la concentración y el tiempo de exposición del material vegetal al hipoclorito de sodio debido a que puede producir altos porcentajes de mortalidad o puede inhabilitar la muestra (Duarte et al.,2022).

La micropropagación de orquídeas en Ecuador también tiene un fuerte respaldo en la comunidad científica. La técnica proporciona una plataforma para investigar aspectos como la fisiología vegetal, hábitat, y, genética que ayuda a generar nuevos híbridos y a conservar especies amenazadas (da Silva, 2018).

2.4.1 Viabilidad de las semillas con tetrazolio

Una de las técnicas que se utilizan para medir la viabilidad de las semillas es el uso de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TTC) en donde las semillas se sumergen en una solución al 1% o al 2% por un tiempo determinado que puede ir de 45 minutos a 24 horas hasta que la solución penetre el embrión tiñéndole de un color rojo a las semillas que presenten actividad metabólica; gracias a la enzima deshidrogenasa que reduce la cantidad de sal presente en los tejidos vivos formando Formazan que indica si hay respiración mitocondrial haciendo que cambien de color, en el caso de las semillas muertas mantienen su color inicial (Salazar et al., 2020).

Esta prueba es una herramienta útil que se utiliza cuando se quiere determinar la capacidad germinativa de una semilla de manera rápida porque se obtiene resultados certeros en un corto tiempo sin causar daño al embrión (Salazar et al., 2020).

2.4.2 Protocolos de desinfección y siembra en medio de cultivo

Existe una gran variedad de protocolos de desinfección donde la mayoría utiliza hipoclorito de sodio en distintas concentraciones y tiempo, también se utiliza etanol al 70% o al 96% acompañado de detergentes o tensioactivos como el Tween 20 (Mamani et al., 2022).

El medio de cultivo que más se utiliza para la siembra de orquídeas es el de Murashige y Skoog 1962 en diferentes concentraciones, un agente gelificante (agar), en algunos casos se les agrega suplementos naturales como endospermo de coco, pulpa de plátano entre otros. También

se le añade fitorreguladores dependiendo del objetivo del cultivo como el ácido giberélico o el ácido indol-3-acético (Flores et al., 2017).

A continuación, se describen algunos protocolos de desinfección con hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones para comparar cuál es el tratamiento que tenga mayor viabilidad y siembra de diferentes tipos de orquídeas:

Se realizó un pretratamiento con hipoclorito de sodio en distintas concentraciones. Se sembraron aproximadamente 50 semillas de cada especie; la primera observación se hizo 15 días post siembra y cada ocho días evaluando el número de embriones que rompieron testa. El cultivo se realizó en el medio MS en el que se sembraron varias semillas, a las que se monitoreo. Para las semillas de *E. secundum* se esperó hasta que las cápsulas maduraran y abrieran, se aplicó tratamientos con hipoclorito permitiendo que la solución de tetrazolio ingrese al embrión y arroje resultados positivos.

En semillas de *E. ibaguense* los efectos fueron menores, debido a que el embrión es más delicado a la escarificación. En las diferentes etapas de desarrollo de *E. Secundum* y *E. ibaguense*, se observaron por un mes y 15 días. Para *E. ibaguense*, los embriones crecieron a los 8 días (Delgado Castro, 2019).

El factor que influye de manera directa es el tiempo de exposición de las semillas al NaClO, el objetivo fue evaluar la germinación *in vitro* de las especies *Brasiliorchis chrysantha*, *Cattleya cernua* y *Miltonia flavescens* durante 120 días en rangos de observación cada 40 por tres veces. Los protocolos de desinfección consistían en el uso de alcohol etílico al 70% v/v por un minuto y una dosis de 0.2% de NaClO se sumerge las semillas durante 5 minutos, posteriormente de un enjuague se vuelve a sumergir por 10 minutos (Frausto, 2017).

Recolectaron cápsulas maduras previas a la dehiscencia, en donde se extrajo todas las semillas que contenía la misma. Posteriormente se tomó una muestra de semillas de 5 mg que se colocaron en sobres de papel filtro y se desinfectaron en la cámara de flujo laminar. En condiciones asépticas. Para finalizar, se cultivó en cajas Petri con medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración.

El protocolo que presentó mejores resultados en relación con la germinación fue el que utilizó hipoclorito de sodio durante 5 minutos y la mayor mortalidad de semillas a los 10 minutos. Las especies *B. chrysantha* y *C. Cernua* fueron las que presentaron mayor susceptibilidad al tiempo de exposición al NaClO frente a las *M. flavescens* (Duarte, Da Vega, Ortiz, & Samudio, 2022).

En la búsqueda de mantener las semillas viables se investigan protocolos que no generen un gran impacto negativo como es el caso de *Laelia autumnalis* que es una orquídea endémica de México en peligro de extinción en su hábitat natural, para generar la conservación de esta especie se evaluó la efectividad de dos protocolos de desinfección la primera técnica consistía en inmersión directa en nitrógeno líquido, la germinación asimbiótica fue afectada por el hongo *Alternaria spp.*, el segundo experimento fue el uso de los desinfectantes CaClO₂ al 1% y en solución comercial al 15% (Pérez et al., 2019).

Las semillas de las orquídeas tienen un porcentaje de germinación que no supera el 5%. Se van a evaluar tres protocolos de desinfección en diferentes medios de cultivo para poder examinar la viabilidad y la germinación de *Zigopetalum maculatum*. Los tratamientos desinfectantes consisten en sumergir las semillas en 0.5% de NaClO por cinco minutos, la mitad se introdujo en sobres de té y la otra dentro de una jeringa, y la cápsula fue desinfectada en 1% de NaClO durante cinco minutos. El porcentaje de viabilidad de *Z. maculatum* fue de 68.7%.

Los tratamientos de desinfección en las semillas en sobres de papel y los frutos fueron similares, de 5 y 10% de contaminación en los medios. El mayor porcentaje de germinación fue 98% en el medio MS con 10% agua de coco y una desinfección de las semillas en sobre de té de 0.5% de NaClO durante cinco minutos (Sánchez et al., 2022).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Implementos de oficina

Se utilizó papel filtro para el pretratamiento de secado de las cápsulas y, para protocolos de desinfección; papel aluminio como base y protección para la cámara de flujo laminar porque evitó que las semillas se dispersen por la corriente de aire; también se usó para recubrir los materiales al esterilizarlos o al inactivar medios.

El Parafilm se utilizó para sellar las cajas Petri una vez colocado el medio y después de la siembra de semillas para evitar la contaminación en la cámara de crecimiento.

3.1.2 Reactivos

Se utilizó alcohol al 96% para el protocolo uno (P1), mientras que, para la desinfección de los materiales, la cámara de flujo laminar; y el protocolo dos (P2), se utilizó alcohol al 70%. Respecto al hipoclorito de sodio (NaClO), las concentraciones variaron por protocolos, al 0.2% para el primero y 3% para el segundo.

Se usó Tween 20 como parte del primer protocolo de desinfección y su uso fue limitado a gotas; también se utilizó para la limpieza de material. El agua destilada se usó para enjuagar las cápsulas y después semillas en los protocolos.

Se compró el Medio Murashige y Skoog “MS with vitamins” de Himedia basado en una búsqueda bibliográfica de un medio óptimo para el crecimiento y desarrollo de las semillas de orquídeas, en el caso del medio obtenido, no poseía cloruro de calcio (CaCl_2). Otros de los

reactivos que se utilizaron fueron: ácido clorhídrico 1N e hidróxido de sodio 1N para regular el pH del medio.

También se utilizó cloruro de tetrazolio (TTC) para generar una solución al 1% p/v para realizar las pruebas de viabilidad de las semillas.

3.1.3 Material vegetal

Las semillas de *Epidendrum atacazoicum* fueron extraídas de la localidad de Molleturo de coordenadas -2.7673346, -79.3930593 proporcionadas por Google Maps, con una diferencia de un mes. La planta, que tenía las cápsulas, presentaba su vara floral más de 90 días, se la examinó para ver si no presentaba alguna enfermedad; se consideró la pluviosidad del lugar y que 24 horas previas a su recolección no se presentaron lluvias.

La primera recolección corresponde al 31 de marzo del 2023, en condiciones óptimas con una tijera de podar esterilizada y bolsas Ziploc. La segunda recolección se realizó el 30 de abril del 2023, en las mismas condiciones.

Las cápsulas guardadas en bolsas Ziploc fueron transportadas hacia la ciudad de Cuenca. Para el pretratamiento se secaron a temperatura ambiente, sin luz solar directa y con el uso de papel filtro.

3.2 Métodos

3.2.1 Protocolo de extracción de semillas

Se realizó una desinfección externa con una solución de hipoclorito de sodio al 1% v/v durante 10 minutos, posteriormente se les roció alcohol etílico al 70% para proceder a introducir las en la cámara de flujo laminar. La cámara contenía un mechero y material esterilizado: pinzas, bisturí y cajas Petri; al igual que materiales de oficina: Parafilm y un marcador.

Se procedió a abrir las cápsulas con el bisturí y con ayuda de las pinzas se colocó las semillas extraídas en las cajas Petri, fueron selladas y rotuladas. Este procedimiento se realizó con las dos clasificaciones de cápsulas.

3.2.2 Prueba de viabilidad

Para determinar la viabilidad de las semillas se usó una muestra de 1 gramo de la población extraída del conjunto total de semillas. La prueba se hizo mediante la tinción con cloruro de tetrazolio. Se sumergieron en una solución de TTC al 1% p/v durante 2 horas para evaluar visualmente mediante estereoscopio la presencia de células viables que evidencien cambio de color.

Las semillas que se tiñeron de color rojo pasaron a la desinfección a través de los protocolos. Aquellas que presentaron el mismo color del inicio fueron descartadas porque no tener actividad metabólica.

3.2.3 Protocolos de desinfección de semillas

Las semillas de cápsulas extraídas para los dos procedimientos fueron: 800 miligramos de semillas secas y 1.40 gramos de semillas recién recolectadas; también se utilizó la misma cantidad para las semillas que pasaron por tetrazolio.

El primer tratamiento de desinfección consistió en colocar las semillas en tubos de ensayo de 10 mL y desinfectar con etanol al 96% por un minuto, posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.2% y 2 gotas de Tween 20 sumergir por 5 minutos, se enjuaga, y se vuelve a sumergir las semillas por 10 minutos acompañadas de agitación para generar movimiento entre la solución y las semillas, y finalmente enjuagarlas 5 veces con agua destilada estéril para eliminar el desinfectante (Duarte et al.,2022).

Se realizaron variaciones en comparación al presentado por Duarte y colaboradores (2022) en el cual el realizaba la desinfección de las semillas en papel filtro y con alcohol etílico al 70%.

El segundo protocolo consistió en: lavar las semillas mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 3% en tubos de ensayo de 10 mL, durante 15 minutos, posteriormente se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 10 minutos, se decantó la solución para extraer las semillas en un papel filtro dentro de la cámara de flujo laminar (Castañeda et al., 2020).

3.2.4 Siembra en la cámara de flujo laminar

Una vez desinfectadas las semillas y dentro de la cámara de flujo laminar, se colocaron en las cajas Petri con pinzas esterilizadas, la división de las semillas se realizó por sus características: tres cajas Petri de semillas de la primera recolección (secas) con el protocolo 1 (SP1) y protocolo 2 (SP2) y tres con tetrazolio STP1 y STP2, tres cajas Petri de las semillas de la segunda recolección con el protocolo 1 (RRP1) y con el segundo (RRP2) y tres con tetrazolio: RRTP1 y RRTP2. Estos procedimientos se realizarán dos veces para su análisis de resultados.

En cada caja Petri se colocó un peso aproximado de 0.20 gramos de semillas recién recolectadas, y, 0.15 gramos de semillas secas.

3.2.5 Cámara de crecimiento

La cámara de crecimiento se encuentra en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana matriz Cuenca en donde se procedió a colocar según su clasificación a las cajas Petri rotuladas en un área de una percha de metal, para su desarrollo en la cámara tiene condiciones controladas como: temperatura de 20.5 °C, mientras que la humedad era de 52%, 16 horas luz y 8 oscuridad.

Tabla 3 Distribución de las muestras en la cámara de crecimiento

RRP1	RRP1	RRP1	RRP1	RRP1	RRP1
RRP2	RRP2	RRP2	RRP2	RRP2	RRP2
RRTP1	RRTP1	RRTP1	RRTP1	RRTP1	RRTP1
RRTP2	RRTP2	RRTP2	RRTP2	RRTP2	RRTP2
SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1
SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2
STP1	STP1	STP1	STP1	STP1	STP1
STP2	STP2	STP2	STP2	STP2	STP2

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Se realizaron observaciones continuas después de 24 horas, 3 días, una semana, 15 días, un mes, y, 2 meses para revisar que no exista contaminación en las cajas y si presentaban poder descartarlas.

3.2.6 Metodología de observación microscópica

Se utilizó el Estereomicroscopio Greenough con zoom 8:1 ZEISS Stemi 508, gracias a su óptica apocromática, se pudo observar a detalle la germinación de las semillas y de esta manera se facilitó su conteo y se garantizó la integridad de la muestra puesto que este método no generó contaminación.

Se realizaron estas observaciones dos veces: a los 30 días después de haber sembrado y a los 2 meses para analizar si existe crecimiento y desarrollo en las muestras.

3.3 Diseño

El diseño de investigación para el problema planteado se basa en un diseño experimental puro para la evaluación de los protocolos de desinfección. Las características que presenta es el número de mediciones transversales, puesto que solo se medirá en un punto; el número de grupos de estudios compararán dos protocolos; la intervención del investigador es experimental porque se necesita saber cuál es el mejor tratamiento; el momento en que se recolectan los datos es prospectivo, el alcance de esta investigación es explicativo.

Respecto al protocolo que presente mayor poder germinativo y menor contaminación, la variable independiente es el protocolo a utilizar y la dependiente es el resultado respecto a su poder germinativo y a la contaminación.

Grupo control: semillas sembradas sin pasar por tetrazolio.

Grupo experimental: semillas que pasaron por la prueba de viabilidad por inmersión en cloruro de tetrazolio.

El diseño del experimento es de bloque completamente al azar (DBCA) para el conteo de muestras no contaminadas y otro para determinar el poder germinativo que evaluará por la cantidad de semillas germinadas.

Este diseño tiene dos variables de entrada: el tipo de cápsula que puede ser las cápsulas que pasaron por el pretratamiento de secado (S), o recién recolectadas (RR) y el tipo de protocolo que se va a utilizar: el tratamiento con hipoclorito al 0.2% (P1) y 3% (P2).

Unidad Experimental: 3 cajas Petri de 10 mL con medio de cultivo MS y semillas de *E. atacazoicum*.

Grupo control: semillas sin selección previa (RR y S).

Tipo de cápsula: seca con tetrazolio (ST) y recién recolectada después de la selección (RRT).

Protocolo de desinfección: P1 con NaClO al 0.2% y P2 con NaClO al 3%.

Niveles: 4.

Repeticiones: 2.

Las variables de salida que se van a analizar son dos: contaminación factor de salida cualitativo y semillas con poder germinativo como factor de salida cuantitativo.

El grupo de control servirá para verificar si la selección previa de las semillas influirá en la germinación. El diseño a realizar para analizar los dos factores de salida es el siguiente.

Tabla 4 Diseño de Bloque Completamente al Azar

TRATAMIENTOS		SALIDA	
		REP 1	REP2
P1	S	SP11	SP12
P2	S	SP21	SP22
P1	RR	RRP11	RRP12
P2	RR	RRP21	RRP22
TP1	S	STP11	STP12
TP2	S	STP21	STP22
TP1	RR	RRTP11	RRTP12
TP2	RR	RRTP21	RRTP22

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

3.3.1 Población y muestra

Población: conjunto total de semillas de *E. atacazoicum* disponibles.

Muestra: cajas Petri de 10 mL con medio de cultivo MS con semillas de *E. atacazoicum*.

Variable de entrada 1: tipo de cápsula (categoría).

Niveles: cápsulas secas (S) y cápsulas recién recolectadas (RR).

Variable de entrada 2: Es el tipo de protocolo de desinfección que se va a utilizar (categoría).

Niveles: P1 (NaClO al 0.2%) y P2 (NaClO al 3%).

Variable de salida 1: contaminación (categoría).

Niveles: se va a medir las cajas contaminadas de 0 a 3: no existe cajas Petri contaminadas sería el nivel 3; si solo presenta una caja contaminada se considera como leve en el nivel 2, en el caso de que haya dos cajas contaminadas estaría en el nivel 1 que es moderada, y, 0 valor máximo de muestras contaminadas.

Todo respecto a la contaminación de las cajas.

Variable de salida 2: semillas con poder germinativo (categoría).

Niveles: la variable de semillas germinadas es discreta porque solo se pueden tener números enteros.

3.3.2 Protocolos

Métodos de desinfección utilizados en el tratamiento de las semillas. Se tienen dos protocolos distintos:

Protocolo P1: utiliza NaClO al 0.2% para la desinfección de las semillas.

Protocolo P2: utiliza NaClO al 3% para la desinfección de las semillas.

Estos protocolos se aplican a las semillas contenidas en las unidades experimentales (3 cajas Petri) para determinar su efecto en las variables de salida, como la contaminación y el poder germinativo.

En el diseño del experimento, se tienen cuatro combinaciones posibles de protocolos y tipo de cápsula:

P1 con cápsulas pasadas por pretratamiento de secado (SP1).

P2 con cápsulas pasadas por pretratamiento de secado (SP2).

P1 con cápsulas recién recolectadas (RRP1).

P2 con cápsulas recién recolectadas (RRP2).

Estas combinaciones son las mismas que se utilizaron para las semillas que pasaron por tetrazolio lo que permite evaluar el efecto de los diferentes protocolos de desinfección en las semillas, tanto para las cápsulas secas como para las cápsulas recién recolectadas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de Datos

4.1.1 Protocolo de extracción de semillas

Las cápsulas que pasaron por el pretratamiento de secado presentaban un color marrón oscuro, hubo cambios en su forma alargada y el tamaño; se comprimió generando que las válvulas se empiecen a abrir esparciéndose unas pocas semillas en el papel filtro, las columnas no mostraron cambios significativos estaban intactas y la mayoría de las semillas se encontraban adheridas a la misma. El color de las semillas era de un color crema.

Las cápsulas de la segunda recolección tenían una apariencia de color verde oscuro brillante con una textura lisa y forma alargada, sus válvulas se encontraban cerradas completamente, en las columnas estaban todas las semillas adheridas a las mismas por lo que fue necesario utilizar pinzas y bisturí para su extracción. El color de las semillas era de color blancas.

4.1.2 Prueba de viabilidad

Después de dos horas, las semillas que se encontraban en los frascos ámbar empezaron a cambiar de color, las de la primera recolección no se tiñeron mucho, las de la segunda presentaron más semillas rojas. Posteriormente, se secó las semillas en el papel filtro para poder separar las regiones que tengan mayor cantidad de embriones viables y se les recolectaron en dos cajas Petri.

En el caso de las semillas que pasaron por el pretratamiento de secado se obtuvo 0.80 gramos de semillas viables, para el otro tipo de semillas se consiguió 1.40 gramos.

4.1.3 Protocolos de desinfección de semillas

Los protocolos se realizaron en tubos de ensayos cuando se puso los desinfectantes y para realizar los enjuagues se le pasó a un papel filtro; el primer protocolo de hipoclorito de sodio al 0.2%, alcohol etílico al 70%, y 2 gotas de Tween 20; lo que generó inconvenientes fue eliminar el detergente y evitar la pérdida de material vegetal. El tiempo y la concentración de NaClO no generó daños visibles en las estructuras de las semillas.

En el caso de las semillas inmersas por la solución de cloruro de tetrazolio tras pasar por los enjuagues, solo quedaron teñidos los embriones.

El segundo protocolo solo utilizó dos reactivos: hipoclorito de sodio al 3% y etanol al 70%, este proceso no presentó inconvenientes y sus enjuagues fueron más sencillos; también se colocó en papel filtro, no existió gran pérdida de material vegetal.

Las semillas que pasaron por la solución de TTC también perdieron su color rojizo, solo quedó teñido el embrión.

4.1.4 Siembra en la cámara de flujo laminar

Las semillas después de pasar por los protocolos de desinfección fueron colocadas en la cámara de flujo laminar para que se sequen y poder sembrarlas en el medio de cultivo MS. Para su siembra se utilizó unas pinzas estériles y se tomó en cuenta todas las normas de asepsia respectivas.

No existió problemas en la siembra en ningún protocolo, ni en el tipo de semillas. El único inconveniente fue la pérdida de material vegetal que se quedó adherido en el papel filtro.

4.1.5 Cámara de crecimiento

En la cámara de crecimiento se observó si se presentaba muestras contaminadas y el desarrollo de las semillas:

En la observación después de las 24 horas no había cambios en los medios ni en las semillas. A los 3 días las semillas se asentaron en el medio ya no se movían, no se visualizó crecimiento de colonias de bacterias.

Después de la primera semana se visualizó crecimiento de contaminación en los medios, fue la observación que presentó mayor cantidad de pérdida de muestras, se descartó 6 cajas Petri.

A los 15 días solo se separó 2 cajas Petri por contaminación, no se visualizó cambios en las semillas ni en el medio.

En el primer mes se revisó las cajas Petri en el estereomicroscopio y las semillas no se notaba un cambio en su morfología, no hubo presencia de contaminación.

En el segundo mes también se revisó las muestras por el estereomicroscopio y ya se presentó crecimiento en las semillas, varias de ellas ya tenían ruptura de testa y otras ya habían germinado. Solo se descartó una caja Petri.

En la siguiente tabla se describe el total de cajas Petri que no presentaron contaminación durante los dos meses de observación.

Siendo tres el valor máximo de muestras sin contaminación y 0 la ausencia de cajas Petri válidas.

Tabla 5 Presencia de contaminación en las muestras

TRATAMIENTO		REP 1	REP 2
SEMILLAS	PROTOCOLO	CONTAMINACIÓN	CONTAMINACIÓN
RR	P1	3	0
RR	P2	2	3
RRT	P1	2	3
RRT	P2	3	3
S	P1	3	1
S	P2	2	2
ST	P1	3	3
ST	P2	3	3

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

4.1.6 Observación por el estereomicroscopio

Se realizaron dos observaciones para poder revisar el desarrollo de las semillas y si presentan algún cambio en su morfología.

Al primer mes se realizó una observación, pero no presentó gran cambio en las estructuras de las semillas. Las muestras que habían pasado por la solución de tetrazolio se podían identificar de una manera rápida el embrión. Sin embargo, las semillas no tenían un color rojo intenso como en el día 1.

Al segundo mes se observó por el estereoscopio otra vez y varias semillas cambiaron a color verde, otras presentaban ruptura de testa, las muestras que fueron rotuladas con RRT y ST ya no se podía observar rastros de color rojo, pero, si tenían de un color más oscuro el embrión.

Tabla 6 Conteo de semillas germinadas

TRATAMIENTO		REP 1	REP 2
SEMILLAS	PROTOCOLO	CONTEO	CONTEO
RR	P1	19	0
RR	P2	23	4
RRT	P1	4	12
RRT	P2	11	11
S	P1	1	0
S	P2	16	16
ST	P1	29	56
ST	P2	90	16

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

En la tabla se puede observar que el pretratamiento de secado de las cápsulas sí afectó en el poder germinativo porque fueron las muestras con mayor número de semillas germinadas. Mientras que en el caso de las semillas de las cápsulas recién recolectadas hubo muestras donde no existió crecimiento ni desarrollo.

4.2 Presentación de Datos

4.2.1 Comparación de las semillas con pretratamiento de secado en relación con las muestras contaminadas

Para realizar esta comparación se aplicó la prueba de Fisher que sirve para identificar si existe alguna relación entre dos variables cualitativas y las muestras son pequeñas. Por lo cual, se diseñó una comparación entre: las semillas de las cápsulas que pasaron por el pretratamiento de secado y se realizó la prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio y las que no fueron inmersas en la solución de TTC.

Se realizó en *RStudio*:

Las hipótesis se plantearon de la siguiente manera para el test de Fisher:

H0: Existe diferencia significativa según el tipo de semillas. H1 No existe diferencia significativa entre los grupos de semillas. Valor alfa de 0.05

Ilustración 1 Resultado de test Fisher relación semillas secas y la contaminación de las muestras en R

```
> resultado_fisher  
  
Fisher's Exact Test for Count Data  
  
data: tabla  
p-value = 0.9286  
alternative hypothesis: two.sided
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Después de aplicar esta prueba se rechaza la hipótesis nula porque el valor p es mayor que el de alfa que es de 0.05%. El p -valor obtenido en la prueba de Fisher es mayor que el umbral de significancia establecido.

Por lo tanto, no hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, y no se puede afirmar que exista una diferencia significativa entre los grupos de semillas. Sin embargo, se puede decir que el tipo de semillas son similares.

4.2.2 Comparación de las semillas recién recolectadas en relación con las muestras contaminadas

Los grupos que se compararon fueron las semillas recién recolectadas que fueron sumergidas en solución de TTC y las que no pasaron por este proceso.

H0: Existe diferencia significativa según el tipo de semillas.

H1: No existe diferencia significativa entre los grupos de semillas. Valor alfa es de 0.05.

Ilustración 2 Resultado de test Fisher relación semillas recién recolectas y la contaminación de las muestras en R

```
Fisher's Exact Test for Count Data  
data: tabla  
p-value = 0.4642  
alternative hypothesis: two.sided
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

El p-valor obtenido es de 0.4642, lo que significa que la probabilidad de obtener los datos observados o más extremos bajo la hipótesis nula (que hay diferencia significativa entre los grupos de semillas) es del 46.42%.

Dado que el p-valor (0.4642) es mayor que el valor alfa establecido (0.05), no hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, se puede aceptar la hipótesis alternativa, que afirmaba que no existe una diferencia significativa entre los grupos de semillas. Los resultados son similares por el tipo de las semillas.

4.2.3 Comparación de las semillas en relación con las muestras contaminadas

Los grupos que se compararon fueron las semillas pasadas por el tratamiento de secado y las semillas recién recolectadas.

H0: No existe diferencia significativa según el tipo de semillas.

H1: Existe diferencia significativa entre los grupos de semillas.

Valor alfa es de 0.05.

Ilustración 3 Resultado de test Fisher relación semillas recién recolectas y secadas y contaminación de las muestras en R

```
Fisher's Exact Test for Count Data  
  
data:  tablaa  
p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

No hubo diferencias significativas entre los grupos de semillas tratadas con el protocolo de secado y las semillas recién recolectadas. Sin embargo, un p-valor de 1 puede deberse a diversos factores, como errores en el análisis, en nuestro caso se podría decir que el tamaño de la muestra puesto que es muy pequeño, que hace que aceptemos la hipótesis alternativa de que el tipo de las semillas son iguales por eso un valor de 1.

También se comparó las semillas que pasaron por el pretratamiento de secados y las que fueron recolectadas después sumergidas en TTC.

H0: No existe diferencia significativa según el tipo de semillas.

H1: Existe diferencia significativa entre los grupos de semillas.

Valor alfa es de 0.05.

Ilustración 4 de test Fisher relación semillas recién recolectas con TTC y secadas, y, la contaminación de las muestras en R

Fisher's Exact Test for Count Data

```
data: tabla  
p-value = 0.9206  
alternative hypothesis: two.sided
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Un p-valor de 0.92 indica que la probabilidad de obtener los datos observados o más extremos bajo la hipótesis nula (que hay diferencia significativa entre los grupos de semillas) es del 92%. No hay evidencia estadística suficiente para afirmar que existen diferencias significativas entre los dos grupos de semillas comparados. En este caso, los datos no proporcionan evidencia para afirmar que no hay una diferencia significativa entre los grupos de semillas.

También se comparó las semillas que pasaron por el pretratamiento de secado, y las que pasaron por la prueba de viabilidad con las recién recolectadas.

H0: Existe diferencia significativa según el tipo de semillas.

H1: No existe diferencia significativa entre los grupos de semillas.

Valor alfa es 0.05.

Ilustración 5 de test Fisher relación semillas secas con TTC, las recién recolectadas, y, la contaminación de las muestras en R

Fisher's Exact Test for Count Data

```
data: tablas  
p-value = 0.6309  
alternative hypothesis: two.sided
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Un p-valor de 0.6309 indica que la probabilidad de obtener los datos observados o más extremos bajo la hipótesis nula (que hay diferencia significativa entre los grupos de semillas) es del 63.09%. Los resultados sugieren que no hay evidencia estadística suficiente para afirmar que existen diferencias significativas entre los grupos de semillas comparados.

La última comparación que se hizo fue relacionada con las semillas que pasaron por la prueba de viabilidad de cloruro de tetrazolio entre semillas de la primera recolección y la segunda.

H0: Existe diferencia significativa según el tipo de semillas. H1: No Existe diferencia significativa entre los grupos de semillas. Valor alfa es de 0.05.

Ilustración 6 de test Fisher relación semillas que pasaron por prueba de viabilidad, y, la contaminación de las muestras en R

```
Fisher's Exact Test for Count Data

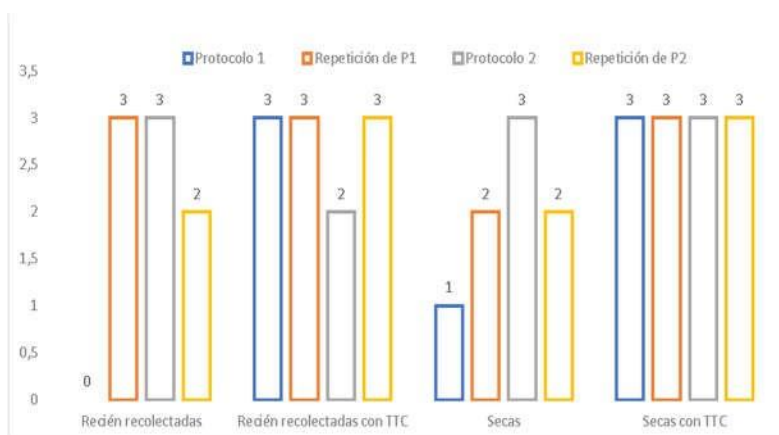
data:  tablaw
p-value = 1
alternative hypothesis: two.sided
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Los resultados sugieren que no hay evidencia estadística suficiente para afirmar que existen diferencias significativas entre los grupos de semillas comparados en cuanto a su viabilidad. Un p-valor de 1 puede deberse al tamaño de la muestra, dando como resultado que los dos grupos de semillas son iguales.

Para una mejor interpretación visual, se realizó un diagrama de barras para identificar cuáles son las semillas con menos muestras contaminadas.

Ilustración 7 de barras del tipo de semillas en relación a la contaminación



Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Las semillas en responder mejor al procedimiento fueron las de la primera recolección las cuales pasaron por la prueba de viabilidad de cloruro de tetrazolio, con un 100% de cajas sin presentar contaminación. Las semillas que no pasaron por una selección previa son las que más contaminación presentó, es decir, 4 cajas de 12. Se descartó que represente el 66.66%.

4.2.4 Comparación de los protocolos en relación con las muestras contaminadas

Se comparó el protocolo 1 que tiene hipoclorito de sodio al 0.2% y el protocolo 2 que contiene NaClO al 3%, se realizó la prueba de Fisher:

Hipótesis

Hipótesis Nula: El protocolo de desinfección con hipoclorito de 0.2% no es igual que el protocolo de hipoclorito de 3%.

Hipótesis Alternativa: El protocolo de desinfección con hipoclorito al 0.2% es igual que el protocolo de hipoclorito de 3%.

Ilustración 8 Resultado de test Fisher relación protocolos y contaminación de las muestras en R

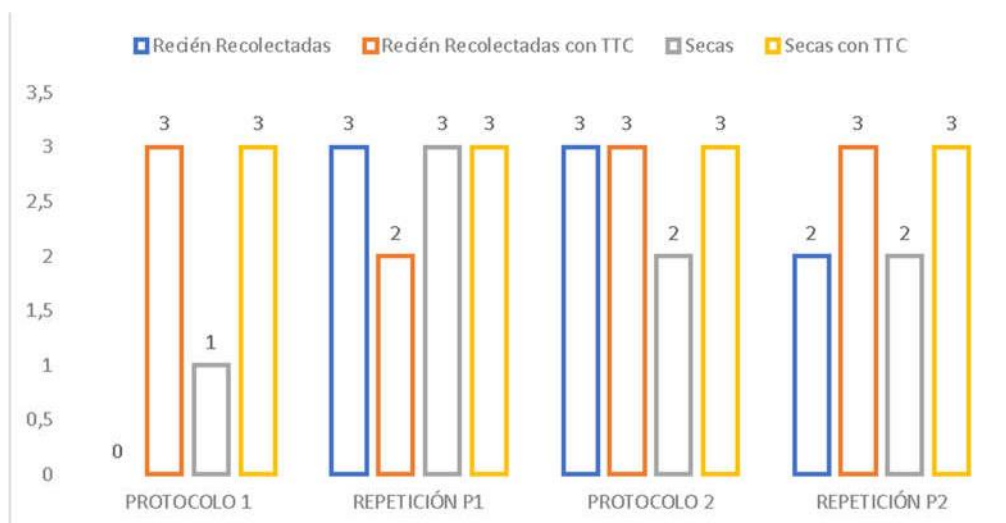
```
Fisher's Exact Test for Count Data
data:  tablap
p-value = 0.9673
alternative hypothesis: two.sided
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Los protocolos no presentan una diferencia significativa, lo que permite que se acepte la hipótesis alternativa porque el valor-p es de 0.96, mayor que alfa de 0.05.

También se analizó los protocolos mediante un gráfico de barras para identificar cuál fue el tratamiento que presentó menor cantidad de muestras contaminadas.

Ilustración 9 Gráfico de barras de los protocolos en relación a la contaminación



Elaborado por: Las Autoras, 2023.

La gráfica informa que el protocolo 2 tiene mayor efectividad en las dos repeticiones que el primer protocolo al reportar 21 cajas de 24, solo se contaminaron 3 muestras, lo que da una efectividad del 87.5% en relación al tratamiento con hipoclorito de sodio al 0.2% que tiene 18 muestras sin contaminación, siendo el 75% efectivo.

4.2.5 Conteo de semillas germinadas por muestra

Después de haber obtenido todos los valores de las semillas germinadas por muestra se utilizó *RStudio* para realizar las pruebas estadísticas.

Se determinó los factores: tipo de semillas (S y RR) y tratamientos (P1 y P2). También las hipótesis:

Hipótesis nula (H0): No existe diferencias significativas entre los tratamientos.

Hipótesis alternativa (H1): Existe diferencias significativas entre los tratamientos.

Se realizó ANOVA para poder identificar si existe alguna diferencia significativa entre las medias de los protocolos y el tipo de semillas que se están comparando:

Ilustración 10 ANOVA en RStudio

```
aov(formula = CONTEO ~ TRATAMIENTOS + SEMILLAS)

Terms:
          TRATAMIENTOS SEMILLAS Residuals
Sum of Squares      272.25  4353.50   3599.25
Deg. of Freedom         1         3         11

Residual standard error: 18.0888
Estimated effects may be unbalanced
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Para poder interpretar se realizó un resumen de ANOVA para identificar los grados de libertad que son los valores independientes que pueden estar variando; valor F que ayuda a encontrar diferencias significativas entre las medias de los grupos.

Ilustración 11 de ANOVA en RStudio

```

          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TRATAMIENTOS  1    272   272.2    0.832 0.3812
SEMILLAS      3   4354  1451.2    4.435 0.0283 *
Residuals    11   3599   327.2
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

En el caso de las semillas se acepta la hipótesis alternativa porque existe una diferencia significativa, por lo que es necesario analizar este factor. En cambio, los tratamientos no afectan significativamente en los resultados.

Se aplicó Tukey para obtener un resultado exacto, veraz y confiable para ver si realmente afecta el tipo de semilla utilizado.

Este método se realiza debido a que nuestro valor de p fue 0.05 y en las semillas se arrojó un valor de 0.02. Se va a analizar el tipo de semilla que se va a utilizar:

RR: Recién recolectada y S: las que pasaron por pretratamiento de secado y la letra T indica la presencia de la prueba de viabilidad con TTC.

Para este análisis se plantean las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H0): No existe diferencias significativas entre las semillas.

Hipótesis alternativa (H1): Existe diferencias significativas entre las semillas.

Ilustración 12 Test de Tukey en R.

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

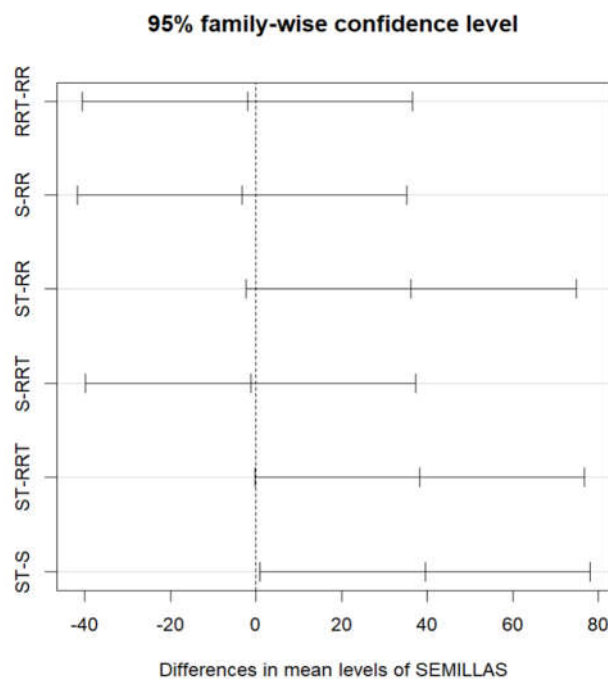
Fit: aov(formula = CONTEO ~ TRATAMIENTOS + SEMILLAS)

$SEMILLAS
      diff      lwr      upr      p adj
RRT-RR -2.00 -40.4942547 36.49425 0.9985526
S-RR   -3.25 -41.7442547 35.24425 0.9939060
ST-RR  36.25  -2.2442547 74.74425 0.0668465
S-RRT  -1.25 -39.7442547 37.24425 0.9996441
ST-RRT 38.25  -0.2442547 76.74425 0.0516122
ST-S   39.50   1.0057453 77.99425 0.0438640
```

Elaborado por: Las Autoras, 2023.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Ilustración 13 Test de Tukey



Elaborado por: Las Autoras, 2023.

En esta comparación se puede denotar que las similitudes entre los diferentes pares y combinaciones de semillas posibles denotan que solo las semillas que fueron secadas y tratadas con o sin tetrazolio tiene diferencias significativas al resto de combinaciones.

Es decir, que las semillas presentan un impacto significativo en comparación a los tratamientos de desinfección en relación al conteo germinativo, pues dependerá del tipo de cápsula utilizada y si las semillas han sido sometidas previamente a una selección mediante la prueba de TTC.

4.3 Discusión

Al igual que los estudios realizados por Elizalde y colaboradores (2016) se puede denotar que la prueba de tetrazolio se correlaciona con la viabilidad de las semillas gracias a su relación

con la actividad de las enzimas deshidrogenasas de los tejidos vivos que catalizan la respiración mitocondrial, sin embargo, al momento de la germinación no se puede determinar si influye este compuesto debido a que también es influenciada por más factores como por ejemplo: la temperatura, el medio, los componentes de desinfección, etc.

Se puede destacar que las condiciones de análisis de nuestro estudio difieren por el tipo de la planta, y, el enfoque del análisis, debido a que aparte del estudio con tetrazolio, se analizó la influencia de otros protocolos y los tiempos de colecta diferenciados por años.

Dentro de los protocolos de desinfección se pudo destacar que con una mayor concentración de hipoclorito de sodio y alcohol etílico ejercen mayor poder desinfectante; respecto al primer componente, se encontraron discrepancias con el estudio de Sánchez, Pinedo y Coaquira (2022) y Billard, Dalzotto y Lallana (2022), puesto que, en su caso a mayor concentración, de hipoclorito efectuaba menor poder germinativo.

Sin embargo, en este caso no se observa influencia debido a que no hay diferencia estadística frente a los protocolos con diferente concentración de NaClO. Se podría decir que las diferencias entre los estudios se pueden dar debido al pretratamiento de las cápsulas, al tiempo de recolección, a la metodología, y, a la composición de los medios de cultivo.

La siembra en medio Murashige y Skoog con vitaminas no necesito de ningún añadido especial para que se presentara poder germinativo como pasó en el caso de Pinedo Panduro y colaboradores (2022) explican que la sencillez de este medio permitió un excelente desarrollo, en el cual germinaron en mayor cantidad de semillas en comparación a las de la primera recolección; demostrando que para el desarrollo de los embriones también se debe dar importancia al

pretratamiento de secado. En el caso de ambos estudios la inferencia era el tipo de *Epidendrum* a usar. No obstante, ambos arrojaron buenos resultados respecto al medio de cultivo MS.

Se puede destacar que las limitaciones de análisis que presenta nuestro estudio respecto a los otros se deben al tipo específico de planta utilizada, puesto a que existen escasos datos y estudios de *Epidendrum atacazoicum* y la información que usamos de base es aquella que presenta características u objetivos similares al género *Epidendrum* o a la familia Orchidaceae.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Las principales implicaciones que se encontró en el estudio fueron las siguientes: identificar cuál fue el mejor protocolo de desinfección para las semillas, si existió algún impacto la selección previa mediante la prueba de viabilidad con TTC, influencia de la concentración de NaClO.

Los resultados de los dos protocolos de desinfección explican que ambos tratamientos tienen una efectividad superior al 60%. Sin embargo, el que presentó un mejor resultado fue el que utilizó NaClO al 3% por 15 minutos teniendo una eficacia del 87.5% en relación a la presencia de contaminación.

En cuanto al poder germinativo de las semillas no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos protocolos. No obstante, el que demostró ligeramente mayor cantidad de semillas germinadas fue el mismo que presentó menor cantidad de muestras contaminadas. Es decir, aquellas que fueron expuestas a un pretratamiento de secado.

En el caso de la prueba de viabilidad con TTC fue relevante en el momento de analizar la germinación de las semillas porque las que fueron inmersas en cloruro de tetrazolio germinaron 191 semillas en comparación a las que no se les realizó este procedimiento que solo fue de 33 semillas germinadas.

La concentración de hipoclorito de sodio no influye en los protocolos de desinfección. Sin embargo, se debe de tener en cuenta los otros reactivos que se utilizó como es el caso del alcohol

etílico porque en el protocolo con NaClO al 0.2% se utilizó etanol al 96% y también se añadió Tween 20; en el segundo tratamiento de desinfección se empleó alcoholetílico al 70% y se tuvo menor cantidad de muestras contaminadas.

La metodología que se utilizó fue óptima para el desarrollo de los protocolos, no se presentó inconvenientes relevantes. Sin embargo, se debería de tener en cuenta la complejidad de los tratamientos, la concentración y el tiempo de exposición de hipoclorito de sodio para que exista un equilibrio entre la eliminación de contaminación y que no haya pérdida de la viabilidad de las semillas. Otro factor relevante es el estado del material vegetal.

Es necesario tener en cuenta la importancia ecológica, cultural y económica de la orquídea *Epidendrum atacazoicum* Schltr., puesto que es necesario regular la recolección de material vegetal para que no sea una amenaza para la flora silvestre y sea sostenible; si se va a realizar de manera comercial se necesita generar la participación de comunidades locales (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016)

Otra de las implicaciones políticas es impulsar el ecoturismo de la provincia, gracias a que la orquídea flor de Cristo se encuentra en reservas naturales y de manera silvestre, ayuda a promover el turismo mediante excursiones y senderismo, generando que haya un buen manejo por parte de las comunidades y de los visitantes para que exista la conservación de esta especie (Macías y Gutiérrez, 2018).

Los protocolos de desinfección de las semillas ayudan a garantizar que al momento de realizar un cultivo *in vitro* presente menor cantidad de muestras contaminadas lo que podría ayudar a la propagación de *Epidendrum atacazoicum* Schltr., contribuyendo a su desarrollo y la conservación de esta especie endémica del país.

5.2 Recomendaciones

Uno de los mayores problemas fue la manipulación de la semilla por el tamaño, buscar un método más viable del secado del material vegetal de la cámara de flujo laminar porque en el papel filtro se adhieren las semillas haciendo que sea difícil su manipulación.

Al momento de realizar la prueba de viabilidad de cloruro de tetrazolio se tiene que realizar en tubos de ensayos o frascos ámbar que sea fácil su manejo y acompañarlo con movimiento para permitir que el TTC penetre en las semillas para que puedan cambiar de color.

Para mejores resultados en el conteo de semillas germinadas se necesita un mayor tiempo en la cámara de crecimiento. Para la recolección de datos de las muestras contaminadas se puede realizar después de la primera semana de siembra porque es un tiempo prudente para que se puedan desarrollar las colonias. Pasado las seis semanas reduce considerablemente las cajas Petri contaminadas.

6 REFERENCIAS

Billard, C.E., Dalzotto, C.A., & Lallana, V.H. (19 de septiembre de 2013). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *oncidium*. Obtenido de: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200008

Chávez, J., Andrade, M., Juárez, P., Villegas, O., Sotelo, H., & Perdomo, F. (2018). *EVALUACIÓN DE TRES SISTEMAS DE CULTIVO in vitro PARA LA MULTIPLICACIÓN DE MICROCORMOS DE GLADIOLO*. Revista fitotecnia mexicana, 41(4-A), 5 https://www.researchgate.net/publication/329670772_EVALUACION_DE_TRES_SISTEMAS_DE_CULTIVO_in_vitro_PARA_LA_MULTIPLICACION_DE_MICROCORMOS_DE_GLADIOLO.

Cox, L., Sageth, J., & Pérez, A. (2020). *Diversidad y uso de las orquídeas*. Researchgate.net. https://www.researchgate.net/publication/342727642_Diversidad_y_uso_de_las_orquideas

Delgado Castro, D. (Noviembre de 2019). *EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO Epidendrum (ORCHIDACEAE), CUNDINAMARCA, COLOMBIA*. Obtenido de <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/35949/DelgadoCastroDianaPaola2019.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

DPL News. (2023, enero 30). Ecuador | *El sector agrícola se fortalecerá con tecnología e innovación*. DPLNews. <https://dplnews.com/ecuador-el-sector-agricola-se-fortalecera-con-tecnologia-e-innovacion/>

Duarte, E. R., Da Vega, L., Ortiz, L. M., Samudio, A., & Küppers, G. (2022). *Evaluación de la germinación de semillas de orquídeas según el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio*. *Innova Biology Sciences*, 2(2), 24-34. <https://doi.org/10.58720/ibs.v2i2.42>

Elizalde, V., García, J. R., Peña-Valdivia, C. B., Ybarra, M. C., Leyva, O. R., & Trejo, C. (2016). Viabilidad y germinación de semillas de *Hechtia perotensis* (Bromeliaceae). Recuperado el 26 de julio del 2022, de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v65n1/0034-7744-rbt-65-01-00153.pdf>

Endara, L., Hirtz, A., Jost, L., Reynolds, A., Neubig, K., Hagsater, E., Phillip, C., Simpson, N., Cornejo, X. 2017. *Epidendrum atacazoicum*. En: León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, C. Ulloa y H. Navarrete (Eds). Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. <<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Epidendrum%20atacazoicum>>, acceso domingo, 16 de julio de 2023.

Epidendrum atacazoicum. (s/f-a). Naturalista Costa Rica. Recuperado el 23 de julio de 2023, de <https://costarica.inaturalist.org/taxa/900008-Epidendrum-atacazoicum>

Epidendrum atacazoicum. (s/f-b). Ipni.org. Recuperado el 23 de julio de 2023, de <https://www.ipni.org/n/91274-2>

Epidendrum atacazoicum. (s/f-c). iNaturalist Ecuador. Recuperado el 23 de julio de 2023, de <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/900008-Epidendrum-atacazoicum>

Escobar, L. (2021, diciembre 1). *Estos son los 10 productos que más se han exportado desde Ecuador en lo que va del 2021*. El Universo.

<https://www.eluniverso.com/noticias/economia/estos-son-los-10-productos-que-mas-se-han-exportado-desde-ecuador-en-lo-que-va-del-2021-nota/>

Esquerre, B., Delgado, E., Rojas, C., Vásquez, C., & Kuethe, J. (2022). *Micropropagation and Germplasm Conservation of Ficus americana Aubl. and F. obtusifolia Kunth from Lambayeque (Peru)*. Colombia forestal, 26(1), 92–108. <https://doi.org/10.14483/2256201x.19114>

Flores Hernández, L. A., Robledo-Paz, A., & Jimarez-Montiel, M. J. (2017). *Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas*. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 8(6), 1315–1328. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i6.297>

Frausto Jaime, K. A. (Septiembre de 2017). *MORFOGÉNESIS in vitro EN LAS ORQUÍDEAS Phalaenopsis spp. (Blume) Y Cattleya spp. (Lindley)*. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/21384/1/1080313993.pdf>

Galería Bioweb Ecuador. (s/f). Bioweb.bio. Recuperado el 23 de julio de 2023, de <https://bioweb.bio/galeria/FotoEspecimen/Epidendrum%20atacazoicum/447476/1/25/Material%20tipo>

Gómez, N. (2021, marzo 30). *¿Qué son las orquídeas? Características y significados*. El Español. https://www.elespanol.com/curiosidades/naturaleza-planeta-tierra/orquideas-caracteristicas-significados/509699308_0.amp.html

Grupo Alaire. (2022, marzo 14). Ecuador y sus principales productos de exportación. Grupo Alaire. <https://grupoalaire.com/comercio-exterior/ecuador-y-sus-principales-productos-de-exportacion/>

Guevara Rosero, J. M., Leyva Vásquez, N. C., & Caicedo Rosero, D. M. (2019). *The orchids, a sustainable alternative for the development of ecotourism. Case study, Carchi province, Ecuador*. SATHIRI, 14(2), 300. <https://doi.org/10.32645/13906925.911>

Guo, Y. et al. (2020). *Micropropagación de la orquídea Dendrobium nobile mediante desinfección de semillas con etanol e hipoclorito de sodio*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 140, 345-352.

Harris Valle, C., Landero Benavidez, I., Alvarado Vázquez, J. F., & Hernández Gómez, R. (13 de Agosto de 2021). *Germinación de orquídeas utilizando un método sencillo y económico*. Obtenido de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342021000500915

Hernández Amasifuen, A. Díaz., Argüelles Curaca, A., Cortez Lázaro, A. A., & Díaz Pillasca, H. B. (2020). *EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS IN VITRO UTILIZANDO COTILEDONES DE ROCOTO (CAPSICUM PUBESCENS RUIZ & PAV.)*. The Biologist, 17(2). <https://doi.org/10.24039/rtb2019172368>

León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, C. Ulloa Ulloa y H. Navarrete (Eds). 2019. Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. <<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo>>, acceso domingo, 16 de julio de 2023.

Macías, A. E. S., & Gutiérrez, K. S. R. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador. Revista ECOVIDA, 8(1), 64–83. <https://revistaecovida.upr.edu.cu/index.php/ecovida/article/view/127/html>

Mamani Sánchez, B., Nova Pinedo, M., & Espinal Coaquira, J. A. (2022). *Germinación in vitro de Zigopetalum maculatum con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo*. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, 9(2), 26–36. <https://doi.org/10.53287/szsf1344ls18k>

Mamani, B., Muriel, A., M., & Nova, M. (2022). *Germinación in vitro de Epidendrum secundum con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco*. Acta Nova, 10(3), 345–359. http://www.scielo.org/bo/scielo.php?pid=S1683-07892022000100345&script=sci_arttext

Mazza, G. (2023). *Orchidaceae*. Monaco Nature Encyclopedia. <https://www.monaconatureencyclopedia.com/orchidaceae/?lang=es>

Mite, M., & Oña, E. (2018). *Diversidad de Orquídeas de los Bosques Deciduo y Siempre Verde Estacional en Manabí*. Rev. Hallazgos21, 3(2), 154–164.

Muruaga, N. B., & Parrado, M. F. (2019). *Epidendrum bermejoense (Orchidaceae), especie nueva del noroeste de la Argentina y sur de Bolivia*. Lilloa, 54–63. <https://doi.org/10.30550/j.lil/2019.56.1/4>

Ministerio del Ambiente del Ecuador "Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030, primera edición, noviembre de 2016, Quito-Ecuador

Ministerio de Turismo. (2017). *Orquídea ecuatoriana triunfa en Tokio-Japón* – Gob.ec. Recuperado de Gob.ec – el 23 de julio de 2023, de <https://www.turismo.gob.ec/orquidea-ecuatoriana-triunfa-en-tokio-japon/>

Oña, C. (2020). *Germinación asimbiótica en condiciones in vitro de Oncidium pentadactylon y Elleanthus capitatus: orquídeas nativas del Ecuador*. *Edu.ec*. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8769/1/146094.pdf>

Ortiz, M., & Bonilla, M. (2018). *Identificación del género: Epidendrum*. Researchgate.net. https://www.researchgate.net/publication/329223116_Identificacion_del_genero_Epidendrum

Pérez, Á. J., Romoleroux, K., Zapata, N., Cevallos, D., Yela, H., Jost, L., & Tobar, F. (2020). *Nuevo registro, redescubrimiento y notas taxonómicas de Orchidaceae de Ecuador*. *Neotropical Biodiversity*, 6(1), 88–97. <https://doi.org/10.1080/23766808.2020.1752097>

Pérez, U. F. G., Pedraza-Santos, M. E., Salgado-Garciglia, R., Palacios, A., Bárcenas, A. T. C., & Arnao, M. T. G. (2019). *Efectividad de métodos para desinfectar semillas de Laelia autumnalis para la conservación en nitrógeno líquido*. *Nova Scientia*. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i23.1855>

Pinedo Panduro, M., Alves Chagas, E., Freitas Luz, F., Panduro Tenazoa, N. M., Cardoso Chagas, P., Bardales Lozano, R., . . . Collazos Saldaña, H. (06 de Diciembre de 2022). *Efecto de las sales de los medios de cultivo Murashige & Skoog y Knudson sobre el establecimiento in vitro de Epidendrum schomburgkii Lindl*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-87062022000300005&script=sci_arttext

Quintero, P. A. T., & Rosero, A. F. (2020). *Cultivo in vitro en orquídea Cattleya quadricolor con fines de aprovechamiento económico para una comunidad en el corregimiento de Felidia, municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia*. instname:Universidad Autónoma de Occidente. <http://red.uao.edu.co/bitstream/10614/12229/5/T09059.pdf>

Redacción, B. S. F. (2022, septiembre 6). *ECUADOR: El centro del mundo de las orquídeas*. Baleares Sin Fronteras. <https://www.baleares-sinfronteras.com/2022/09/06/ecuador-el-centro-del-mundo-de-las-orquideas/>

Rivero, A. (2020). *Vista de Diversidad y distribución de los endemismos de Asteraceae (Compositae) en la Flora del Ecuador*. Csic.es. <https://collectaneabotanica.revistas.csic.es/index.php/collectaneabotanica/article/view/283/401>

Salazar Mercado, S. A., Quintero Caleño, J. D., & Bustos Urbano, V. J. (2020). *Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de Raphanus sativus L.* Revista Facultad de Ciencias Básicas, 15(2), 7–15. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3831>

Salazar Mercado, S. A., Quiteño Caleño, J. D., & Bustos Urbano, V. J. (16 de Noviembre de 2020). *Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de Raphanus sativus L.* Obtenido de <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/3831/4414>

Sánchez, B. P., Pinedo, M. L. N., & Coaquira, J. A. E. (2022). *Germinación in vitro de Zigopetalum maculatum con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo*. Revista de investigación e innovación agropecuaria y de recursos naturales, 9(2), 26-36. <https://doi.org/10.53287/szsf1344ls18k>

The World Checklist of Vascular Plants (WCVP), (2022). *Epidendrum atacaicoicum Schltr.* in Govaerts, R. In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, D. R. Hernández Robles, C. A. Plata Corredor, T. Stjernegaard Jeppesen, A. Örn, L. Vandepitte, D. Hobern, P. Schalk, R. E. DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, J. Abbott, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, et al., *Catalogue of Life Checklist* (10.0). The Royal Botanic Gardens, Kew., <https://doi.org/10.48580/dfs-4nz>

Zabala, V., & Ekos, A. (2019, febrero 1). *Ecuador es el tercer exportador mundial de flores*. *Ekos Negocios*. <https://ekosnegocios.com/articulo/ecuador-es-el-tercer-exportador-mundial-de-flores>

Zambrano-Cuadro, N. G., Armas-Cedeño, G. I., Núñez-Muñoz, J. L., & Pio-Salazar, J. (2021). *Conservación de Orquídeas: caso “Sacha Wiwa”, Parroquia de Guasaganda - Cantón La Maná - Provincia de Cotopaxi – Ecuador*. *UTCiencia*, 6(3), 160–171. <http://investigacion.utc.edu.ec/revistasutc/index.php/utciencia/article/view/319/294>

7 ANEXOS

Tabla 7 Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog 1962

Componentes	Concentración (mg/L)
NO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂	332.2
MgSO ₄	180.7
KH ₂ PO ₄	170
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O	37.26
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
MnSO ₄ . H ₂ O	16.90
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Glycine	2
Myoinositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxina HCl	0.5
Thiamina HCl	0.1

Fuente: Fernández y Díaz, 2020.



Ilustración 14 Caja Petri con semillas germinadas

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 15 Semillas obtenidas de las cápsulas

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 16 Semillas después de realizar la prueba de TTC

Fuente: Las Autoras, 2023.

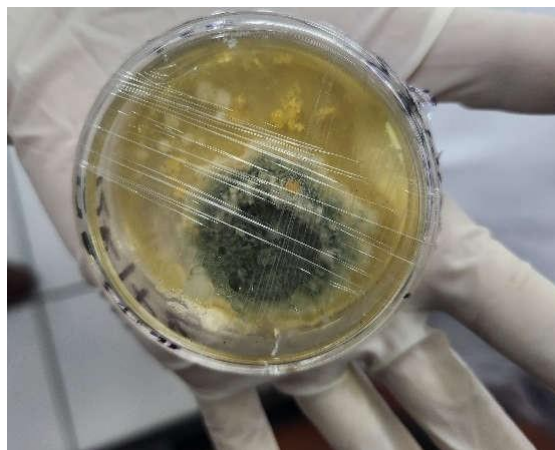


Ilustración 17 Muestra contaminada

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 18 frascos ámbar para la prueba de viabilidad

Fuente: Las Autoras, 2023.

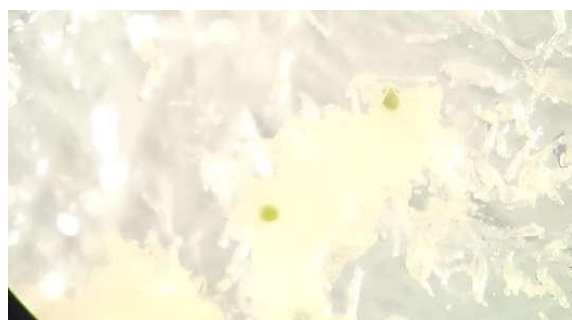


Ilustración 19 semillas germinadas vistas por el estereoscopio

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 20 Muestra de semillas con TTC

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 21 Semillas secas germinadas vistas desde el estereoscopio

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 22 Muestra después de dos meses de siembra

Fuente: Las Autoras, 2023.

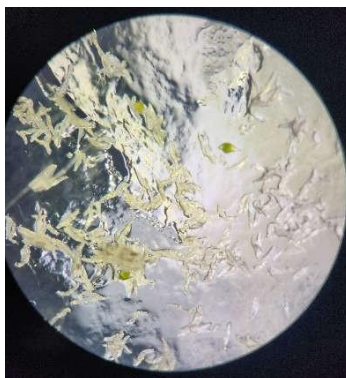


Ilustración 23 Muestra de semillas recién recolectadas después de dos meses

Fuente: Las Autoras, 2023.

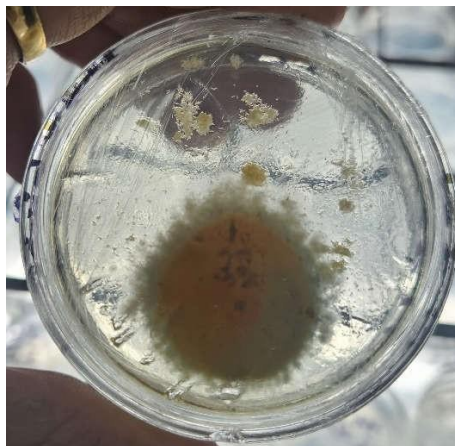


Ilustración 24 Caja Petri que presenta contaminación

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 25 Muestra de semillas secas después del primer mes

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 26 Muestra del Protocolo 1 después de dos meses

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 27 Muestra del protocolo 2 después de dos meses

Fuente: Las Autoras, 2023.

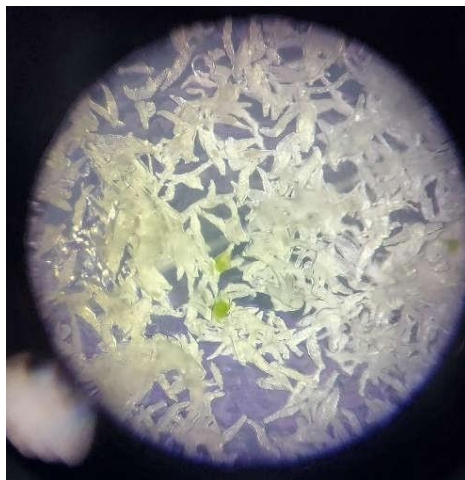


Ilustración 28 Semillas germinadas de la muestra de Recién recolectadas

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 29 Semillas recién recolectadas del protocolo 1

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 30 Semillas con TTC después de dos meses

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 31 Muestra de semillas sin crecimiento

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 32 Muestra de semillas sin poder germinativo después de dos meses

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 33 Semillas con TTC sin germinación después de dos meses

Fuente: Las Autoras, 2023.

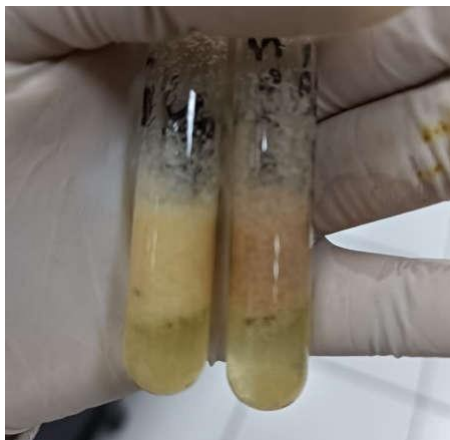


Ilustración 34 Comparación de protocolos entre semillas con TTC y sin selección previa

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 35 Tallo y hojas de Epidendrum

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 36 Vara floral de Epidendrum

Fuente: Las Autoras, 2023.



Ilustración 37 Preparación de semillas para protocolo de desinfección

Fuente: Las Autoras, 2023.