



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**INDUCCIÓN *IN VITRO* A LA POLIPLOIDÍA EN *Caucaea pichincae*
(*Orchidaceae*), MEDIANTE EL USO DE COLCHICINA**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR: CHÁVEZ PÁEZ CARLA VANESA
VARGAS CALLE DAYELI ELIZABETH**

TUTOR: CERNA CEVALLOS MARCO FERNANDO

**Quito-Ecuador
2023**

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Dayeli Elizabeth Vargas Calle con documento de identificación N° 1750317438 y Carla Vanesa Chávez Páez, con documento de identificación N° 1723256606; manifestamos que:

Somos los autores 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, 15 de febrero del año 2024

Atentamente,



Dayeli Elizabeth Vargas Calle

1750317438



Carla Vanesa Chávez Páez

1723256606

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

Nosotras, Dayeli Elizabeth Vargas Calle con documento de identificación No. 1750317438 y Carla Vanesa Chávez Páez con documento de identificación No. 1723256606, 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: “Inducción *in vitro* a la poliploidía en *Caucaea pichincae* (Orchidaceae), mediante el uso de colchicina”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras 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, 15 de febrero del año 2024

Atentamente,



Dayeli Elizabeth Vargas Calle

1750317438

Carla Vanesa Chávez Páez

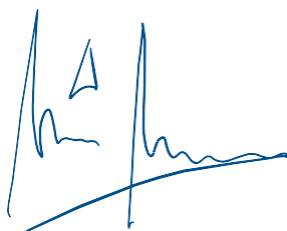
1723256606

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: INDUCCIÓN *IN VITRO* A LA POLIPLOIDÍA EN *Caucaea pichincha* (*Orchidaceae*), MEDIANTE EL USO DE COLCHICINA, realizado por Dayeli Elizabeth Vargas Calle con documento de identificación N° 1750317438 y por Carla Vanesa Chávez Páez con documento de identificación N° 1723256606, 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.

Quito, 15 de febrero del año 2024

Atentamente,



Ing. Marco Fernando Cerna Cevallos, PhD.

0501872071

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a Dios por permitirme culminar con excelencia este trabajo de investigación, por haberme ayudado a superar cada obstáculo, tropiezo y dificultad que se me presentó a lo largo de toda mi vida, después de varios años aprendí que con perseverancia, constancia y fe podemos alcanzar nuestros objetivos.

Gracias a mis padres, Julio Vargas y Anthonia Calle, quienes me forjaron como la persona que soy actualmente, por su amor incondicional, paciencia y bondad que me dan a diario, gracias por dame tanto de todo, por cada palabra de aliento y motivación para continuar y no rendirme en el transcurso de mi vida, que con su ejemplo y dedicación pude llegar a este punto de mi carrera, sin su ayuda no hubiese sido posible este trabajo. A mi hermana Nathalia Vargas quien me enseñó a nunca bajar los brazos aun cuando el camino sea muy complicado, a mi sobrino Levin Apolo, por su compañía y por toda la felicidad que me ha brindado desde que llegó a este mundo.

A mis amigos por estar siempre a mi lado, Jairo Huilca, Adriana Amaguayo y Lizeth Granda, con quienes he disfrutado de grandes momentos y, sobre todo, a mi amiga y compañera de tesis, Carla Chávez, con quien compartí nuevos desafíos, los mismos que nos motivaron a crecer profesionalmente.

A todos, mi mayor agradecimiento y gratitud.

Dayeli Vargas

La presente tesis está dedicada a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto, darme salud para poder cumplir mis objetivos y brindarme su bondad y amor, a mi madre Verónica Páez quien fue y sigue siendo el pilar fundamental de todo este trayecto al siempre brindarme una palabra de aliento y el impulso necesario para seguir adelante, eres la razón de mi existir, mi principal apoyo, no hay palabras suficientes para expresar lo mucho que te admiro mamá, gracias por nunca dejarme sola, a mi padre Carlos Chávez quien fue el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, por ser el mayor ejemplo de perseverancia, por sus consejos, valores, enseñanzas y por forjarme a ser la persona que soy hoy en día, gracias por su amor incondicional y por siempre enseñarme a valorar el resultado de un gran esfuerzo, mis logros siempre serán los suyos, a mi hermana Liseth Chávez por ser como una madre para mí por siempre protegerme y estar siempre a mi lado como una amiga, gracias por tu confianza y por ver en mí un apoyo como yo lo veo en ti, a mis abuelitos Marcelo Páez, Angelita Páez y Clara Chulde porque después de mis padres fueron las personas que más se preocuparon por mí, gracias por enseñarme cosas vitales en mi vida que me encaminaron por el mejor sendero, a mi hermana Victoria Chávez que con sus ocurrencias, alegra los días de todas las personas que la tenemos, gracias por el amor tan genuino que me brindas, a Marco Alulema por darme el aliento necesario para seguir adelante, principalmente en los momentos difíciles que tuve que atravesar, sin él no hubiera podido culminar este proyecto.

Un agradecimiento especial a mi amiga y compañera de tesis Dayeli Vargas, que además de haber sido una excelente compañera, ha sido una amiga con quien he compartido grandes vivencias. gracias a su responsabilidad, empeño y paciencia hemos logrado sacar adelante este proyecto.

A todos infinitas gracias.

Carla Chávez

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por darnos la fortaleza, coraje y valentía para seguir adelante. A nuestras familias quienes son nuestra mayor motivación para no rendirnos, nuestros guías para lograr nuestros objetivos y quienes nos han apoyado incondicionalmente durante toda nuestra vida estudiantil. A todos ustedes les agradecemos desde el fondo de nuestro corazón, gracias por permitirnos ser parte de su orgullo.

Además, un agradecimiento especial al grupo de investigación Nunkui Wakan por el financiamiento del proyecto, ya que su aporte invaluable ayudó en el desarrollo de esta tesis.

A la Ingeniera Elizabeth Yugsi y a Henry Solís quienes fueron un gran apoyo en el trayecto de nuestra investigación experimental.

Debemos agradecer de manera especial a nuestro tutor de proyecto, al PhD Marco Cerna, por su dirección, apoyo y confianza para la realización de esta tesis, por su orientación en nuestra formación como investigadoras, destacando por encima de todo, su paciencia, rectitud y disponibilidad que hizo esta experiencia muy enriquecedora e inolvidable.

Les agradecemos con todo nuestro ser.

Dayeli Vargas y Carla Chávez

Resumen

La inducción de poliploidía es uno de los procedimientos más empleados en el área de citogenética, biología molecular y celular para el mejoramiento de plantas en condiciones *in vitro*, sin embargo, a pesar de los múltiples beneficios que brinda esta técnica, ninguna especie del género *Caucaea* ha sido realmente expuesta a la Colchicina o algún otro tipo de químico para mejorarlas genéticamente. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue desarrollar protocolos para la inducción *in vitro* a la poliploidía en individuos de la especie *Caucaea pichincha* mediante el uso de Colchicina. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana. Como material vegetal se utilizaron protocormos en proceso de desdiferenciación de la especie *Caucaea pichincha*, los mismos que fueron expuestos a tres concentraciones de Colchicina (0,05 %, 0,10 % y 0,2 %) y a cuatro tiempos de exposición (24, 48, 72 y 96 horas). Se utilizó un diseño factorial completamente al azar con arreglo factorial 3x4, los datos obtenidos fueron analizados mediante un modelo ANOVA conjuntamente con una prueba de Turkey para la comparación de las medias, donde se pudo determinar que la viabilidad de protocormos se vio altamente afectada tanto por el tiempo de exposición como por la concentración. Asimismo, se utilizó una prueba de Chi cuadrado para evidenciar el desarrollo de poliploidía en la especie. Los resultados indican que protocormos testigos mantenidos solo con agua destilada estéril, no presentaron cambios citogenéticos ($2x=10$), mientras que los que fueron expuestos con 0,05 %, 0,10 % y 0,20 % de Colchicina por 24 horas y con 0,10 % de exposición por 48 horas, mostraron células poliploides ($2x=20$), sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición a 72 y 96 horas con concentraciones mayores a 0,1 %, los protocormos en proceso de desdiferenciación presentaron muerte celular proporcional o completa en su tejido. Por último, para la visualización y el conteo cromosómico en *Caucaea pichincha*, se inició con una fase de pretratamiento, fijación,

hidrólisis y finalizando con una doble tinción, logrando observar el aumento de los cromosomas en la especie.

Palabras clave: *in vitro*, colchicina, poliploidía, conteo cromosómico.

Abstract

Polyploidy induction is one of the most used procedures in the area of cytogenetics, molecular and cellular biology for the improvement of plants under *in vitro* conditions; however, despite the multiple benefits that this technique provides, no species of the *Caucaea* genus has actually been exposed to Colchicine or some other type of chemical to genetically enhance them. For this reason, the objective of this research was to develop protocols for the *in vitro* induction of polyploidy in individuals of the species *Caucaea pichincha* through the use of Colchicine. The research was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory of the Salesiana Polytechnic University. As plant material, protocorms in the process of dedifferentiation of the species *Caucaea pichincha* were used, which were exposed to three concentrations of Colchicine (0.05%, 0.10% and 0.2%) and four exposure times (24, 48, 72 and 96 hours). A completely randomized factorial design with a 3x4 factorial arrangement was used. The data obtained were analyzed using an ANOVA model together with a Turkey test for the comparison of means, where it was determined that the viability of protocorms was highly affected by both exposure time and concentration. Likewise, a Chi square test was used to demonstrate the development of polyploidy in the species. The results indicate that control protocorms maintained only with sterile distilled water did not present cytogenetic changes ($2x=10$), while those that were exposed with 0.05%, 0.10% and 0.20% Colchicine for 24 hours and with 0.10% exposure for 48 hours, they showed polyploid cells ($2x=20$), however, when the exposure time increased to 72 and 96 hours with concentrations greater than 0.1%, the protocorms in the process of dedifferentiation presented proportional or complete cell death in its tissue. Finally, for visualization and chromosome counting in *Caucaea pichincha*, it began with a phase of pretreatment, fixation, hydrolysis and ending with a double staining, managing to observe the increase in chromosomes in the species.

Keywords: *in vitro*, colchicine, polyploidy, chromosome count.

Índice de contenidos

1.	Introducción.....	1
2.	Marco Referencial	3
2.1.	Familia Orchidaceae	3
2.1.1.	Importancia de la familia Orchidaceae	4
2.2.	Género <i>Caucaea</i>	5
2.2.1.	Descripción morfológica de la especie <i>Caucaea pichincha</i> Szlach. y Kolan.....	6
2.2.2.	Taxonomía del género <i>Caucaea</i>	7
2.3.	Modificación genética en cultivo <i>in vitro</i> de Orquídeas	8
2.3.1.	Cultivo <i>in vitro</i>	8
2.3.1.1.	Evaluación de semillas de orquídeas	8
2.3.1.2.	Fases de micropropagación <i>in vitro</i>	9
2.3.2.	Modificaciones genéticas.....	11
2.3.2.1.	Inducción a la Poliploidía	11
2.3.2.2.	Hibridación	14
2.3.2.3.	Transgénesis.....	14
2.3.2.4.	Variación somaclonal.....	14

3.	Materiales y métodos.....	16
3.1.	Obtención y procesamiento de la muestra.....	16
3.2.	Cultivo <i>in vitro</i>	16
3.2.1.	Viabilidad en semillas de <i>Caucaea pichincae</i>	16
3.2.2.	Desinfección de semillas	17
3.2.3.	Preparación de medios de cultivo	18
3.2.4.	Siembra <i>in vitro</i>	19
3.2.5.	Inducción a la poliploidía	20
3.2.5.1.	Evaluación de la colchicina	20
3.2.5.2.	Aplicación de colchicina.....	22
3.2.6.	Visualización cromosómica.....	22
4.	Resultados y Discusión.....	25
5.	Conclusiones.....	37
6.	Recomendaciones	38
7.	Bibliografía.....	39

8.	Anexos:.....	49
----	--------------	----

Índice de figuras

Figura 1 Descripción morfológica de <i>Caucaea pichincha</i> Szlach. y Kolan	7
Figura 2 Proceso de micropropagación <i>in vitro</i>	11
Figura 3 Viabilidad de semillas de <i>Caucaea pichincha</i>	17
Figura 4 Desinfección de semillas de <i>Caucaea pichincha</i> mediante la técnica de la jeringa	18
Figura 5 Preparación del medio <i>Knudson C Modified Plus Orchid</i>	19
Figura 6 Siembra <i>in vitro</i> de semillas de <i>Caucaea pichincha</i>	20
Figura 7 Aplicación de colchicina a protocormos en proceso de desdiferenciación de <i>Caucaea pichincha</i>	22
Figura 8 Métodos empleados para la visualización cromosómica en <i>Caucaea pichincha</i> ...	23
Figura 9 Porcentaje de viabilidad de semillas de <i>Caucae pichincha</i> a partir de la prueba de tetrazolio	26
Figura 10 Germinación de semillas de <i>Caucaea pichincha</i>	27
Figura 11 Porcentaje de viabilidad de protocormos en proceso de desdiferenciación en <i>Caucaea pichincha</i>	29
Figura 12 Número de cromosomas en <i>Caucaea pichincha</i> sin Colchicina.....	33

Figura 13 Número final de cromosomas en *Caucaea pichincha* con Colchicina 34

Figura 14 Presencia de poliploidía en *Caucaea pichincha* 36

Índice de tablas

Tabla 1 Dosis y tiempo de exposición en tratamiento de Colchicina en protocormos en proceso de desdiferenciación de <i>Caucaea pichincha</i>	21
Tabla 2 Prueba de Turkey en la viabilidad de protocormos en proceso de desdiferenciación en <i>Caucaea pichincha</i>	30
Tabla 3 Análisis de varianza de la concentración y tiempo sobre la viabilidad de protocormos en proceso de desdiferenciación de <i>Caucaea pichincha</i>	31
Tabla 4 Análisis de Chi cuadrado en relación a la concentración y tiempo de exposición de la Colchicina en protocormos en proceso de desdiferenciación de <i>Caucaea pichincha</i>	35
Tabla 5 Protocormos en proceso de desdiferenciación viables después de la siembra realizada a través de la técnica de la jeringuilla.....	49

Índice de anexos

Anexo 1 Recolección de capsulas de la especie *Caucaea pichincha*; **Error! Marcador no definido.**

1. Introducción

Ecuador es uno de los países que cuenta con la mayor biodiversidad alrededor del mundo, esto debido a que posee un mosaico de microclimas (Gutiérrez y otros, 2014), a los distintos espacios naturales, a sus características topográficas, grado altitudinal (0 a 6300 m), intensa radiación solar (Varela y Ron, 2022) y a la extensa riqueza biológica (Bravo, 2014); por tales motivos, se afirma que Ecuador se posiciona como un país que presenta una gran diversidad de Orquídeas, las mismas que se encuentran distribuidas por sus distintos ecosistemas (Boletín Bioamazonía, 2019).

Las orquídeas se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo, especialmente en zonas cálido-húmedas, estas plantas se caracterizan principalmente por sus exuberantes fragancias, sus diversas formas y colores de sus flores, las cuales generalmente son hermafroditas (Oña, 2020; Paredes, 2012). Además, hoy por hoy Ecuador cuenta con el 15.8% de especies de orquídeas a nivel mundial, superando a Colombia que posee el 14% (Oña, 2020).

Actualmente, Ecuador está adoptando el cultivo de orquídeas para aumentar y mejorar la actividad económica del país y lograr un reconocimiento turístico nacional e internacional (Paredes, 2015). Es así, que gracias a la variedad de especies de la familia Orchidaceae el Ministerio de Turismo en 2013, declara a Ecuador como el “País de las Orquídeas”.

Por otro lado, se están implementando y desarrollando técnicas, métodos y/o programas para aquellas especies que se encuentran vulnerables y en peligro de extinción (Gómez, 2019). Uno de los métodos más empleados en los últimos años, ha sido el mejoramiento genético por medio de cultivo *in vitro*, el mismo que ha servido para aumentar y mejorar la eficiencia de los cultivos

económicamente importantes como es el de las orquídeas (Carrodeaguas y otros, 2022; Hernández, 2018).

La inducción de poliploidía es uno de los procedimientos más empleados en el área de citogenética, biología molecular y celular para el fitomejoramiento genético de plantas en condiciones *in vitro* (Molero y otros, 2018), ya que se ha observado cambios tanto en la morfología como en la citología de las especies (Gómez, 2019). Esta técnica altera el número cromosomal de especies vegetales mediante el uso de agentes antimitóticos como la colchicina, dando como resultado el surgimiento de nuevos caracteres tanto morfológicos como fisiológicos (plantas mucho más grandes con mayor vigor, mejoran sus cualidades nutritivas, aumentan el tamaño de hojas, flores, frutos y otro tipo de órganos) (Osorio y Arzate, 2022; Gómez, 2019), en consecuencia, según Molero y Matos (2008), afirman que el desarrollo de individuos poliploides “ha permitido aumentar la capacidad competitiva, el éxito reproductivo y la tolerancia ecológica respecto a sus progenitores”.

A pesar de los múltiples beneficios que brinda el empleo de la técnica de inducción a la poliploidía para el mejoramiento de plantas de interés, ninguna especie del género *Caucaea* ha sido realmente expuesta a la colchicina o algún otro tipo de químico para mejorarlas genéticamente, sin embargo, se han hecho investigaciones de estandarización de protocolos para el cultivo *in vitro* en esta especie, como por ejemplo el trabajo propuesto y realizado por Cevallos y Saltos (2022).

Por tal motivo, la realización de esta técnica en la orquídea *Caucaea pichincae*, se plantea como una opción viable para la obtención de especies mejoradas en el Ecuador.

2. Marco Referencial

2.1. Familia Orchidaceae

El origen de la familia Orchidaceae, se remonta hace 65 millones de años de antigüedad incluso antes que el hombre, ya que se han encontrado restos fósiles de estas flores (Elicriso, 2023). El nombre orquídea proviene del griego “orkhis” que significa testículo, debido a la forma que poseen los pseudobulbos de la especie, además, este término se usó por primera vez por Teofrasto quien era un filósofo de la antigua Grecia (Losada, 2017). Asimismo, Orchidaceae se considera una de las familias de plantas que posee flores muy diversas ubicadas en todos los continentes del planeta Tierra, ya que de acuerdo con los datos de The Plant List (2023), esta familia cuenta con 899 géneros, 71.391 especies de los cuales 27.801 son nombres de especies aceptadas.

Las orquídeas se encuentran en el grupo de plantas monocotiledóneas que se diferencian por presentar hojas con nervios no ramificados y sus semillas contienen un solo cotiledón, estas se consideran como la familia más extensa de plantas con flor, además muestran una variedad de colores y formas; sin embargo, presentan una morfología común, ya que todas poseen un pétalo modificado muy llamativo el cual se identifica como labelo, el mismo que atrae al polinizador (Oña, 2020).

Otra de las características en común que tienen es que sus raíces son muy carnosas, tienen una coloración verde por la fotosíntesis que realizan y su función principal es brindar soporte a la planta (Ruiz, 2020). Por otro lado, las raíces aéreas son envueltas por una estructura de color blanco o gris denominada velamen, la cual tiene como función principal la absorción del agua para proteger a la planta de la sequedad, esta estructura se caracteriza por presentar varias

capas de células gruesas que tienen la capacidad de absorber humedad (Educalingo, 2024). Finalmente, la corola de la orquídea se distingue por presentar tres sépalos, dos pétalos y un labelo, que es la estructura donde se posa el insecto polinizador (Hermano, 1959).

El Ecuador gracias a las expediciones botánicas que Estados Unidos y Suecia realizaron después de la Segunda Guerra Mundial, es considerado como el país que contiene la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial ya que supera a países como Colombia, Perú y Brasil (Caizatoa y Manobanda, 2021), siendo un factor importante las condiciones climatológicas y físicas que el país presenta como la diversidad de hábitats y climas que se da gracias a la altura de las cordilleras andinas y además el encuentro de la corriente cálida “El niño” y la corriente fría “Corriente de Humboldt” (Paredes y Guapisaca, 2019). A medida que el tiempo avanza se siguen descubriendo especies nuevas de esta familia gracias al trabajo de los botánicos, al Herbario Nacional del Ecuador y se ha ido incrementando el número de especies en esta zona (Salinas, 2005).

2.1.1. Importancia de la familia Orchidaceae

En la antigüedad el interés de las orquídeas se centraba en el uso de los frutos de la vainilla, ya que esta es la única especie de orquídeas que produce frutos comestibles (Peñaloza y otros, 2023), a pesar de ello, en la actualidad las orquídeas presentan un gran interés por su belleza, siendo importantes para embellecer el hogar además de ser utilizadas para adornar coronas y guirnaldas que usan los peregrinos, quienes visitan el santuario Chalma en México, siendo la especie más usada *Laelia autumnalis* (Emeterio y otros, 2016). Sahagun (1975), documenta medicinalmente a las orquídeas, ya que estas pueden actuar para calmar la tos, la mala digestión, heridas infectadas además de ser un gran desinflamatorio y mitigador de la fiebre.

Las orquídeas son especies que no solo son importantes por servir como plantas ornamentales, comestibles o medicinales, sino también por tener una relación estrecha con animales, aves, insectos e incluso otras plantas, ya que atraen a su polinizador mediante los colores, formas y fragancias llamativas que presentan, como por ejemplo las formas parecidas que tienen a algunos insectos con el objetivo de que estos se confundan para que tengan interacción con las flores y se obtenga así la polinización y formación de las semillas (Téllez y Tejeda, 2018), sin embargo, los usos que se dan a este género ha sido un motivo de amenaza contra estas especies ya que se realiza una tala indiscriminada de los bosques y por lo cual varias de estas se encuentran en peligro de extinción (Miranda, 2014). Los incendios forestales, la sobre recolección y la apertura de carreteras son las principales razones de amenaza que afecta la conservación de las orquídeas, sin embargo, en la actualidad existen herramientas biotecnológicas que ayudan a su preservación como lo es el cultivo *in vitro*, conservación *ex situ* de material vegetal, entre otros (Loaiza y Oliveros, 2021).

2.2. Género *Caucaea*

El género *Caucaea* incluye alrededor de 20 especies distribuidas por Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela; siendo Ecuador, el país con la mayor diversidad observada para este género (Szlachetko y Kolanowska, 2015); hasta la fecha, en The Plant List (2023), se encuentran 23 especies registradas del género *Caucaea*, pero solo 9 de ellas son aceptadas.

Es relevante destacar que, hace años, el género *Caucaea* era considerado un taxón monoespecífico o un único taxón con ocho divisiones, generalmente sus especies suelen crecer tanto en bosques nubosos andinos montañosos, como en bosques montanos fríos y húmedos, frecuentemente por encima de los 2500 m s.n.m (Szlachetko y Kolanowska, 2015).

En varias ocasiones, los géneros de orquídeas *Caucaea* y *Oncidium* han sido objeto de mucho

debate, debido a las diferencias fenotípicas y las similitudes en la morfología superficial de las flores en ambos géneros (Szlachetko y Kolanowska, 2015), a pesar de ello, Neubig y otros (2011), realizaron un análisis molecular y confirmaron que existe una distancia filogenética entre el género *Caucaea* con el género *Oncidium*.

2.2.1. Descripción morfológica de la especie *Caucaea pichincae* Szlach. y Kolan

El género *Caucaea* se caracteriza por la presencia de pseudobulbos de forma ovoides o cilíndrica que miden aproximadamente 1,8 centímetros, rodeadas en la parte superior por 1 a 3 brácteas foliares y 2 hojas conduplicadas, estas hojas son lineales y lanceoladas que miden 2,7 centímetros de ancho y 42 centímetros de largo aproximadamente, suele tener inflorescencias en zig-zag, los sépalos laterales están parcialmente fusionados dejando los pétalos y los sépalos dorsales libres; los sépalos miden 15 milímetros de largo y 7,5 milímetros de ancho, el estigma es grande, cóncavo, generalmente elíptico y el ginostemio es ligeramente arqueado de 2 a 3 veces más largo que la antera (Szlachetko y Kolanowska, 2015) Ver Figura 1.

Caucaea pichincha Szlach. y Kolan

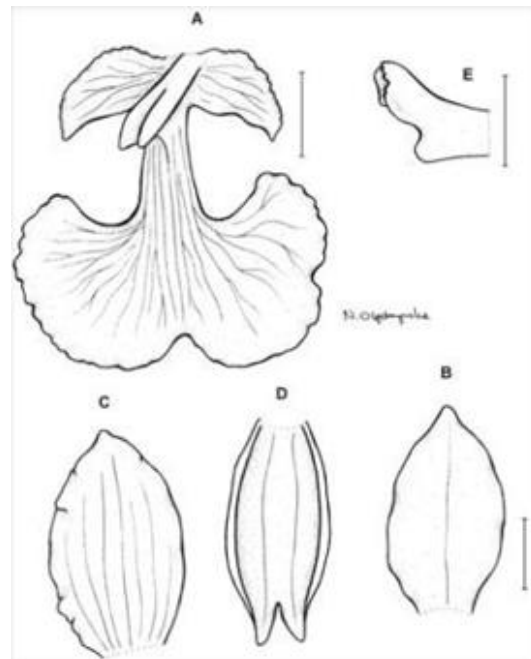


Figura 1 Descripción morfológica de *Caucaea pichincha* Szlach. y Kolan

Nota: Descripción morfológica (A: labelo, B: sépalo dorsal, C: pétalo, D: sépalo lateral, E: ginostemo. Barra de escala = 5 mm, dibujado por N. Ołędzińska)

Fuente: (Szlachetko y Kolanowska, 2015)

2.2.2. Taxonomía del género *Caucaea*

La taxonomía del género *Caucaea* de acuerdo a la APG IV (2023) se describe de la siguiente manera: Reino: Plantae, División: Tracheophyta, Clado: Monocotiledoneas, Orden: Asparagales, Familia: Orchidaceae, género: *Caucaea*

Mientras que, el género *Caucaea* en Tropicos (2023) se describe de la siguiente manera:

Clase: Equisetopsida, Orden: Asparagales, Familia: Orchidaceae, Género: *Caucaea*

2.3. Modificación genética en cultivo *in vitro* de Orquídeas

2.3.1. Cultivo *in vitro*

Las técnicas *in vitro* son procedimientos que se realizan con la finalidad de conseguir mejoras a nivel tanto morfológico como fisiológico y a la propagación masiva de especies vegetales en menor tiempo, además, son una herramienta indispensable que se emplea con éxito para mejorar los niveles de comercialización de especies ornamentales, medicinales, hortícolas, entre otras (Rodríguez, 2018).

El cultivo *in vitro* ha sido una de las técnicas más empleadas en los últimos años, ya que ha tenido un impacto significativo en la conservación de especies que se encuentran en peligro de extinción, vulnerables, endémicas o que son de importancia agrícola y comercial como las orquídeas (Rodríguez, 2018). Este procedimiento se realiza en laboratorios bien equipados, bajo métodos de esterilización y en condiciones controladas (humedad, temperatura, pH, luz, nutrientes, oxígeno, entre otros) (Duque, 2019; Magrini y otros, 2019).

2.3.1.1. Evaluación de semillas de orquídeas

- **Viabilidad de semillas de orquídeas**

Las semillas son el órgano principal en la reproducción de la mayoría de las plantas, independientemente de su finalidad, ya sea que se siembren para la producción agrícola o se preserven en bancos de germoplasma, la información sobre la viabilidad de las semillas y las características fisiológicas juegan un papel muy importante en el rendimiento de los cultivos (Salazar y Botello, 2018).

La productividad de los cultivos siempre ha dependido de la calidad de las semillas, por tal motivo, se han utilizado y desarrollado pruebas o métodos para evaluar su viabilidad (Neubig

y otros, 2011). Dentro de los métodos más utilizados por varios años ha sido la prueba de Tetrazolio (TZ), según Mancipe y otros (2018), “es un método bioquímico basado en las reacciones de las deshidrogenasas”, que reduce la sal del Tetrazolio formando un compuesto de color rojo o rosado, indicando la viabilidad en los tejidos de la semilla y su actividad respiratoria (Salazar y otros, 2020). Esta prueba ha sido muy exitosa debido a que presenta varias ventajas, caracterizándose como un proceso rápido y sencillo de realizar (Mercado y otros, 2020); no tiene costos elevados, no necesita de especialistas ni de materiales ni equipos especiales, sobre todo, es muy certera al dar resultados (Salazar y Botello, 2018).

2.3.1.2. Fases de micropropagación *in vitro*

- **Fase 0: Selección y preparación de la planta madre**

Durante esta fase se realiza la selección de plantas madre cuyas características sean garantizar una alta producción, un adecuado desarrollo y resistencia a enfermedades; una vez realizada la selección, las plantas madre deben ser introducidas a invernadero durante semanas o meses bajo condiciones controladas, con el fin de garantizar la adaptabilidad del explante una vez que haya sido transferido de forma *in vitro* (Suárez, 2020).

- **Fase 1: Desinfección del material vegetal**

A partir de la planta madre se obtienen pequeños fragmentos denominados explantes (semillas, segmentos nodales, hojas, yemas, entre otros), los mismos que serán sometidos a agentes tensoactivos como el tween 20 y a soluciones desinfectantes como el Etanol al 70 % e hipoclorito de sodio generalmente al 5 % (Zamora, 2021).

- **Fase 2: Introducción del material *in vitro***

En esta fase, los explantes que fueron sometidos a un protocolo de desinfección, serán introducidos en medios de cultivo completamente estériles, dando inicio al proceso de germinación o la regeneración de tejidos vegetales (Suárez, 2020).

- **Fase 3: Multiplicación**

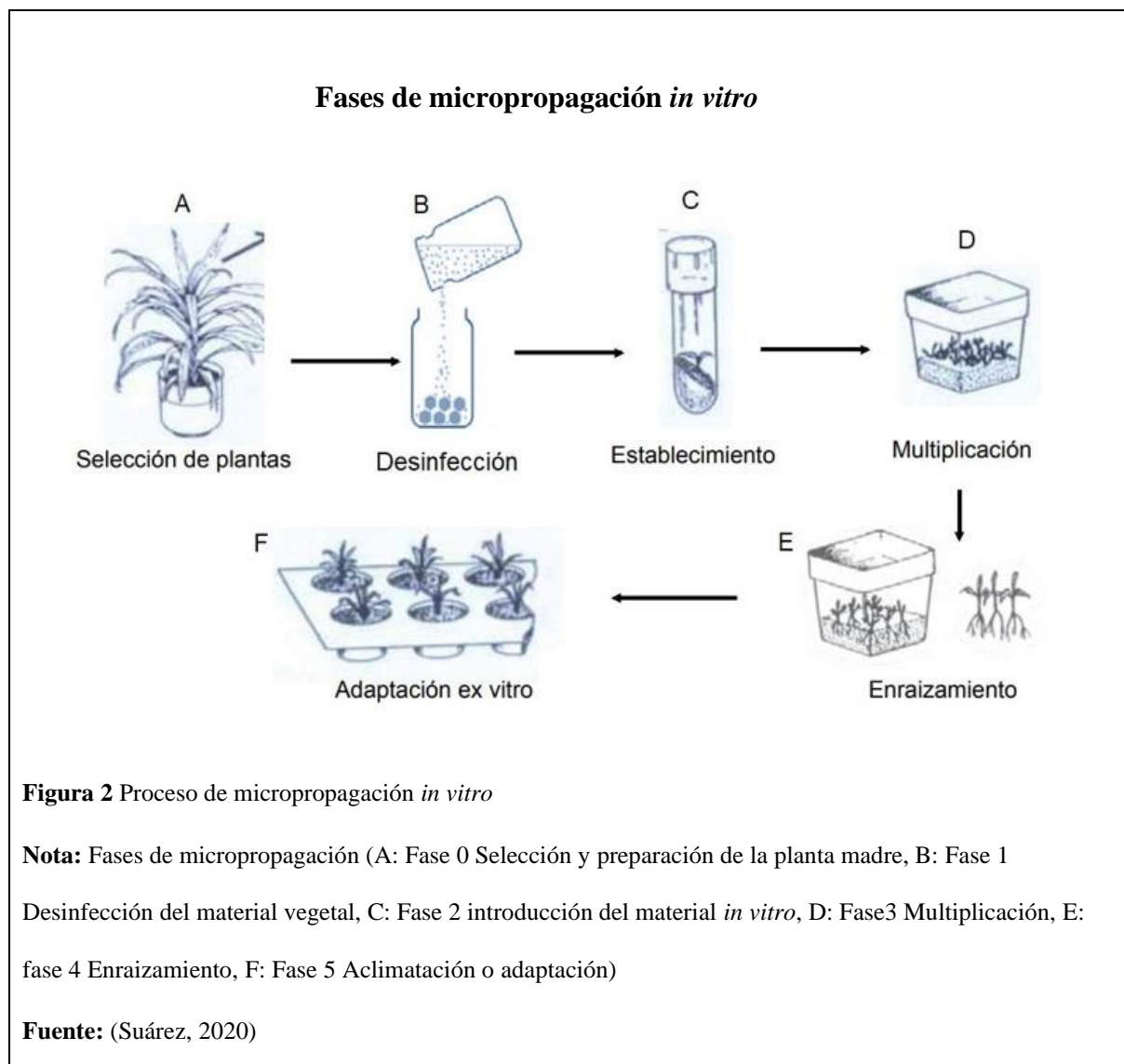
En esta etapa, periódicamente se deben realizar resiembras en recipientes adecuados y medios de cultivo estériles suplementado con reguladores de crecimiento (auxinas, GA, ABA, citoquinina y etileno), de esta forma, se obtendrá una masificación de plantas en cada repique (Suárez, 2020). Cabe destacar que durante esta fase se pueden obtener o formar callos (Ponce, 2023), los mismos que se caracterizan por ser una masa indiferenciada de células en crecimiento que se desarrolla a partir de células vegetales maduras y diferenciadas (Intagri, 2016).

- **Fase 4: Enraizamiento**

Esta fase se considera opcional, debido a que la mayoría de las plantas desarrollan sus raíces en el mismo medio donde realizan su ciclo de vida, para inducir el crecimiento de las raíces se utiliza fitohormonas como auxinas y giberelinas (Zamora, 2021).

- **Fase 5: Aclimatación o adaptación**

Esta fase pretende que las plantas que fueron creciendo a nivel *in vitro* y bajo condiciones controladas, se adapten a nivel *ex vitro* y puedan seguir desarrollándose en condiciones naturales o en campo, cabe destacar, que el éxito o el fracaso únicamente depende de la aclimatación, por lo que se considera una de las etapas más críticas de todo el proceso (Vasco, 2020) Ver Figura 2.



2.3.2. Modificaciones genéticas

2.3.2.1. Inducción a la Poliploidía

Es un fenómeno que ocurre con mucha más frecuencia en las plantas que en los animales y se considera un procedimiento en el que se alteran las características morfológicas, fisiológicas y genéticas; además este método altera el número de los cromosomas para obtener la aparición de nuevos caracteres deseados, por lo tanto, hace referencia a la presencia de más de dos conjuntos de cromosomas en las células somáticas (Molero y otros, 2018). Es un fenómeno

que puede ocurrir de diferentes maneras empezando por la autoploidía, la cual se diferencia por producirse dentro de una sola especie en donde sus cromosomas se duplican en su propia célula logrando un aumento del número de conjuntos de cromosomas, por otro lado, tenemos la alopoliploidía, que se caracteriza por tener dos o más tipos de genomas, la misma que procede a la hibridación de dos o más especies, siguiendo por la alopoliploidía segmentada, el cual se distingue por presentar un juego cromosómico incompleto y por último la mixoploidía, que es aquella que presenta líneas celulares con distinto nivel de ploidía (Alcántar, 2014).

- **Agentes antimitóticos para inducción de poliploidía**

- **Colchicina**

La Colchicina es un alcaloide perteneciente de las plantas *Colchicum autumnale* y *Gloriosa superba* que se utiliza en la investigación y agricultura para inducir mutaciones en la planta, ya que tiene la capacidad de interferir con la división celular y la formación del huso mitótico haciendo que se produzca células hijas con un número anormal de cromosomas generando cambios genéticos en la planta, como lo es la duplicación cromosómica conocida como poliploidía, la cual puede causar características esperadas como un mejor tamaño en las flores, colores y formas más llamativas e incluso brindar a la planta una mayor resistencia al estrés, ya sea biótico o abiótico, sin embargo, la Colchicina también puede tener un efecto negativo en las especies vegetales, debido a que puede generar una euploidía, que es el cambio de números en los cromosomas y causar daños en las células germinales (Caballero, 2016).

El mecanismo de acción de este agente mutagénico empieza con la inhibición del huso mitótico, el mismo que es una estructura que separa los cromosomas durante la mitosis impidiendo que los micro túbulos se ensamblen correctamente en el huso mitótico haciendo que exista un error en la segregación de los cromosomas de las células hijas, como segundo paso tenemos la

poliploidía, en donde la Colchicina interfiere en la división celular normal obteniendo así una acumulación de cromosomas en exceso en lugar de dividirse en dos células hijas con el número normal de cromosomas (Salazar y otros, 2018).

Después de esta acción se obtiene como resultado mutaciones genéticas que pueden incluir cambios en la estructura del ADN, duplicaciones, pérdidas de fragmentos, entre otros. Finalmente, se seleccionan las plantas que han sido aplicadas al reactivo para así propagar a aquellas plantas que han adquirido mutaciones beneficiosas como la resistencia a ciertas plagas y enfermedades, o que a su vez tengan mejores características agronómicas (Arzate y otros, 2019).

- **Orizalina**

Es un herbicida que se caracteriza por producir anomalías en las plantas principalmente en tejidos vegetales para la obtención adecuada de cromosomas metafásicos, este agente antimitótico al igual que la colchicina actúa interrumpiendo la mitosis inhibiendo la formación de microtúbulos, ya que impide el ensamblaje de la tubulina presente en las células vegetales (Pintos y otros, 2014).

• **Estudios citogenéticos obtenidos mediante poliploidía**

Los estudios citogenéticos en diferentes especies de plantas han permitido analizar las características cariotípicas (tamaño, número y simetría cromosómica, cantidad de heterocromatina, posición del centrómero, entre otros); asimismo, analizan el tamaño y comportamiento, tanto genómico como meiótico, respectivamente, en híbridos y poliploides (González et al., 2022).

La aplicación de poliploidía ha sido un método muy beneficioso en plantas que son de interés

tanto agrícola como comercial. En vitroplantas de *Aloe vera*, Molero y otros (2018) obtuvieron plantas poliploides que fueron expuestas a Colchicina en diferentes tiempos y concentraciones, obteniendo mejores resultados a una concentración al 0,1% por 48h. Ferrer y otros autores (2020), realizaron un análisis en 4 especies diferentes de *Polianthes*, reportando que se obtuvieron plantas tetraploides utilizando Colchicina al 0.2% durante 48h. Por último, Cresencio (2023), realizó un estudio aplicando colchicina en *Milla biflora*, dando una mayor efectividad en la inducción de poliploidía a una concentración de 0.2% y 0.4%.

2.3.2.2. Hibridación

La hibridación es un método utilizado en las plantas para obtener especies con caracteres deseados mediante la fecundación de dos individuos con distinta constitución genética para lograr obtener una descendencia con caracteres parentales deseados, sin embargo, al realizar este procedimiento existe la posibilidad de que se genere caracteres indeseados o desfavorables, por lo cual se necesita de una selección artificial en varias generaciones para poder eliminar aquellas plantas que poseen este tipo de rasgos (Chaparro, 1997).

2.3.2.3. Transgénesis

La transgénesis en plantas es un proceso mediante el cual se introduce deliberadamente material genético de una especie a otra, con el objetivo de conferir a la planta receptora características específicas que no poseía naturalmente y así lograr obtener características deseables, como resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas, mejor calidad nutricional o mayor rendimiento (Jouve, 2020).

2.3.2.4. Variación somaclonal

La variación somaclonal es un fenómeno biológico que se observa en plantas durante la regeneración de tejidos vegetales en cultivo *in vitro* que se utiliza para propagar plantas de

manera asexual, en donde las células están expuestas a una serie de factores estresantes, como cambios en la luz, la concentración de nutrientes y las hormonas vegetales que pueden inducir cambios en el genoma de las células, los cuales pueden manifestarse de diversas maneras, incluyendo mutaciones genéticas, reordenamientos cromosómicos y modificaciones epigenéticas; estas mutaciones pueden tener un impacto significativo en las características de la planta regenerada, ya que pueden afectar la función de los genes y, por lo tanto, su fenotipo (Velasco y Arzate, 2022).

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención y procesamiento de muestras

Las cápsulas de la especie *Caucaea pichincae* fueron recolectadas el 6 de octubre del 2022 en las faldas del volcán el Corazón del cantón Mejía en un rango altitudinal de 2800 m s.n.m., con coordenadas de 0°29'48.1''S 78°34'05.7''W.

Las cápsulas fueron colectadas en sobres de papel Kraft con el código 4434 del libro de campo de Marco Cerna, finalmente, cada sobre etiquetado fue transportado en un cooler a temperatura ambiente para evitar la putrefacción de las semillas hacia el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana. Ver Anexo 1.

La investigación inició el 10 de octubre del 2022 y finalizó el 9 de septiembre del 2023.

3.2. Cultivo *in vitro*

3.2.1. Viabilidad en semillas de *Caucaea pichincae*

La viabilidad de las semillas de *Caucaea pichincae* fue evaluada una semana después que se trasladó a los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana mediante la prueba de Tetrazolio (TZ). Para determinar la viabilidad se adoptó la técnica de Salazar y otros (2020) con algunas modificaciones, para ello se colocó aproximadamente 10 mg de las semillas de *Caucaea pichincae* en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se añadió 1 mL de agua destilada por 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente, se retiró el agua destilada con una micropipeta de 1000 uL y se añadió la solución de tetrazolio al 1 % (10 g de sal de tetrazolio en 1 L de agua destilada), se incubó en estufa a 40 °C durante 24 horas, en completa oscuridad, finalmente, los resultados fueron observados mediante un microscopio óptico, donde las semillas tinturadas de color rojo o rosado fueron tomadas como viables y las no tinturadas se tomaron como semillas no viables (Salazar y otros, 2020) Ver Figura 3.

Viabilidad de semillas de *Caucaea pichincha*

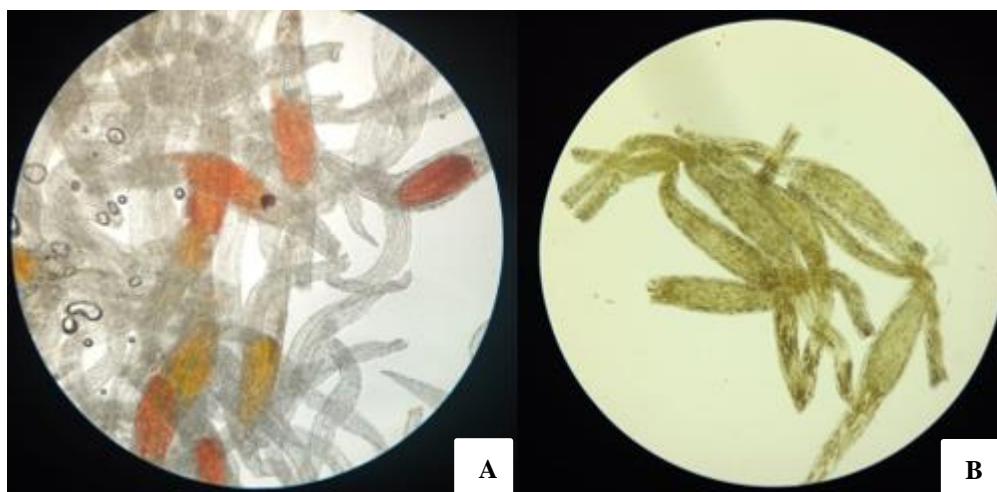


Figura 3 Viabilidad de semillas de *Caucaea pichincha*

Nota: A: semillas viables vista en microscopio Nikon a 40X, B: semillas no viables vista en microscopio Nikon a 40x

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

3.2.2. Desinfección de semillas

Para el proceso de desinfección se siguió la metodología descrita por Cevallos y Saltos (2022), donde mencionan que, dentro de una cámara de flujo laminar horizontal, 15 mg de las semillas fueron colocadas en una jeringa de 10 mL, la cual se taponó con un algodón para evitar el paso de las semillas por medio de la punta y lograr retenerlas dentro de esta, posteriormente, se procedió a absorber 8 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 5% suplementado con dos gotas de tween 20 durante 5 minutos, en agitación constante, después se descartó esta solución en un recipiente estéril y luego se procedió a lavarlas con agua destilada estéril por 3 minutos, todo el proceso se lo realizó en tres repeticiones Ver Figura 4.

Desinfección de semillas de *Caucaea pichincha*

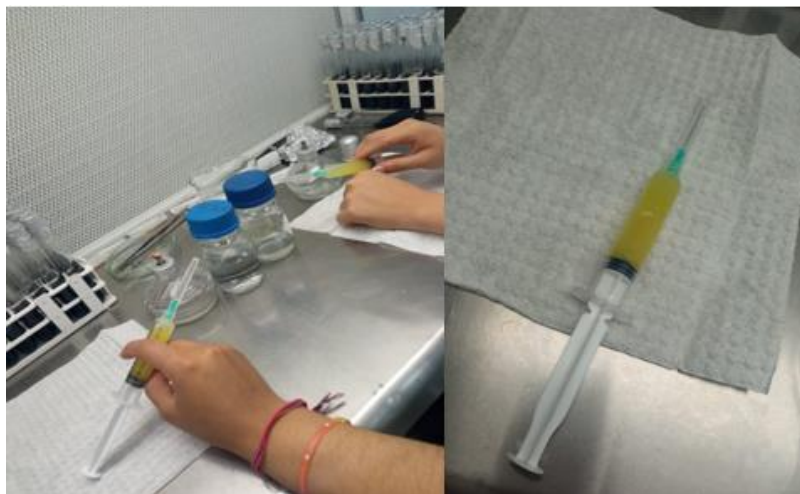


Figura 4 Desinfección de semillas de *Caucaea pichincha* mediante la técnica de la jeringa

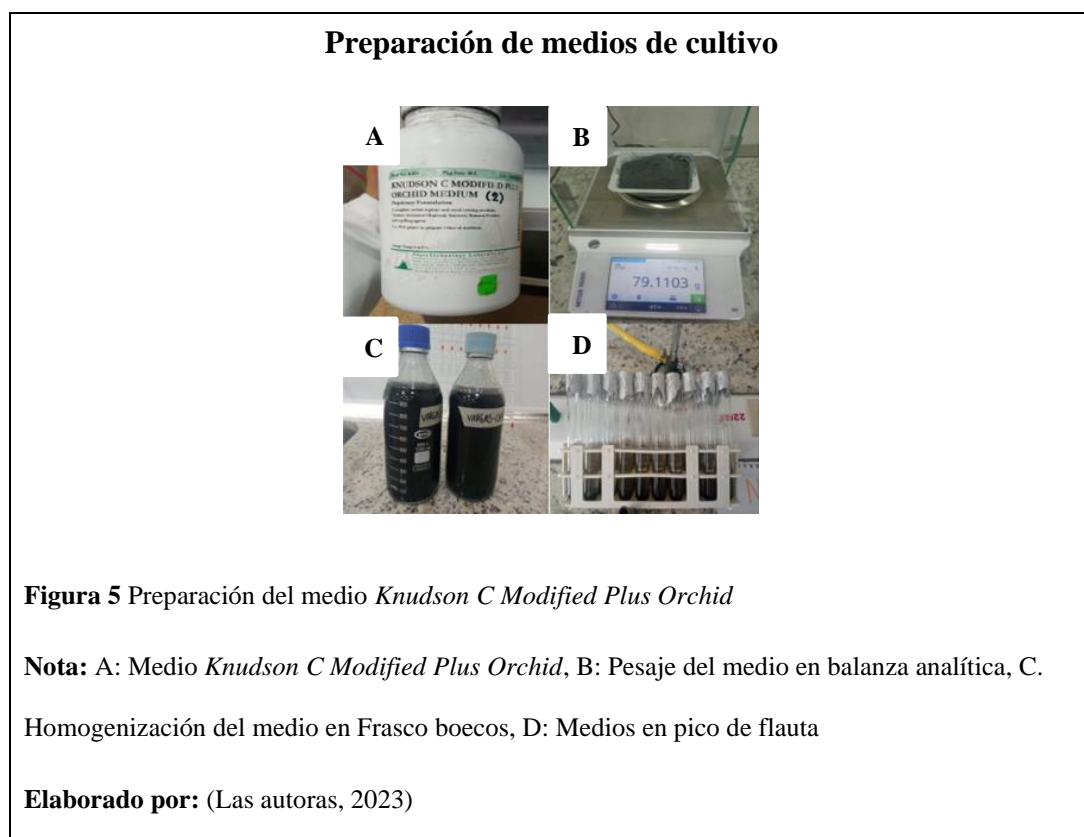
Elaborado por: (Las autoras, 2023)

3.2.3. Preparación de medios de cultivo

En esta investigación se empleó el medio *Knudson C Modified Plus Orchid*, ya que además de ser uno de los medios más ampliamente usados para la micropropagación, según Pinedo y otros (2022), mencionan que presenta una baja concentración de sales y minerales lo que favorece a un mayor crecimiento *in vitro*, el medio *Knudson C* contiene carbón vegetal, sacarosa, polvo de plátano, agente gelificante, entre otros, por lo tanto, su composición cuenta con los requerimientos nutricionales que son necesarios para la germinación de *Caucaea pichincha* (Cevallos y Saltos, 2022).

Para la elaboración de los medios de cultivo se siguió la metodología descrita por Cevallos y Saltos (2022), en una balanza analítica de modelo *Mettler Toledo*, se pesó 79,11 g del medio *Knudson C Modified Plus Orchid*, el mismo que se colocó en un frasco boeco de 1 L con

agua destilada, luego se llevó a una plancha magnética de marca *Velp Scientifica* con una temperatura de 400 °C y 4 rpm durante 30 minutos, llegando a alcanzar el punto de ebullición para una mejor homogenización. Posteriormente de que la mezcla fue completamente homogenizada, se dispensó aproximadamente 5 mL del medio en cada uno de los tubos de ensayo y se selló con una tapa de aluminio, luego las gradillas se las llevó a la autoclave horizontal de marca *Tuttnauer* por 45 minutos a una temperatura de 121 °C y 15 PSI. Finalmente, se las colocó en una base a un ángulo de 45° para su solidificación (pico de flauta), y así poder lograr una mayor superficie de contacto entre las semillas y el medio, luego de que los medios se encontraron solidificados se las llevó a su refrigeración para su uso posterior. Ver Figura 5.

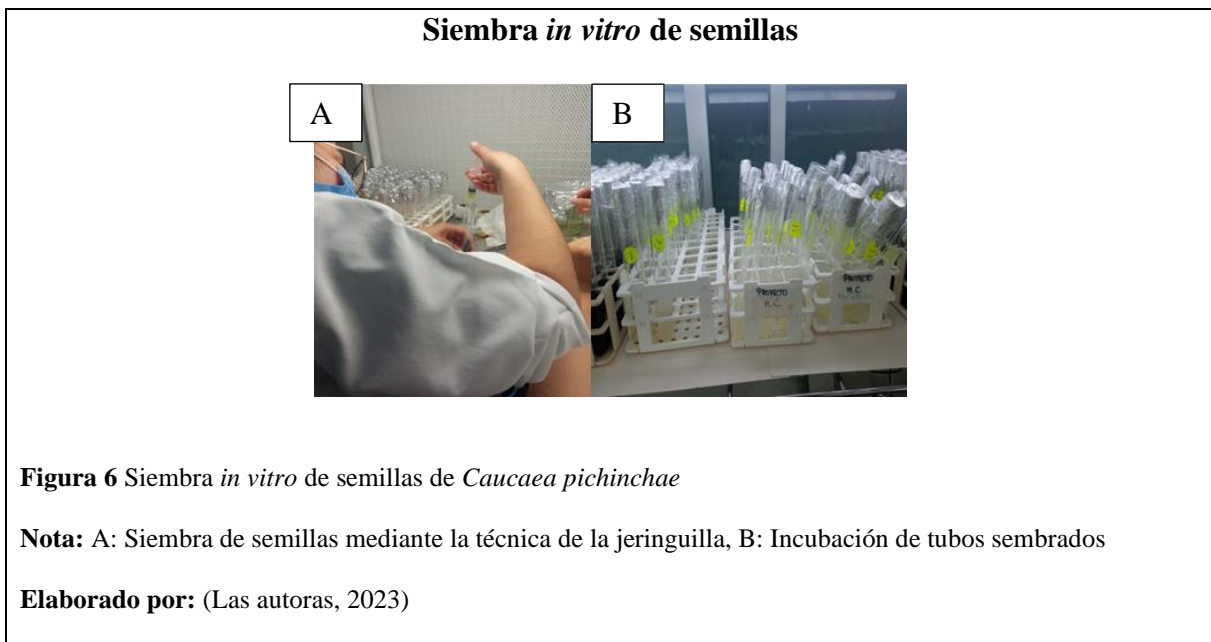


3.2.4. Siembra *in vitro*

Dentro de una cámara de flujo laminar completamente estéril de marca *Esco*, las semillas desinfectadas fueron inoculadas (1 a 2 gotas) en los medios de cultivo preparados mediante la

técnica de la jeringuilla. Finalmente, la boca de cada uno de los tubos de ensayo se flameó a través de un mechero de alcohol, se selló con papel aluminio y plástico de embalaje.

Posteriormente, cada uno de los tubos sembrados fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y a una temperatura de 20 ± 2 °C Ver Figura 6.



3.2.5. Inducción a la poliploidía

3.2.5.1. Evaluación de la colchicina

Las dosis de colchicina y el tiempo de exposición que se consideraron en este trabajo de investigación fueron en base a lo reportado por Gómez (2019), ver Tabla 1, en el que se basó de la siguiente manera: se utilizó 3 diferentes concentraciones a 4 diferentes tiempos de exposición y cada uno de los tratamientos propuestos tuvo 3 repeticiones; además, 40 fueron destinados a ser testigos, los mismos que solo se expusieron con agua destilada estéril. Por lo que, en relación a lo descrito, se trabajó con una unidad experimental de 900 protocormos y 700 callos, de los cuales se utilizó 400 callos que estaban en proceso de desdiferenciación para la realización de esta investigación.

Tabla 1

Dosis y tiempo de exposición en tratamiento de Colchicina en protocormos en proceso de desdiferenciación de *Caucaea pichincha*.

Tratamientos	Concentración de Colchicina (%)	Tiempo de exposición
Testigo 1	0%	24h
Testigo 2	0%	48h
Testigo 3	0%	72h
Testigo 4	0%	96h
Tratamiento 1 (T1)	0.05%	24h
Tratamiento 2 (T2)	0.05%	48h
Tratamiento 3 (T3)	0.05%	72h
Tratamiento 4 (T4)	0.05%	96h
Tratamiento 5 (T5)	0.1%	24h
Tratamiento 6 (T6)	0.1%	48h
Tratamiento 7 (T7)	0.1%	72h
Tratamiento 8 (T8)	0.1%	96h
Tratamiento 9 (T9)	0.2%	24h
Tratamiento 10 (T10)	0.2%	48h
Tratamiento 11 (T11)	0.2%	72h
Tratamiento 12 (T12)	0.2%	96h

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

3.2.5.2. Aplicación de colchicina

Los protocormos en proceso de desdiferenciación fueron sometidos a los 12 Tratamientos descritos en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, a distintas dosis y tiempos de exposición al agente antimitótico Colchicina de 98,5% de pureza de marca *Loba Chemie* y distribuido por Labomersa. El reactivo fue colocado en balones volumétricos de 100 mL, los mismos que fueron autoclavados y envueltos con papel aluminio ya que la Colchicina es fotosensible, se vertió las diferentes cantidades de colchicina (anteriormente pesadas en una balanza analítica en relación a cada una de las concentraciones), posteriormente fueron disueltas en agua destilada para luego ser vertidas en tubos de ensayo con rosca y finalmente, se agitaron a 70 rpm en un Shaker de marca *Ecasa*. Ver Figura 7.

Aplicación de colchicina a protocormos en proceso de desdiferenciación



Figura 7 Aplicación de colchicina a protocormos en proceso de desdiferenciación de *Caucaea pichincha*

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

3.2.6. Visualización cromosómica

Una vez que se realizaron los tratamientos con Colchicina, se procedió a la visualización y al conteo de cromosomas, en el que los protocormos en proceso de desdiferenciación fueron

sometidos a varios protocolos experimentales: el primer y el tercer tratamiento fue descrito por Delgado y otros autores (2010), el segundo protocolo fue expuesto por Gómez (2019) y finalmente, el cuarto protocolo fue en base a lo mencionado por Arrizabalaga y Baeza (2016), quienes visualizaron células epiteliales con la ayuda de estos colorantes. Cabe mencionar que todos los protocolos se los realizaron con algunas modificaciones y combinaciones entre los mismos. Ver Figura 8.

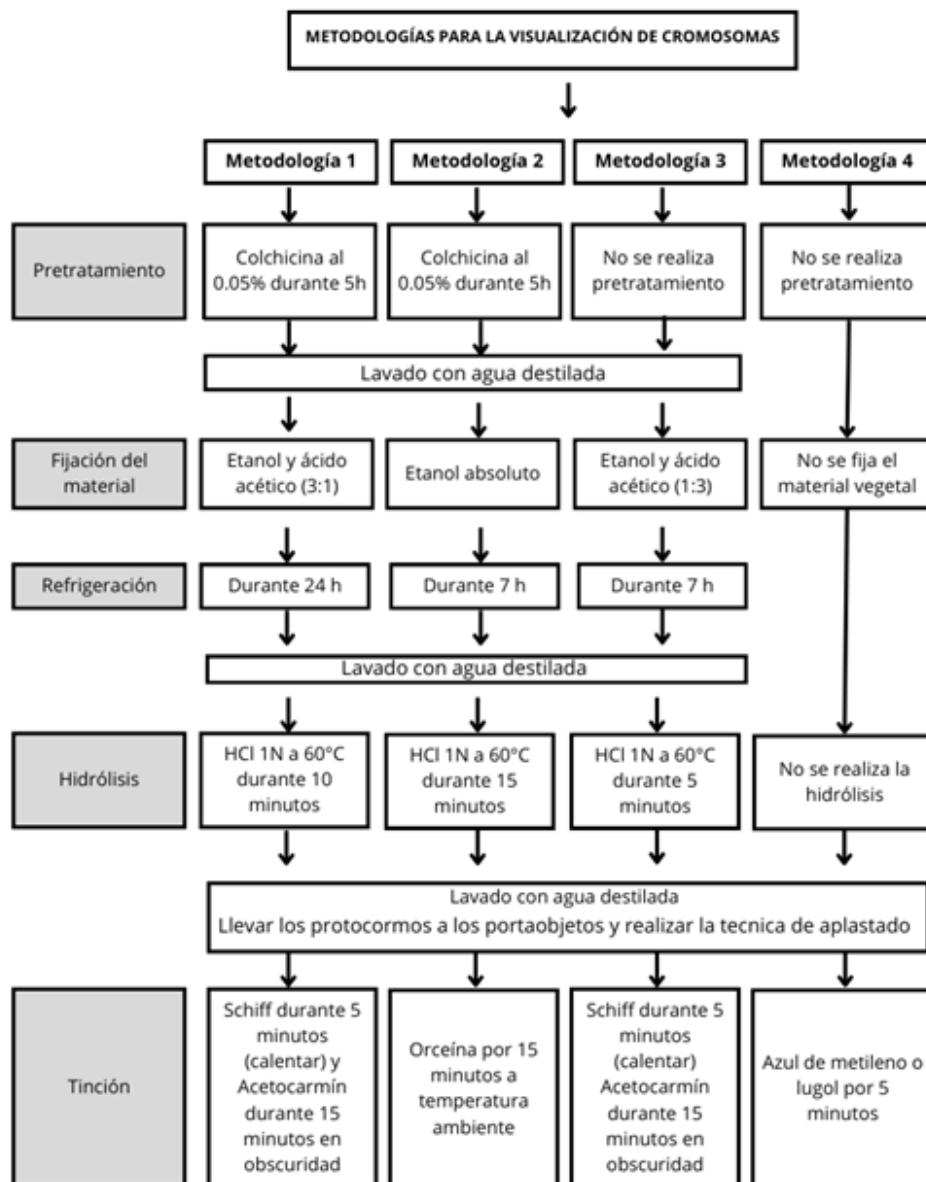


Figura 8 Métodos empleados para la visualización cromosómica en *Caucaea pichincha*

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

4. Resultados y Discusión

Viabilidad de semillas a partir de la prueba de Tetrazolio

Después de analizar las semillas de *Caucaea pichincha* en un microscopio óptico de marca *Nikon* que fueron expuestas a la prueba de tetrazolio, se las dividió en 4 cuadrantes para determinar su porcentaje de viabilidad, la misma que obtuvo un 90,64 % de semillas viables, debido a que 126 semillas se tornaron de color rojizo de un total de 139, ver Figura 9

En una investigación realizada por Pérez y Pita (2016) es que independientemente de las condiciones de almacenamiento, si el porcentaje de viabilidad es menor al 85%, las semillas no se encuentran en un estado de maduración adecuado para su germinación, por lo cual se recomienda realizar una segunda prueba con nuevas recolecciones de semillas, sin embargo, al obtener un porcentaje total del 94% de viabilidad, determina que se encuentra dentro de lo adecuado.

En el caso de la investigación realizada por Cevallos y Saltos (2022), presentaron un 96,5% de viabilidad de semillas de *Caucaea pichincha*, lo que quiere decir que esta especie asegura tener un porcentaje alto de viabilidad de semillas; además, Pérez y Castañeda (2016), reporta que la germinación depende del estado de maduración en la que se encuentre la cápsula y del tipo de orquídea, por lo que al tener una cápsula completamente madura de *Caucaea pichincha*, se obtuvo un alto porcentaje de viabilidad y germinación.

Porcentaje de viabilidad de semillas de *Caucaea pichincha*

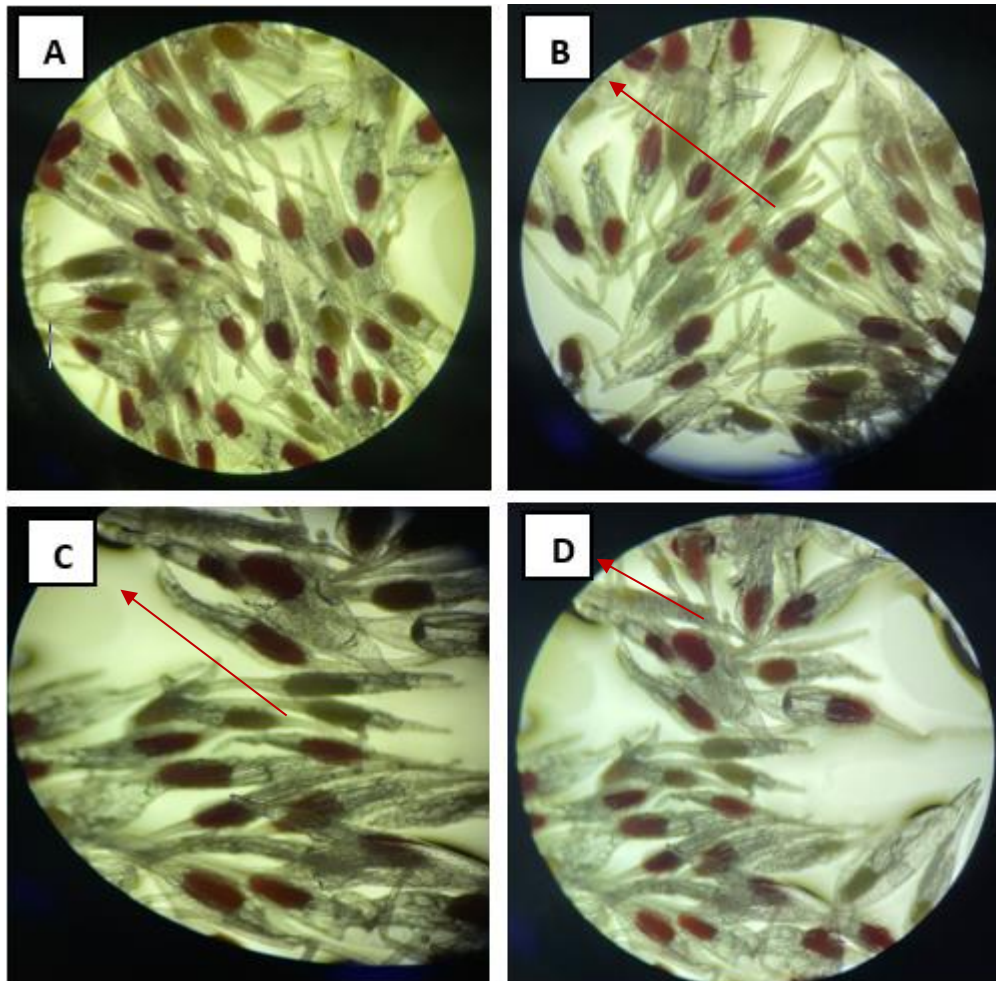


Figura 9 Porcentaje de viabilidad de semillas de *Caucaea pichincha* a partir de la prueba de tetrazolio

Nota: A. Primer cuadrante, visualización de semillas de *Caucaea pichincha* aplicadas la prueba de tetrazolio en 10x, B. Segundo cuadrante, semilla viable, C. Tercer cuadrante, semilla no viable, D. semilla sin embrión (semilla no viable)

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

Germinación de semillas a partir de cápsulas maduras de la especie *Caucaea pichincha*

La germinación de las semillas de *Caucaea pichincha* se dio a los 3 meses de ser sembradas

por medio del cultivo *in vitro*, después de estos meses empezó aparecer las primeras semillas germinadas que se diferenciaban en unos pequeños puntos verdes ubicados alrededor de todo el medio de cultivo (protocormos), sin embargo, unos se desarrollaron más rápido que otros, llegando a obtener masas amorfas de color verdoso (callos), ver Figura 10.

Germinación de semillas a partir de cápsulas maduras de *Caucaea pichincha*

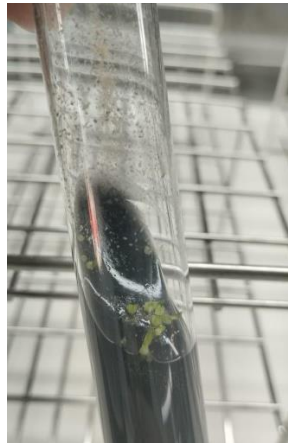


Figura 10 Germinación de semillas de *Caucaea pichincha*

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

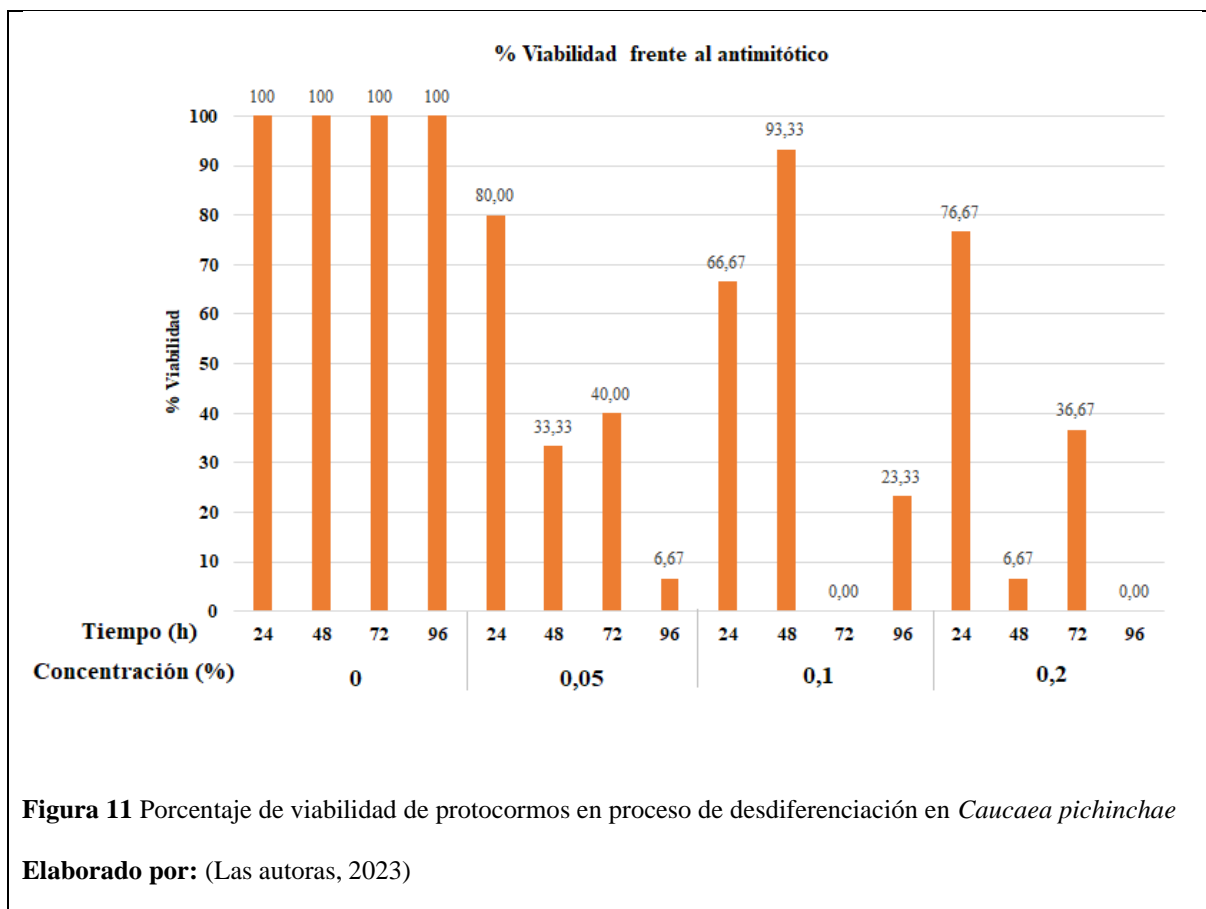
Las semillas de *Caucaea pichincha* fueron sembradas en un total de 160 tubos de ensayo, de los cuales 148 tubos presentaron brotación de semillas, teniendo un total de 92,5% de germinación.

Por otro lado, mediante la técnica de la jeringuilla, por cada gota inoculada en el medio de cultivo, se sembraban alrededor de entre 15 a 40 semillas, de las cuales germinaban alrededor de 10 a 30 de las mismas, teniendo un total de 700 callos y 900 de protocormos, de los cuales se trabajó solo con 400 callos que estaban en proceso de desdiferenciación, siendo la cantidad de material vegetal adecuado para esta investigación. Ver en Anexos, Tabla 5.

Para la germinación se utilizó medio *Knudson C Modified Plus Orchid*, que según Menezes otros autores (2016), afirman que el medio *Knudson C* es el medio más aceptado para el cultivo *in vitro* de orquídeas, sin embargo, mencionan que las condiciones que se les da a las semillas por medio del cultivo *in vitro* no son las mismas que la naturaleza les brinda, ya que aquí la concentración de nutrientes es mucho más escasa.

Viabilidad de protocormos en proceso de desdiferenciación de *Caucaea pichincae* tratados con Colchicina

En el presente estudio de investigación, uno de los objetivos fue inducir *in vitro* poliploidías en la especie *Caucaea pichincae*. Como se observa en la Figura 11, el tratamiento a 48h (0,1 % de colchicina) fue el que mayor porcentaje de viabilidad o supervivencia tuvo (93,33 %). De igual forma, se observa que el Tratamiento a 72 h (0,1 % de colchicina) y el tratamiento a 96 h (0,2 % de colchicina), fueron los tratamientos que no lograron ser viables, es decir, su supervivencia fue del 0 %, esto podría deberse a que el tiempo de exposición fue muy extenso resultando tóxico para *Caucaea pichincae*, ya que los protocormos en proceso de desdiferenciación presentaron muerte celular proporcional o completa en su tejido, dicho de otra manera, se observó necrosis; además, Mohammadi y otros autores (2021), corroboran que el porcentaje de supervivencia disminuye cuando el tiempo de antimitótico Colchicina aumenta, es decir, entre mayor sea el tiempo de exposición, menor será la viabilidad.



Para el análisis estadístico se utilizó un modelo ANOVA conjuntamente con la prueba de Turkey para comparar cada uno de los tratamientos realizados, como se observa en la Tabla 2, los tratamientos que fueron expuestos con 0,05 %, 0,10 % y 0,20 % de Colchicina por 24 horas, y el tratamiento con 0,10 % de exposición por 48 horas, fueron los que no presentan diferencia significativa entre sí y los que mayor viabilidad tuvieron con respecto a los demás tratamientos, además, se observa que los tratamientos a una concentración de 0,20 % y 0,10 % por 96 y 72 horas respectivamente, presentan medias de 0,00, es decir, el porcentaje de viabilidad fue nula.

Tabla 2

Prueba de Turkey en la viabilidad de protocormos en proceso de desdiferenciación en *Caucaea pichincae*

Concentración	Tiempo	Medias	Tratamientos				
0,10	48	9,33	A				
0,05	24	8,00	A				
0,20	24	7,67	A	B			
0,10	24	6,67	A	B	C		
0,05	72	4,00		B	C	D	
0,20	72	3,67			C	D	E
0,05	48	3,33			C	D	E
0,10	96	2,33				D	E
0,05	96	0,67				D	E
0,20	48	0,67				D	E
0,20	96	0,00					E
0,10	72	0,00					E

Nota: Los tratamientos con letra común no son significativamente diferentes

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

Por otra parte, al análisis estadístico ANOVA demostró que la viabilidad de protocormos y callos se vio altamente afectado por el tiempo, así como a la interacción entre las 2 variables, es decir, entre la concentración y el tiempo, ya que al ser $p \leq 0.0001$ nos dice que existe una diferencia significativa, lo que representa que la viabilidad disminuye a medida que aumenta el tiempo de exposición de Colchicina, ver Tabla 3.

Tabla 3

Análisis de varianza de la concentración y tiempo sobre la viabilidad de protocormos en proceso de desdiferenciación de *Caucaea pichincae*

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Valor p
Modelo	11	366,97	33,361	19,37	0,0001
Concentración (%)	2	15,39	7,694	4,47	0,0224
Tiempo (h)	3	207,64	69,213	40,19	0,0001
Interacciones de 2 variables	6	143,94	23,991	13,93	0,0001
Concentración (%) *Tiempo (h)	6	143,94	23,991	13,93	0,0001
Error	24	41,33	1,722		
Total	35	408,31			

R²:0,90

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

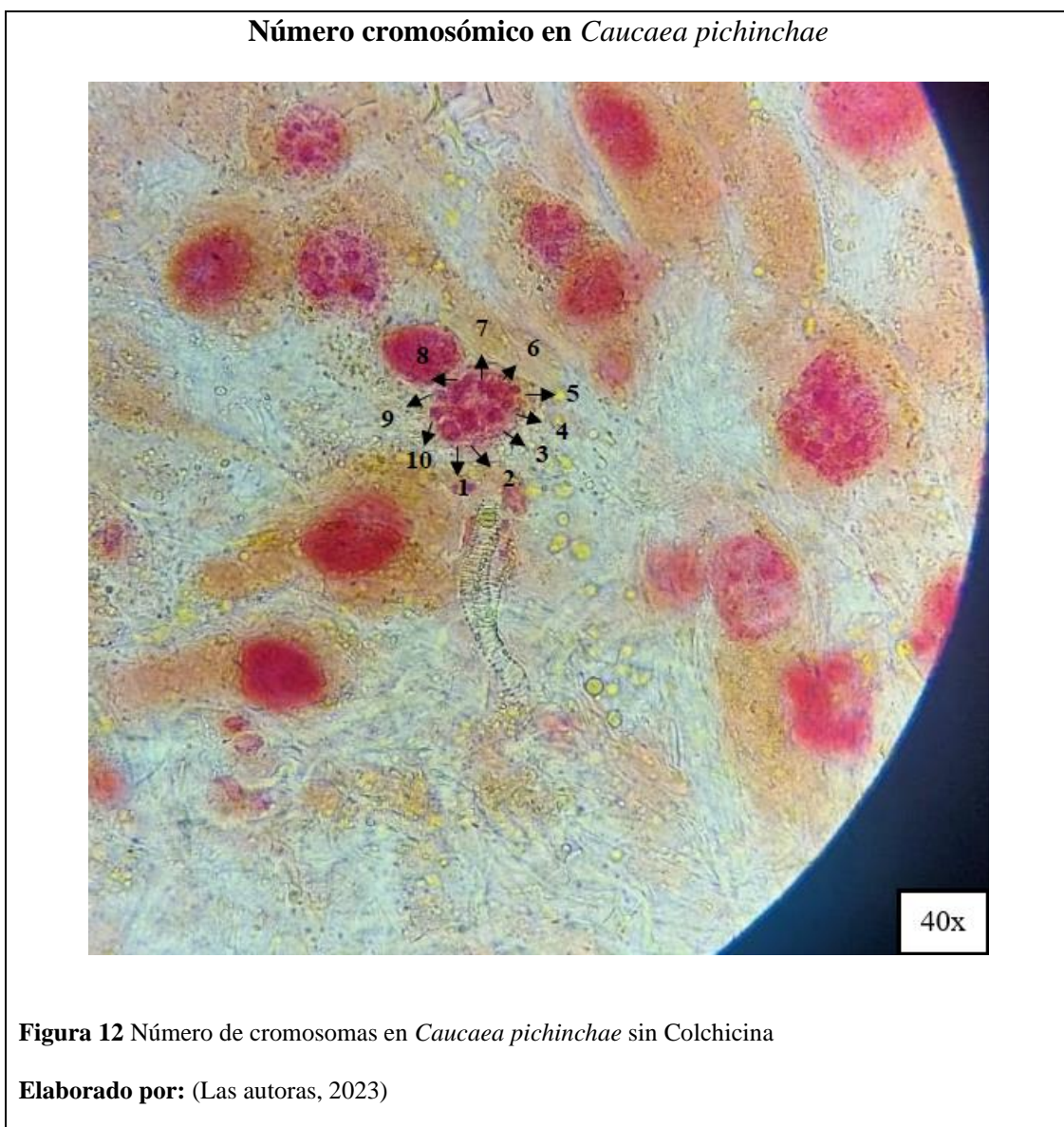
Por otro lado, diferentes autores han reportado en sus trabajos de investigación, que el tiempo de exposición y la concentración del agente antimitótico son factores que influyen para inducir poliploidía en distintas especies, por ejemplo, Mohammadi y otros autores (2021), afirman que, *Phalaenopsis amabilis* Blume var. *grandiflora* Bateman es una especie que desarrolló tetraploidías cuando fue expuesta a una dosis de 0,15 % de Colchicina a 72 h, por otra parte, Gómez (2019), recomienda que para inducir poliploidías en protocormos de *Laelia autumnalis*, se debe utilizar concentraciones no mayores a 0,1 % de Colchicina, pero solo por 24 h de exposición de la solución antimitótica. Sin embargo, en otras investigaciones se han utilizado diferentes concentraciones y tiempos de exposición a la Colchicina, pero que de igual forma tuvieron buenos resultados, como es el caso de Vilcherrez (2022), quien manifiesta que los protocormos de *Brassolaeliocattleya* que tuvieron una concentración de colchicina de 0,04 % y 0,08 % a 6 h y 18 h, respectivamente, fueron los tratamientos que mayor poliploidía

desarrollaron.

Visualización y análisis cromosómico

Para el análisis y visualización se utilizó la metodología 1 ya que fue la más efectiva (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), puesto que al iniciar el pretratamiento con Colchicina al 0,05 % durante 24 h a 10 °C, nos ayudó a inhibir la mitosis de las células del tejido vegetal, Ortega (2020), afirma que al usar un antimitótico se observa con mayor facilidad células somáticas en metafase. Posteriormente, se pasa a realizar la fijación con etanol absoluto y ácido acético en proporción (3:1) a 3 °C por 24 horas, también denominada solución I de Carnoy o solución de Farmer, según Ortega (2020), la solución de Farmer es la más empleada para el estudio de cromosomas en plantas; además, al utilizar esta combinación, brindó al material suficiente firmeza para su manipulación. Luego se efectuó una hidrólisis con HCl 1N a 60 °C durante 10 minutos, en este punto, el químico ayudó a que el tejido del protocormo o del callo tuviera una adecuada consistencia, de acuerdo al trabajo de Umbriago y otros autores (2021), respaldan que una hidrólisis ácida mediante HCl a 60 °C por 10 minutos, ayuda a una buena visualización de poliploidías, pudiendo contabilizar los cromosomas de forma sencilla, de acuerdo a su experiencia con *Lolium perenne*. Por último, la tinción empleada con el reactivo de Schiff y una contratinción con Acetocarmín, ayudó a que estos dos colorantes penetren de forma adecuada en el tejido vegetal, lo que permitió una mejor observación de los cromosomas al microscopio, Delgado y otros autores (2010), emplearon estos mismos reactivos de tinción y afirman que sus resultados fueron más estéticos Sin embargo, existen otro tipo de colorantes que de igual forma brindan buenos resultados, como es el caso del trabajo de Gómez (2019), quien realiza la tinción con Acetoorceína al 45 % durante 1 a 2 horas, logrando cuantificar los cromosomas en *Lealia autumnalis*.

En la visualización de los cromosomas en *Caucaea pichincha* se determinó que el número cromosómico de *Caucaea pichincha* fue de $2x=10$ (Figura 12), mientras que con Colchicina fue de $2x=20$ (Figura 13), es decir, que el agente mutagénico aumentó el número cromosómico en las células de la especie experimental.



Número final cromosómico en *Caucaea pichincha*

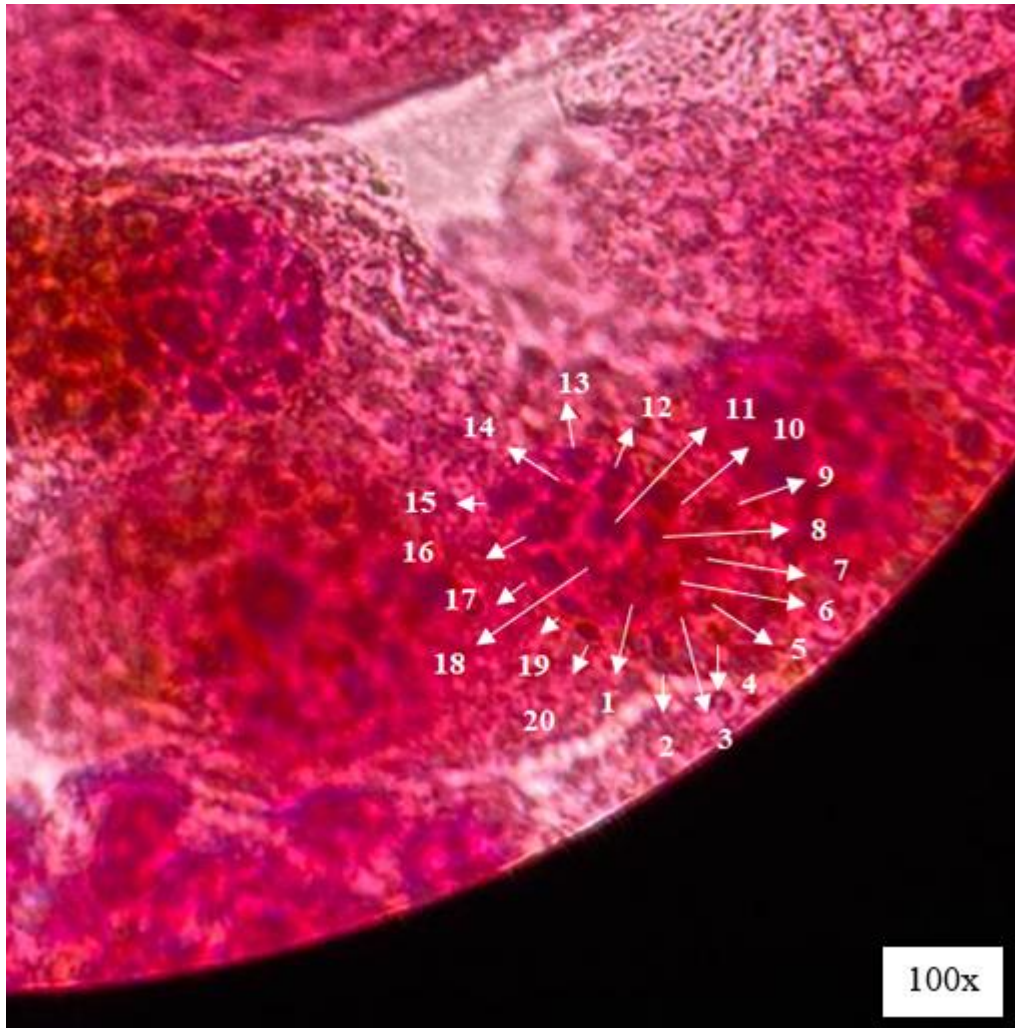


Figura 13 Número final de cromosomas en *Caucaea pichincha* con Colchicina

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

Comprobación de poliploidía en *Caucaea pichincha*

Mediante la prueba del Chi Cuadrado, se pudo comprobar la relación que existe entre la concentración y el tiempo de exposición de Colchicina, ya que al tener $p \leq 0.05$ determina que, si existe relación entre la concentración y el tiempo para inducir poliploidía en *Caucaea pichincha*, es decir, se aceptó la hipótesis alternativa y se rechazó la hipótesis nula. Ver Tabla

4.

Tabla 4

Análisis de Chi cuadrado en relación a la concentración y tiempo de exposición de la Colchicina en protocormos en proceso de desdiferenciación de *Caucaea pichincha*

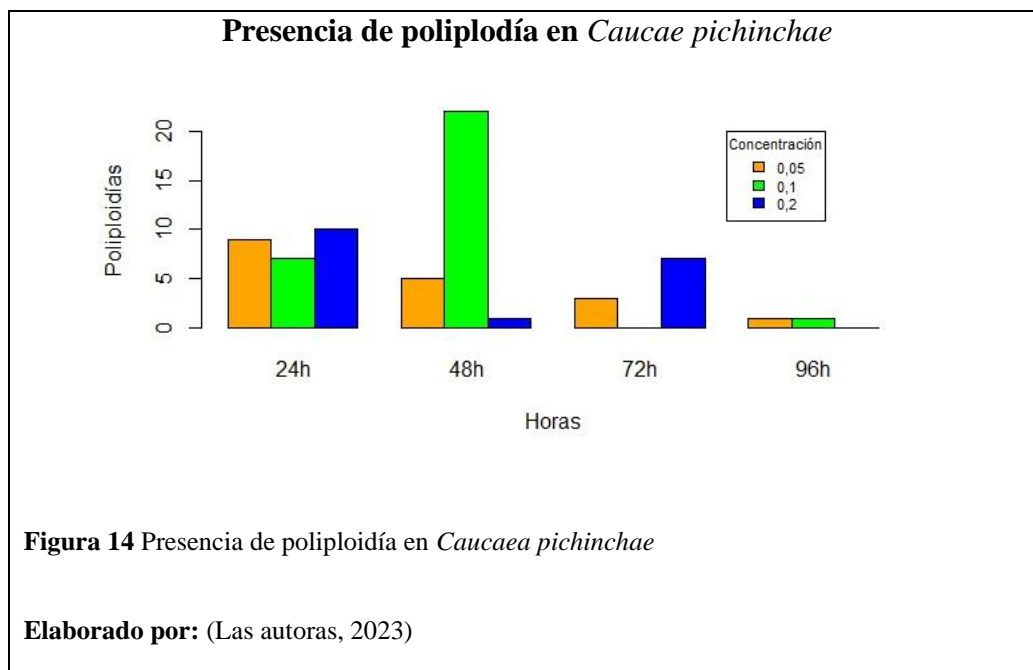
		Grados de libertad	P-value
Chi calculado	29,3051	6	5,32577E-05
Chi de la tabla	12,5915		

H₀: no existe relación entre la concentración y el tiempo

H_a: si existen relación entre la concentración y el tiempo

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

Por otro lado, en la Figura 14, se puede observar que efectivamente el tiempo juega un papel importante para inducir poliploidías, ya que los protocormos en proceso de desdiferenciación que fueron expuestos a una concentración del 0,1 % durante 48 h, fueron donde mayor poliploidía desarrollaron, mientras que, mayor era la concentración y el tiempo de exposición, fue decayendo drásticamente la presencia de poliploidía en *Caucaea pichincha*.



En la investigación realizada por Manzoor y otros autores (2018), se realizó inducción a la poliploidía con la especie *Gladiolo grandifloru*, donde concluyeron que las concentraciones no afectaron diferencialmente en la supervivencia del material vegetal que pudo deberse a los mecanismos de defensa inducidos por la propia planta. Por otro lado, tenemos la investigación realizada por Smith y Soetopo, (2018), quienes determinaron que la concentración de la colchicina en *Phalaenopsis pulcherrima*, afectaba en el surgimiento de nuevas hojas e incluso en el grosor de estas, finalmente, en la investigación realizada por Lertsutthichawan y otros autores (2017), concluyeron que la mutación generada por colchicina en el género *Chrysanthemum* se hacía presente por medio de la aparición de nuevos brotes, sin embargo, la altura de los brotes no tuvo diferencias significativas.

5. Conclusiones

Se obtuvo 700 callos y 900 protocormos a partir de semillas maduras de la especie *Caucaea pichincae* por medio del cultivo *in vitro*.

Se indujo poliploidía en *Caucaea pichincae*. a partir de los tratamientos que fueron expuestos con 0,05 %, 0,10 % y 0,20 % de Colchicina por 24 horas, y el tratamiento con 0,10 % de exposición por 48 horas, ya que el número de cromosomas para *Caucaea pichincae* sin Colchicina fue de $2x=10$, mientras que con Colchicina fue de $2x=20$.

Se estandarizó un protocolo para la visualización y el conteo cromosómico en *Caucaea pichincae*, el mismo que inicia con una fase de pretratamiento, fijación, hidrólisis y finalizando con una doble tinción.

6. Recomendaciones

El medio ideal para el cultivo *in vitro* de *Caucaea pichincha* es *Knudson C Modified Plus Orchid Medium*, ya que este se considera un medio completo para la germinación de semillas de orquídeas y además de contener carbón, sacarosa, polvo de banana y agente gelificante, lo hace adecuado al brindar los nutrientes necesarios para la especie experimental.

Se recomienda que las cápsulas de la especie *Caucaea pichincha* se encuentren en un estadio adecuado (cápsula madura), para obtener un buen porcentaje de viabilidad.

Se recomienda que para inducir poliploidía en *Caucaea pichincha* las concentraciones de Colchicina no sean mayor a 0,1 % ni sobrepasen las 72 horas, ya que puede ser tóxico para la especie experimental.

Para la visualización de los cromosomas se recomienda realizar una contratinción con el reactivo de Schiff y Acetocarmín, ya que permite que las células sean más visibles y hace evidente las estructuras del tejido vegetal.

7. Bibliografía

- Alcántar, J. (2014). La poliploidía y su importancia evolutiva. *Temas de Ciencia y Tecnología* (Vol. 18).
https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas54/T54_1Ensayo3_La%20poliploidia%20y%20su%20importancia%20evolutiva.pdf
- APG IV. (2023). *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan.
- Arrizabalaga, A., & Baeza, R. (2016). *Manual de prácticas de Biología*.
- Arzate, A., Piña, J., Norman, T., & Arroyo, H. (2019). *Apuntes de genética vegetal*.
<http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/104554/Apuntes%20de%20gen%C3%A9tica%20vegetal.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Boletín Bioamazonía. (2019, December 19). *Manual para identificación de orquídeas apoyará a autoridades ecuatorianas en el control de las actividades ilícitas en contra la flora silvestre*.
- Bravo, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*.
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6788>
- Caballero, D. (2016). Determinación de la concentración y tiempo de exposición de la colchicina para la duplicación del número cromosómico de *Physalis peruviana* L. en condiciones *in vitro*. [Universidad Nacional San Agustín de Arequipa].
<https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/ab69c776-756d-4dd7-bdf3-eff3e3c3d40d/content>
- Caizatoa, D., & Manobanda, E. (2021). *Análisis de los efectos del acuerdo de alcance parcial de complementación económica (AAP.A25TM N°42) firmado entre Ecuador y Guatemala para las subpartidas 1805.00.00 y 0602.90.10 (derivados de cacao y orquídeas)* [Universidad Central del Ecuador].

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25025/1/FCE-CE-CAIZATO%20DIANA%2c%20MANOBANDA%20ERIKA.pdf>

Carrodeaguas, A., Zuñiga, A., & Sánchez, L. (2022). Herramientas para el mejoramiento genético de orquídeas del género *Vanda*. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 21(2), 79–95. <https://doi.org/10.14409/fa.v21i2.12074>

Cevallos, G., & Saltos, G. (2022). *Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de la especie Caucaea pichincha*, Orchidaceae [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/23921>

Chaparro, A. (1997). *Hibridación entre plantas transgénicas y plantas silvestres: límites del riesgo ambiental*. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/41722257/30061-108211-1-PB-libre.pdf?1454066585=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DHibridacion_entre_plantas_transgenicas_.pdf&Expires=1696370691&Signature=GYP5IEZGXiHDER278ttp88ziL9m3WvJ8D0AJvWrrPmDsrukrPGnEJNdVWoxjhoMhuU6hqlpYDNmc5Bm-op38a-aET84O3id0ar7GgXDbb3PQmdAY6E-Jf1tpKj005LYcGVq8t9srl6zxzwXrntI200dOYO31SPyTDmIRyXl1hT-kavBf-XrYF4yXIbtVrlttWSEfDn6aVpUStMtPFpiuwR3dAqKZy3x5W3d9KelzheTA4Wqt6v~1zGf1ahro4tqbCoZg3fozyrBpgaoVu-vgaCs3NCmPP3co-JzBZ7QPFq3OqO54fJ2wS~J8oKmk~WFGSDTw~ofLTzLz4SVBvEhsA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Cresencio, S. (2023). *Inducción de poliploidía en *Milla biflora* por aplicación de colchicina* [Universidad Autónoma del Estado de México]. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/138211>

Delgado, L., Uribe Marcela, & Marulanda, M. (2010). Estandarización de la prueba

- citogenética “Squash” para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. In *Scientis et Technica Año XVII* (Vol. 46).
- Duque, A. (2019). *Avances en Biotecnología Agrícola en Risaralda*.
<https://repositorio.utp.edu.co/items/5b615275-4326-4473-8727-5555a72317ca>
- Educalingo. (2024). *Velamen*.
- Elicriso. (2023). *Historia de las orquídeas*.
- Emeterio, A., Palma, V., Vázquez, L., & Mejía, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del estado de México. *Polibotánica*, 0(42).
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.10>
- Ferrer, M., Rodríguez, J., Barba, R., Castañeda, M., & Tapia, E. (2020). Obtaining polyploids in wild species of the genus *Polianthes*. *Acta Horticulturae*, 1288, 65–70.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1288.9>
- Gómez, J. (2019a). *Inducción in vitro de poliploidía en Laelia autumnalis y Oncidium tigrinum, dos especies nativas de México* [Fisiología y Genética Vegetal, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo].
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2082
- Gómez, J. (2019b). *Inducción in vitro de poliploidía en Laelia autumnalis y Oncidium tigrinum, dos especies nativas de México*.
- González, G., Bolzán, A., & Steinberg, E. (2022). Citogenética aplicada. *En elementos de genética*.
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/131496/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Gutiérrez, D., Navarrete, G., & Espín, G. (2014). Orquídeas de la Amazonía Ecuatoriana: Maravillas escondidas en las montañas Andino - Amazónicas. *Huellas Del Sumaco*, 11.

<https://docplayer.es/148346467-Orquideas-de-la-amazonia-ecuatoriana-maravillas-escondidas-en-las-montanas-andino-amazonicas.html>

Hernández, S. (2018). *Mejoramiento genético por mutagénesis en la orquídea Laelia autumnalis* [Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/6226

Intagri. (2016). *Cultivo in vitro de células y tejidos vegetales*.

Jouve, N. (2020). De la transgénesis a la edición génica. Aplicaciones y consideraciones bioéticas. *Cuadernos de Bioética: Revista Oficial de La Asociación Española de Bioética y Ética Médica*, 31(103), 387–401. <https://doi.org/10.30444/CB.78>

Lertsutthichawan, A., Ruamrungsri, S., Duangkongsan, W., & Saetiew, K. (2017). Induced mutation of Chrysanthemum by colchicine. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(3), 2325–2332.

Loaiza, D., & Oliveros, D. (2021). *Diseño de un material didáctico web para la enseñanza de cultivo de tejidos en orquídeas de permita el desarrollo de habilidades científicas en estudiantes de grados octavo y noveno*. [Universidad Pedagógica Nacional]. <http://repository.pedagogica.edu.co/bitstream/handle/20.500.12209/16743/DISE%C3%91O%20DE%20UN%20MATERIAL%20DID%C3%81CTICO%20WEB.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Losada, J. (2017). *Desarrollo e innovación y comercialización enfocado en la orquideología*. <http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/6482>

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>

Mancipe, C., Calderón, M., & Pérez, L. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17

- especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio. *Conservación*, 40(2). <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.15446/caldasia.v40n2.68251>
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M. A., Baig, M. M. Q., Quresh, A. A., Shah, M. K. N., & Hafiz, I. A. (2018). Induction and identification of colchicine induced polyploidy in *Gladiolus grandiflorus* “White Prosperity.” *Folia Horticulturae*, 30(2), 307–319. <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0026>
- Menezes, L., Machado, M., Ballesta, P., Milaneze, M., & Aparecida, C. (2016). *Suplementos orgánicos para el cultivo in vitro del híbrido Laeliocattleya (Orchidaceae)* (Vol. 34). <https://www.scielo.cl/pdf/idesia/v34n1/art06.pdf>
- Mercado, S. A. S., Caleño, J. D. Q., & Suárez, J. P. R. (2020). Optimization of the tetrazolium test in three species of orchids of the Andean forest. *Australian Journal of Crop Science*, 14(05):2020, 822–830. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.05.p2276>
- Miranda, D. (2014). *Estudio de factibilidad comercial y financiera para la producción y exportación a Francia de derivados de plántulas de orquídeas (Orquídeas in vitro). Caso: Empresa FLOARE CÍA. LTDA.* [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12390/Tesis%20Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mohammadi, M., Kaviani, B., & Sedaghatthoor, S. (2021). In vivo polyploidy induction of *Phalaenopsis amabilis* in a bubble bioreactor system using colchicine. *Ornamental Horticulture*, 27(2), 204–212. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.V27I2.2275>
- Molero, T., & Matos, Á. (2008). Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de *Aloe vera* (L.). *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 42(1). <https://www.researchgate.net/publication/315694405>
- Molero, T., Vilorio, M., & Vilorio, E. (2018). Inducción de poliploidía con colchicina en

- vitroplantas de Aloe vera (L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XX(1), 98.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.73762>
- Neubig, K., Mark, W., Norris, H., Blanco, M., Endara, L., Gordon, J., Silvera, K., Cushman, J., & Mark, C. (2011). *Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets*.
<https://academic.oup.com/botlinnean/article/168/2/117/2416096>
- Oña, C. (2020). *Germinación asimbiótica en condiciones in vitro de Oncidium pentadactylon y Elleanthus capitatus: orquídeas nativas del Ecuador* [Universidad San Francisco de Quito USFQ].
https://rrae.cedia.edu.ec/Record/USFQ_083db9b3e5156287ea94cbb37c376b5f
- Ortega, Y. (2020). *Caracterización citogenética de especies de Cícadas de Panamá (Zamia L.: Cycadales: Zamiaceae)*. Universidad de Panamá.
- Osorio, A., & Arzate, A. (2022). Inducción de poliploidía en plantas de Agave marmorata Roetzl mediante el uso de colchicina, como estrategia de mejoramiento genético. *Agrociencia*.
<https://doi.org/10.47163/agrociencia.XXX.XXX>
- Paredes, E. (2012). *Determinación de los protocolos para cultivo in vitro de las especies Epidendrum schistochilum y Oncidium cultratum* [Universidad Politécnica Salesiana].
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4072>
- Paredes, J., & Guapisaca, J. (2019). *Propuesta para el diseño de una ruta turística de las orquídeas en los cantones Pastaza y Mera, provincia de Pastaza*. [Universidad Estatal Amazónica].
<https://repositorio.uea.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/770/T.TUR.B.UEA.%20%204191.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Paredes, R. (2015). *Creación de un orquideario como atractivo turístico en el Centro*

Ecoturístico Altamira de Echeandía [Instituto Tecnológico Cordillera].
<https://www.dspace.cordillera.edu.ec/items/f247ae0d-99c6-48b2-9494-8e945df87c7e>

Peñaloza, J., Peres, C., & Rodríguez, M. (2023). *Evaluación de la respuesta fisiológica a la aplicación foliar de dos fertilizantes de una especie silvestre del género Vanilla, colectada en la vereda Lourdes del municipio de Villavicencio* [Corporación Universitaria Minuto de Dios].

<https://repository.uniminuto.edu/bitstream/10656/17660/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20respuesta%20fisiol%C3%B3gica%20a%20la%20aplicaci%C3%B3n%20foliar%20de%20dos%20fertilizantes%20de%20una%20especie%20silvestre%20del%20g%C3%A9nero%20Vanilla%2C%20colectada%20en%20la%20vereda%20Lourdes%20del%20municipio%20de%20Villavicencio.pdf>

Pérez, B., & Castañeda, S. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal*.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/519/pdf>

Pérez, F., & Pita, J. (2016). *Viabilidad, Vigor, Longevidad y Conservación de semillas*.
<https://www.coiaclc.es/wp-content/uploads/2016/05/Viabilidad.pdf>

Pintos, B., Martín, L., & Gómez, A. (2014). Agentes antimutógenos en la obtención de plantas doble-haploides. *Reduca (Biología)*. *Serie Botánica*, 7(2), 12–18.
<http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1595>

Ponce, M. (2023). “Evaluación de la dosis de BAP, Kinetina, AIA y ANA en explantes de orquídeas silvestres” [Universidad de las Fuerzas Armadas].
<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/browse?type=subject&order=ASC&rpp=20&value=ORQU%C3%8DDEAS>

Rodríguez, M. (2018). *Cultivo in vitro: alternativa al cultivo tradicional de plantas*

medicinales.

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf>

Ruiz, A. (2020). *Germinación asimbiótica in vitro de Sobralia macrantha Lindl. una orquídea terrestre nativa de México* [Universidad Nacional Autónoma de México].
<https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000804010/3/0804010.pdf>

Sahagun, B. (1975). *Historia general de las cosas de Nueva España*.
http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1080012524_C/1080012524_T1/1080012524_MA.PDF

Salazar, S., & Botello, E. (2018). Viabilidad de semillas de *Glycine Max (L.)* utilizando la prueba de tetrazolio. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(2).
<https://doi.org/10.22490/21456453.2270>

Salazar, S., Botello, E., & Quintero, J. (2020a). *Efecto de pretratamientos en la prueba de tetrazolio en semillas de Epidendrum barbaricum Hágsater y Dodson*.

Salazar, S., Botello, E., & Quintero, J. (2020b). Tetrazolium test optimization to evaluate the viability of *Solanum lycopersicum L.* seeds. *Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 21(3).
https://doi.org/10.21930/RCTA.VOL21_NUM3_ART:1344

Salazar, S., Valderrama, G., & Quintero C, J. (2018). Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H.Perrier (Crassulaceae). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(1), 212–222.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7059>

Salinas, I. (2005). *Estudio taxonómico del orden Scrophulariales (Magnoliopsida) en los bosques montanos húmedos de Carpath (Dpto. Huánuco, Perú)* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1390/Salinas_hi.pdf?seq

uence=1

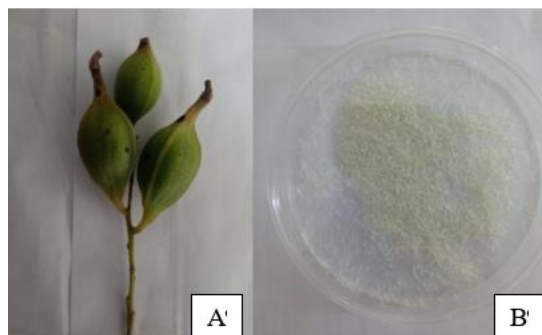
- Smith, J. J., & Soetopo, L. (2018). *In vivo polyploid-induction by colchicine on orchids phalaenopsis pulcherrima*. <https://www.researchgate.net/publication/326845162>
- Suárez, I. (2020). *Tejidos vegetales*. <https://unilibros.co/gpd-cultivo-de-tejidos-vegetales-9789585104099.html>
- Szlachetko, 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>
- Téllez, V., & Tejada, S. (2018). La importancia de los aromas en la polinización de las orquídeas. *Agro Productividad*, 6(3), 43. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/463>
- The Plant List. (2023, September 26). *A working list of all plants species*.
- Tropicos. (2023). *Caucaea pichincae Szlach. & Kolan. Caucaea Pichincae Szlach. & Kolan.*, *Polish Bot. J.* 60(2): 129. 2015.
- Umbriago, L., Pandolfo, C. E., Francisco, M., & Carbonell, T. (2021). *Técnicas para la obtención y evaluación de tetra-ploides en Lolium perenne*.
- Varela, A., & Ron, S. (2022, October 4). *Geografía y clima del Ecuador*.
- Vasco, C. (2020). *Evaluación de enraizamiento in vitro y aclimatación de plántulas de la orquídea Epidendrum ibaguense*. [Universidad Militar Nueva Granada]. <https://repository.unimilitar.edu.co/handle/10654/35961>
- Velasco, I., & Arzate, A. (2022). *Analysis of the somoclonal variation in two in vitro regenerated agave species*. <https://www.researchgate.net/publication/360450721>
- Vilcherrez, J. (2022). *Obtención de poliploides in vivo e in vitro de Brassolaeliocattleya*.
- Zamora, E. (2021). *Uso de la citocinina TDZ (Thidizuron) para la micropropagación de la*

orquídea Phalaenopsis [Universidad de Guayaquil].

<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/53153>

8. Anexos:

Capsulas de la especie *Caucaea pichincae*



Anexo 1 Recolección de capsulas de la especie *Caucaea pichincae*

Nota: A: cápsulas maduras de la orquídea *Caucaea pichincae*, B: extracción de semillas *Caucaea pichincae*

Fuente: (Las autoras, 2023)

Tabla 5

Protocormos en proceso de desdiferenciación viables después de la siembra realizada a través de la técnica de la jeringuilla.

Tiempo	Protocormos	Callos
	Viables	Viables
Primer mes	0	0
Segundo mes	0	0
Tercer mes	240	120
Cuarto mes	493	472
Quinto mes	167	108
TOTAL	900	700

Fuente: (Las autoras, 2023)