



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

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE
ORQUÍDEAS NATIVAS DEL ECUADOR**

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

**AUTORES: LANNER ANDRES CABRERA VICUÑA
LIZBETH PAREDES GRANDA**

TUTOR: MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito-Ecuador

2024

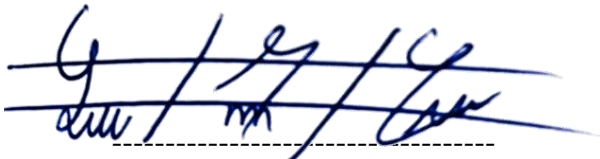
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, LANNER ANDRES CABRERA VICUÑA, con documento de identificación N° 1400759146 y LIZBETH PAREDES GRANDA con documento de identificación N° 1753850922 manifestamos que:

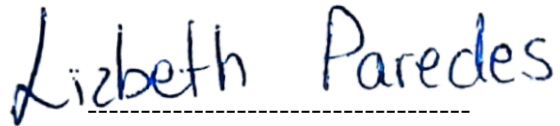
Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 07 de Agosto del año 2024

Atentamente,



LANNER ANDRES CABRERA VICUÑA
Ced: 1400759146



LIZBETH PAREDES GRANDA
Ced:1753850922

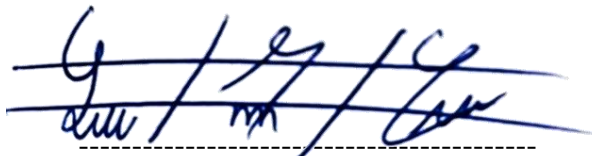
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, LANNER ANDRES CABRERA VICUÑA con documento de identificación No, 1400759146 y LIZBETH PAREDES GRANDA con documento de identificación No. 1753850922 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: “Evaluación comparativa de métodos de criopreservación de orquídeas nativas del Ecuador”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

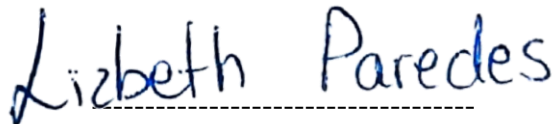
En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 07 de Agosto del año 2024

Atentamente,



LANNER ANDRES CABRERA VICUÑA
Ced: 1400759146



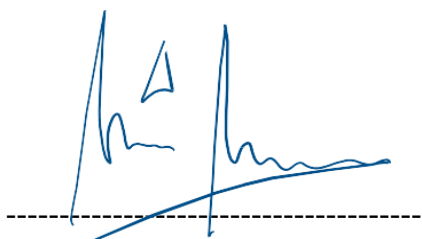
LIZBETH PAREDES GRANDA
Ced:1753850922

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: EVALUACIÓN COMPARATIVA DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL ECUADOR, realizado por LANNER ANDRES CABRERA VICUÑA con documento de identificación N° 1400759146 y por LIZBETH PAREDES GRANDA con documento de identificación N° 1753850922, 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, 07 de Agosto del año 2024

Atentamente,



Ing. MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS, PhD.

0501872071

Resumen

En los últimos años, la conservación de especies vegetales ha sido un tema de gran importancia debido a la necesidad de mantener la biodiversidad y los ecosistemas equilibrados, en Ecuador, la familia Orchidaceae presenta un alto nivel de endemismo, lo que hace esencial investigar alternativas para su conservación. El estudio presentado realiza una revisión bibliográfica enfocada en la criopreservación de semillas de orquídeas de los géneros *Elleanthus*, *Epidendrum* y *Sobralia*.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar y comparar los métodos de criopreservación utilizados para estas orquídeas, identificando los protocolos más eficientes para mantener la viabilidad y turgencia de las semillas, se examinaron diferentes métodos de preparación y almacenamiento, así como el uso de crioprotectores y técnicas de congelación, para establecer un protocolo óptimo.

Los resultados indican que la criopreservación es una técnica viable para la conservación a largo plazo de las semillas de orquídeas, los métodos evaluados, como la vitrificación y el enfriamiento controlado, muestran beneficios significativos en la preservación de la viabilidad y la integridad estructural de las semillas, además, se destacan los beneficios de los bancos de germoplasma como una herramienta esencial para la conservación de la biodiversidad. Este trabajo subraya la importancia de la criopreservación en la conservación de especies nativas de orquídeas en Ecuador la implementación de protocolos adecuados y el establecimiento de bancos de germoplasma son fundamentales para asegurar la supervivencia de estas especies en el largo plazo.

Palabras clave: Orchidaceae, Endemismo, Viabilidad, Bancos de germoplasma, Biodiversidad

ABSTRACT

In recent years, the conservation of plant species has been a topic of great importance due to the need to maintain biodiversity and balanced ecosystems. In Ecuador, the Orchidaceae family exhibits a high level of endemism, making it essential to explore alternatives for its conservation. The presented study conducts a literature review focused on the cryopreservation of orchid seeds from the genera *Elleanthus*, *Epidendrum*, and *Sobralia*.

The main objective of this work is to evaluate and compare cryopreservation methods used for these orchids, identifying the most efficient protocols to maintain seed viability and turgor. Various preparation and storage methods were examined, along with the use of cryoprotectants and freezing techniques, to establish an optimal protocol.

The results indicate that cryopreservation is a viable technique for the long-term conservation of orchid seeds. Evaluated methods such as vitrification and controlled cooling show significant benefits in preserving seed viability and structural integrity. Additionally, the benefits of germplasm banks are highlighted as an essential tool for biodiversity conservation. This study underscores the importance of cryopreservation in conserving endemic orchid species in Ecuador. The implementation of appropriate protocols and the establishment of germplasm banks are crucial to ensure the long-term survival of these species.

Keywords: Orchidaceae, Endemism, Viability, Germplasm Banks, Biodiversity

Índice

1.	Introducción	1
2.	Marco teórico	4
2.1	Orquídeas	4
2.1.1	Hábitat	4
2.1.2	Taxonomía	5
2.1.3	Morfología.....	5
2.1.4	Flor.....	6
2.1.5	Tallo.....	7
2.1.6	Semillas.....	8
2.1.6.1	Descripción de la anatomía y fisiología de las semillas de orquídeas	9
2.1.6.1.1	Cubierta seminal.....	9
2.1.6.1.2	Endospermo.....	9
2.1.6.1.3	Embrión.....	9
2.1.6.1.4	Tolerancia al frío.....	10
2.2	Orquídeas en el Ecuador.....	10
2.2.1	Distribución de orquídeas nativas en Ecuador	10
2.2.2	Género <i>Elleanthus</i>	11
2.2.2.1	Morfología de las Orquídeas del Género <i>Elleanthus</i>	11
2.2.2.2	Semillas de las Orquídeas del Género <i>Elleanthus</i>	14
2.2.3	Genero <i>Epidendrum</i>	16
2.2.3.1	Morfología de las Orquídeas del Género <i>Epidendrum</i>	16
2.2.3.2	Semillas de las Orquídeas del Género <i>Epidendrum</i>	19

2.2.4	Género <i>Sobralia</i>	20
2.2.4.1	Morfología de las Orquídeas del Género <i>Sobralia</i>	20
2.2.4.2	Semillas de las Orquídeas del Género <i>Sobralia</i>	22
2.3	Criopreservación	23
2.3.1	Preparación de las semillas para criopreservación.....	23
2.3.2	Selección y aplicación de crioprotectores	24
2.3.3	Técnicas de congelación.....	24
2.3.4	Ventajas de la criopreservación	25
2.3.5	Métodos de criopreservación.....	25
2.3.5.1	Congelación lenta.....	25
2.3.5.2	Congelación rápida o vitrificación.....	26
2.1	Viabilidad de semillas de orquídeas	26
2.2	Bancos de germoplasma	27
2.2.1	Características morfológicas y estructurales.....	28
2.2.1.1	Integridad física.....	29
2.2.1.2	Tamaño y forma	29
2.2.1.3	Color	29
2.1.1.1	Contenido de humedad.....	30
2.1.1.2	Viabilidad y germinación	30
2.1.1.3	Presencia de estructuras de protección	31
2.1.1.4	Compatibilidad con el método de conservación	31
2.1.1.5	Condiciones óptimas de almacenamiento	31
3.	Materiales y métodos.....	32
3.1	Diseño (Revisión y Análisis).....	32
3.2	Estrategia de búsqueda.....	33

3.2.1	Términos de búsqueda.....	33
3.3	Criterios de inclusión y exclusión	33
3.3.1	Criterios de inclusión.....	34
3.3.2	Criterios de exclusión	34
3.5	Análisis de datos.....	35
3.5.1	Descripción de la anatomía y fisiología de las semillas de orquídeas	35
3.6	Herramientas de gestión de referencias	36
4	Resultados y Discusión	37
4.1	Genero <i>Elleanthus</i>	37
4.2	Genero <i>Epidendrum</i>	39
4.3	Genero <i>Sobralia</i>	40
4.4	Procesos de criopreservación	41
4.4.1	Vitrificación y Protocolo	41
4.4.2	Enfriamiento Controlado y Protocolo.....	43
4.4.3	Uso de Crioprotectores	45
4.5	Beneficios de los Bancos de Conservación de Semillas	45
5	Conclusiones	47
6	Recomendaciones.....	49
7	Bibliografía	50

Índice de Figuras

Figura 1. Crecimiento de las orquídeas según su eje de crecimiento	6
Figura 2. Estructura floral de Orchidaceae	7
Figura 3. Semilla de orquídea.....	8
Figura 4. Morfología del Género <i>Elleanthus</i> especie de orquídea epífita	12
Figura 5. Inflorescencia del género <i>Elleanthus oliganthus</i>	13
Figura 6. Estructura de semilla de la especie <i>Elleanthus capitatus</i>	15
Figura 7. Morfología de orquídeas de la especie <i>Epidendrum</i>	17
Figura 8. Inflorescencias de la especie <i>Epidendrum genus</i>	18
Figura 9. Semillas de las Orquídeas del Género <i>Epidendrum</i>	19
Figura 10. Morfología de la orquídea del género <i>Sobralia</i>	21
Figura 11. Vista de semilla del género <i>Sobralia</i> en el microscopio	22
Figura 12. Método de vitrificación de muestras	26
Figura 13. Bancos de germoplasma realizados en tubos de ensayo en condiciones controladas	28
Figura 14. Características morfológicas y estructurales de semillas , color , forma ,etc.	30
Figura 15. Estructura de semilla vista al microscopio genero <i>Ellanthus</i>	38
Figura 16. Semillas del género <i>Epidendrum</i> vista al microscopio	40

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica.....	5
Tabla 2 Tipos de crioprotectores.....	24

1. Introducción

De acuerdo con Apolo (2021), las orquídeas son parte crucial del ecosistema ecuatoriano, abarca una amplia diversidad de especies que enriquecen notablemente su biodiversidad, sin embargo, su supervivencia está en peligro porque su hábitat ha sido destruido.

Las orquídeas nativas de Ecuador enfrentan amenazas significativas, la razón de la tala ilegal de árboles, el desarrollo urbano y la deforestación para la expansión agrícola, además Baranow (2023), encontró que la degradación es causada por actividades mineras en las zonas andinas del país también contribuye a su deterioro, estas presiones antropogénicas, junto con el cambio climático, plantean desafíos para su conservación.

Dada esta situación crítica, resulta imperativo explorar y poner en práctica enfoques de conservación innovadores destinados a salvar las orquídeas autóctonas del Ecuador, la criopreservación, una técnica emergente, se presenta como una solución prometedora que puede complementar los métodos convencionales de conservación (Trujillo, 2022).

Ordoñez (2019), dentro de esta investigación documental caracteriza la criopreservación como una técnica innovadora en la conservación de la biodiversidad que implica el almacenamiento a ultra baja temperatura de material genético, incluidas las semillas, con el fin de mantener su viabilidad a largo plazo, en el caso específico de las orquídeas, Karremans (2023) establece que comprender la morfología de sus semillas es esencial para optimizar los protocolos de criopreservación, ya que actúa en la selección de los métodos de deshidratación, la preparación de las muestras y sus condiciones de almacenamiento.

Los bancos de germoplasma son instituciones dedicadas a la conservación y almacenamiento de material genético de plantas, animales, microorganismos y otros organismos vivos, estos

bancos desempeñan un papel muy importante en la preservación de la diversidad biológica y en la seguridad alimentaria, ya que resguardan la información genética necesaria para el mejoramiento genético de cultivos, la investigación científica y la restauración de ecosistemas (Guamán, 2021).

En conjunto estas razones proyectadas por Vendrame et al. (2019), respaldan el objetivo del presente estudio que consiste en sintetizar las metodologías existentes en la literatura científica relacionada con la criopreservación de material vegetal, con un enfoque específico en orquídeas nativas de Ecuador, destacando el uso de crioprotectores, la aplicación de técnicas de enfriamiento y bancos de germoplasma.

Así también Pereira (2021), destaca la importancia de describir la anatomía y fisiología de las semillas de orquídeas nativas del Ecuador, resaltando sus características morfológicas y estructurales relevantes para la criopreservación, a partir de una revisión de la literatura científica, detallando la metodología de criopreservación de semillas de orquídeas considerando aspectos como los protocolos de preparación de las semillas, la selección de crioprotectores, las técnicas de congelación, así como las condiciones óptimas de almacenamiento mediante el estudio crítico de investigaciones previas.

Dentro de esta investigación se presentarán los beneficios de los bancos de conservación de semillas como herramienta estratégica para la investigación científica sobre la conservación y el manejo de orquídeas para mantener poblaciones viables fuera de su hábitat natural, y mejorar la eficacia de la conservación de estas especies en riesgo y su diversidad genética a largo plazo enfocándonos específicamente en orquídeas de los géneros: *Elleanthus*, *Epidendrum*, *Sobralia*.

Esta investigación documental es de vital importancia por su aporte a la conservación de la biodiversidad vegetal y la preservación de especies endémicas y nativas en peligro, la criopreservación de semillas ofrece una estrategia innovadora para almacenar su diversidad genética a largo plazo (Mora et al., 2018), además Kumar (2024), expone que esto tiene un impacto directo en la investigación científica y tecnológica en biotecnología vegetal, beneficiando tanto a la comunidad científica como a las comunidades locales que necesitan de estos recursos naturales.

2. Marco teórico

2.1 Orquídeas

Las orquídeas son parte de las monocotiledóneas, plantas herbáceas y perennes, con aproximadamente 25,000 especies y 800 géneros. El término "orquídea" proviene del latín "orchis", se menciona por primera vez en un manuscrito del filósofo griego *Theophrastus* (371-285 a.C.), y hace referencia a los pseudobulbos de algunas especies (Kolanowska, 2021).

Bitty (2018), plantea que estas plantas se distinguen principalmente por sus hermosas y delicadas flores, que exhiben una amplia diversidad de colores y formas a pesar de esta singularidad, comparten características estructurales comunes con otras plantas, incluyendo raíces, tallos, hojas, flores y frutos, las raíces de las orquídeas cumplen funciones fundamentales en el anclaje, la absorción de agua y nutrientes del suelo .

En cuanto a su anatomía floral, Baquero (2019), las describe con dos sépalos que son similares entre sí y un tercer sépalo, conocido como labelo, que es más grande y distintivo, el labelo se destaca por sus variadas formas y colores llamativos, la columna, situada en el centro del labelo, es una parte menos evidente de la flor, pero desempeña un papel importante en la reproducción de la planta.

2.1.1 Hábitat

De acuerdo con Das (2021), las orquídeas se dividen en diferentes categorías según el entorno en el que crecen:

- Epífitas: mayormente crecen sobre árboles, utilizando los árboles solo como soporte.

- Terrestres: se desarrollan en suelos compuestos por tierra y materia vegetal en descomposición.
- Litófitas: crecen sobre rocas, en pequeñas depresiones donde se acumulan.

2.1.2 Taxonomía

Tabla 1 Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae (vegetal)
División:	Angiospermas
Clase:	Monocotiledóneas
Orden:	Asparagales
Familia:	Orchidaceae

Fuente: (Jiménez, 2021)

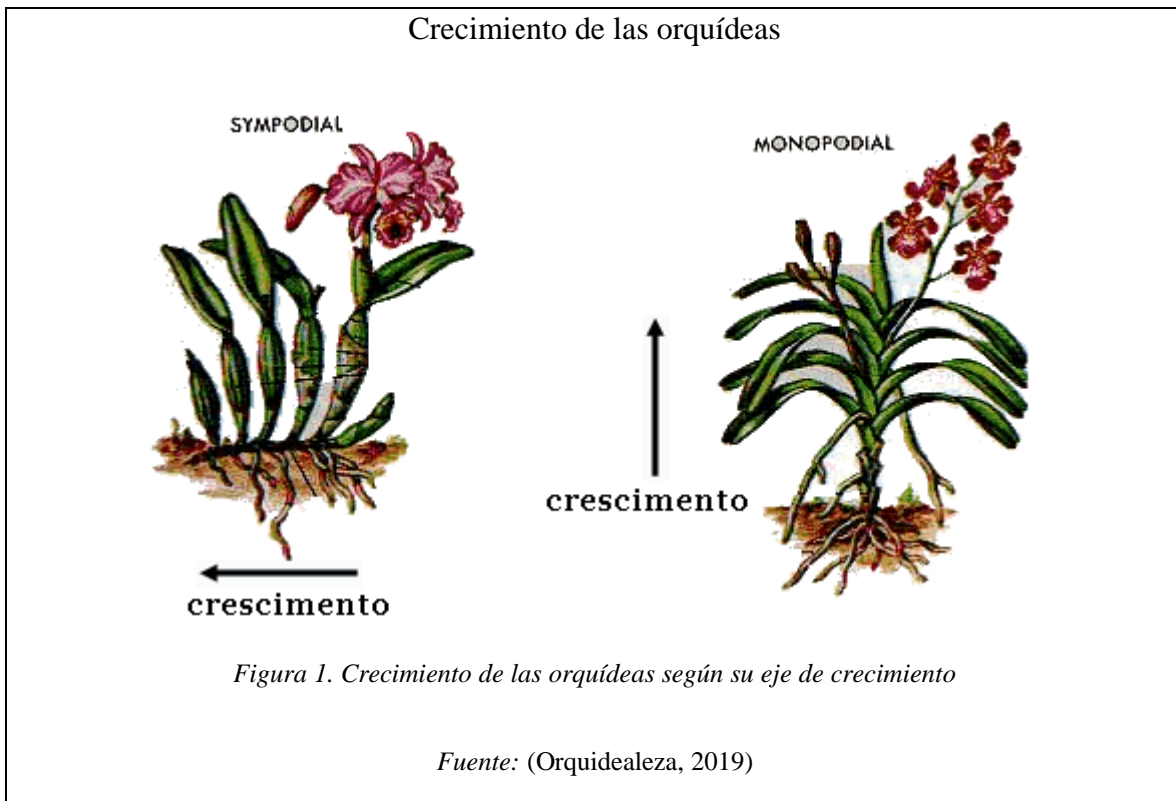
2.1.3 Morfología

La estructura de las orquídeas varía según su método de crecimiento, Freitas (2022), las divide en dos categorías principales: las monopodiales y las simpodiales, las primeras presentan un tallo que crece continuamente en dirección apical, con raíces distribuidas a lo largo de su longitud de forma indefinida por otro lado, las orquídeas simpodiales desarrollan tallos o pseudobulbos con un crecimiento definido ver (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), después de florecer, estas no continúan su crecimiento, sino que generan nuevos brotes a partir de una yema ubicada en la base del tallo .

Las orquídeas exhiben una amplia gama de adaptaciones morfológicas, como hojas carnosas que almacenan agua para soportar periodos de sequía, raíces aéreas, pseudobulbos para

almacenar nutrientes y agua, y diferentes tipos de crecimiento según el entorno en el que se desarrollan (Morales, 2021).

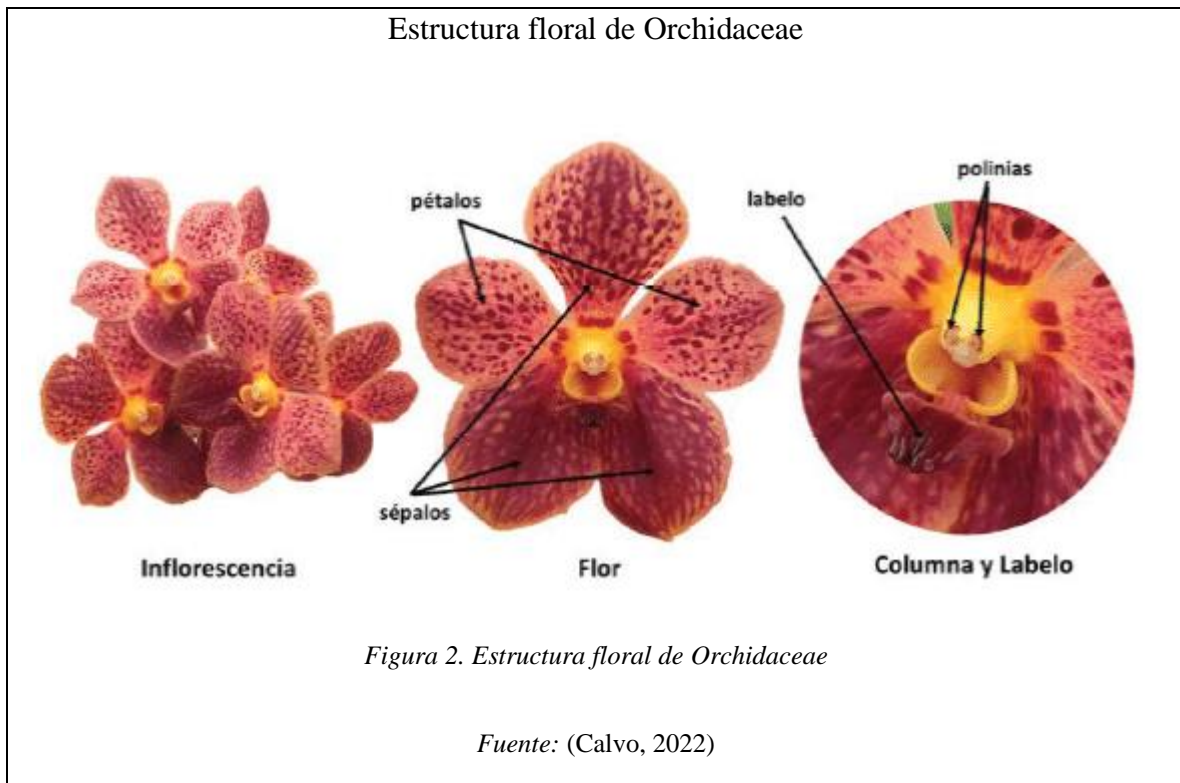
Las flores de estas plantas poseen atributos distintivos, mostrando una amplia variedad de tamaños que van desde unos pocos milímetros hasta 45 centímetros de diámetro, además, exhiben una diversidad de colores, incluyendo variantes multicolores (Salazar et al., 2022).



2.1.4 Flor

Alfaro (2023), describe la flor de estas orquídeas como hermafrodita y muestra una simetría bilateral (zigomorfa), está formada por tres sépalos (el cáliz) y tres pétalos (la corola); uno de estos pétalos, conocido como labelo, ha sufrido modificaciones especializadas, el labelo es la parte de la flor que ha desarrollado adaptaciones significativas para atraer a los insectos polinizadores, pudiendo tener características como callos, producir o generar néctar,

compuestos aromáticos además, envuelve una pieza central llamada columna, que alberga los órganos sexuales femenino y masculino, incluyendo el rostelo ver (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), una estructura puntiaguda que funciona como una barrera para evitar la autopolinización (Chen et al., 2020).



2.1.5 Tallo

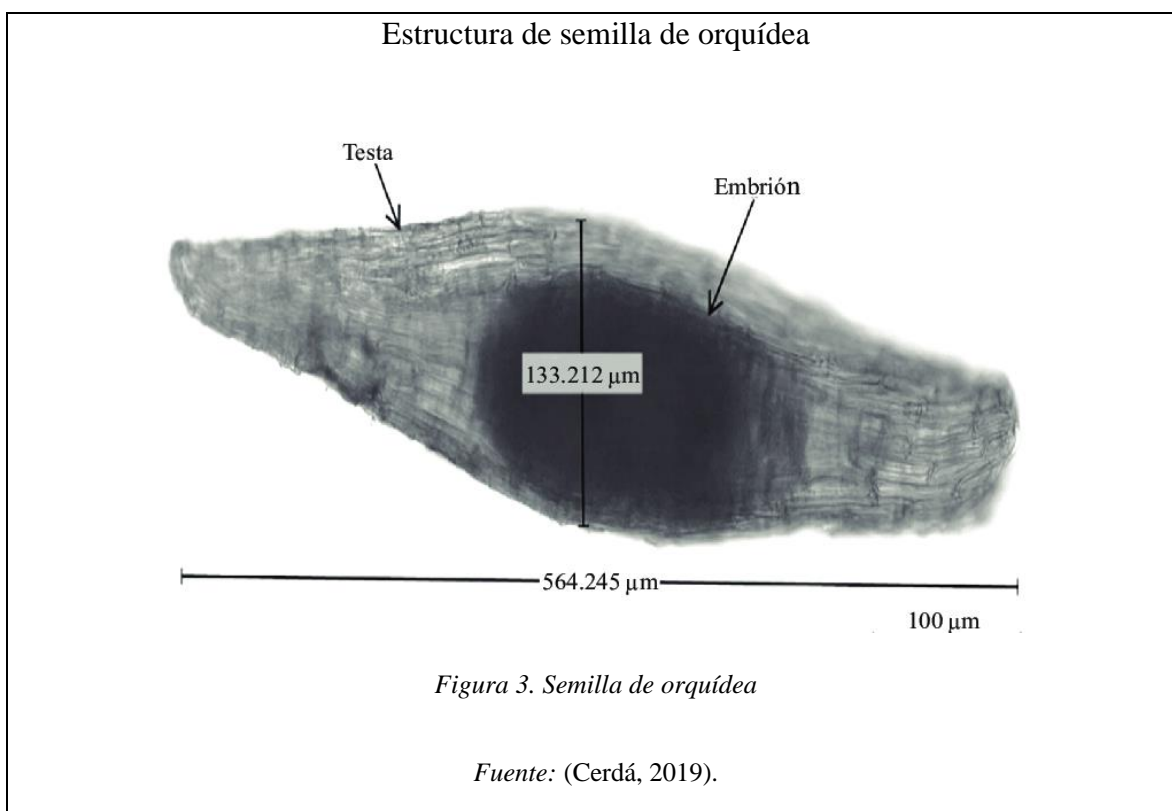
El tallo de las orquídeas se presenta en tres formas distintas: tallos cilíndricos, que son alargados y erectos, con entrenudos de los que emergen las hojas e inflorescencias; pseudobulbos, que son aéreos, engrosados y abultados; y cormos subterráneos gruesos, casi esféricos, con varios entrenudos (Yagame, 2024).

Las hojas de las orquídeas, típicas de las monocotiledóneas, presentan nervios paralelos prominentes y tienen forma alargada, pudiendo ser peninervadas o profundamente lobuladas

en algunas especies, estas hojas pueden variar en grosor, textura y forma, desde lineales, ovaladas o circulares, y se disponen alternadamente a lo largo del tallo (Jyothsna, 2024).

2.1.6 Semillas

Las semillas de las orquídeas según, Figueroa (2022), son diminutas con dimensiones que oscilan entre 0,4 y 1,25 mm de longitud, estas semillas contienen un embrión indiferenciado suspendido dentro de una estructura reticulada, conocida como la testa, y están rodeadas por un gran volumen de aire ver (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), lo que les permite flotar durante largos periodos, algunas especies pueden producir hasta 1,300 semillas por fruto, mientras que otras tienen la capacidad de producir hasta 4 millones de semillas, dado que las semillas carecen de reservas alimenticias (endospermo), requieren la presencia de un hongo para lograr su germinación.



2.1.6.1 Descripción de la anatomía y fisiología de las semillas de orquídeas

Dolce et al. (2020), han documentado una amplia variedad de adaptaciones anatómicas y fisiológicas que caracterizan a las semillas de orquídeas nativas de Ecuador, las cuales son importantes consideraciones en el contexto de la criopreservación.

A continuación, se destacan algunas de las características morfológicas y estructurales más relevantes.

2.1.6.1.1 Cubierta seminal

Las semillas de orquídeas están protegidas por una cubierta seminal especializada que puede variar en su grosor, textura y composición química, dicha cubierta desempeña un papel fundamental en la protección de las semillas contra condiciones ambientales adversas y en la regulación del intercambio gaseoso durante la germinación (Mátyás et al., 2018).

2.1.6.1.2 Endospermo

Muchas especies de orquídeas producen semillas con endospermo que Vaca (2019), lo describe como una reserva de nutrientes que proporciona energía para el desarrollo inicial del embrión durante la germinación, la composición y la disponibilidad de nutrientes en el endospermo pueden influir en la viabilidad y el éxito de la germinación de las semillas.

2.1.6.1.3 Embrión

El embrión de las semillas de orquídeas según Mites (2022), es relativamente pequeño y puede presentar una estructura compleja, con tejidos diferenciados que eventualmente darán lugar a la plántula, la viabilidad y el desarrollo del embrión pueden verse afectados por

factores como la calidad de la semilla, la madurez del fruto y las condiciones de almacenamiento.

2.1.6.1.4 Tolerancia al frío

Las semillas de orquídeas nativas de Ecuador pueden exhibir una variedad de mecanismos fisiológicos que les permiten tolerar bajas temperaturas durante el proceso de criopreservación, estos mecanismos pueden incluir la acumulación de azúcares y otros compuestos protectores, así como cambios en la estructura celular para evitar daños por congelación (Mahfeli et al., 2022).

2.2 Orquídeas en el Ecuador

Ecuador se destaca como uno de los 17 países más ricos en diversidad de plantas a nivel mundial, a pesar de ocupar menos del 0,2% de la superficie terrestre global, esta pequeña porción de tierra alberga la mayor concentración de especies por kilómetro cuadrado, en los últimos 13 años, se han documentado 2,433 especies vegetales nuevas en el país, de las cuales 1,663 son desconocidas para la ciencia (Padrón, 2023).

Actualmente, se han registrado 18,198 especies de plantas vasculares, siendo 17,748 de estas especies nativas, la familia Orchidaceae es especialmente notable, con 228 géneros y 4,300 especies, lo que significa que una de cada cuatro especies que se encuentran en los hábitats silvestres ecuatorianos es una orquídea (Arista, 2023).

2.2.1 Distribución de orquídeas nativas en Ecuador

Romero y Solano (2023), plantean que la diversidad de orquídeas en Ecuador abarca un rango altitudinal de 1,000 a 3,000 metros sobre el nivel del mar, con el 22% de las especies por

debajo de los 3,000 m y el 18% por encima, destacando su notable capacidad de adaptación para colonizar diversos ecosistemas en todas las regiones y altitudes del país.

Sin embargo, la conservación de la flora en Ecuador es un desafío, ya que cerca del 78% de las especies endémicas, que suman 3,504 especies, enfrentan algún grado de amenaza, entre ellas 353 especies (8%) están clasificadas como en peligro crítico de extinción (CR), 1,071 (24%) como en peligro (EN) y 2,080 (46%) como vulnerables (VU), en cuanto a las actividades de conservación *ex situ* en el país, estas se ven limitadas principalmente por restricciones financieras debido a los costos elevados asociados y la falta de un presupuesto asignado por el estado para estas labores (Vélez, 2022).

A continuación, se detallan los géneros evaluados en el presente estudio.

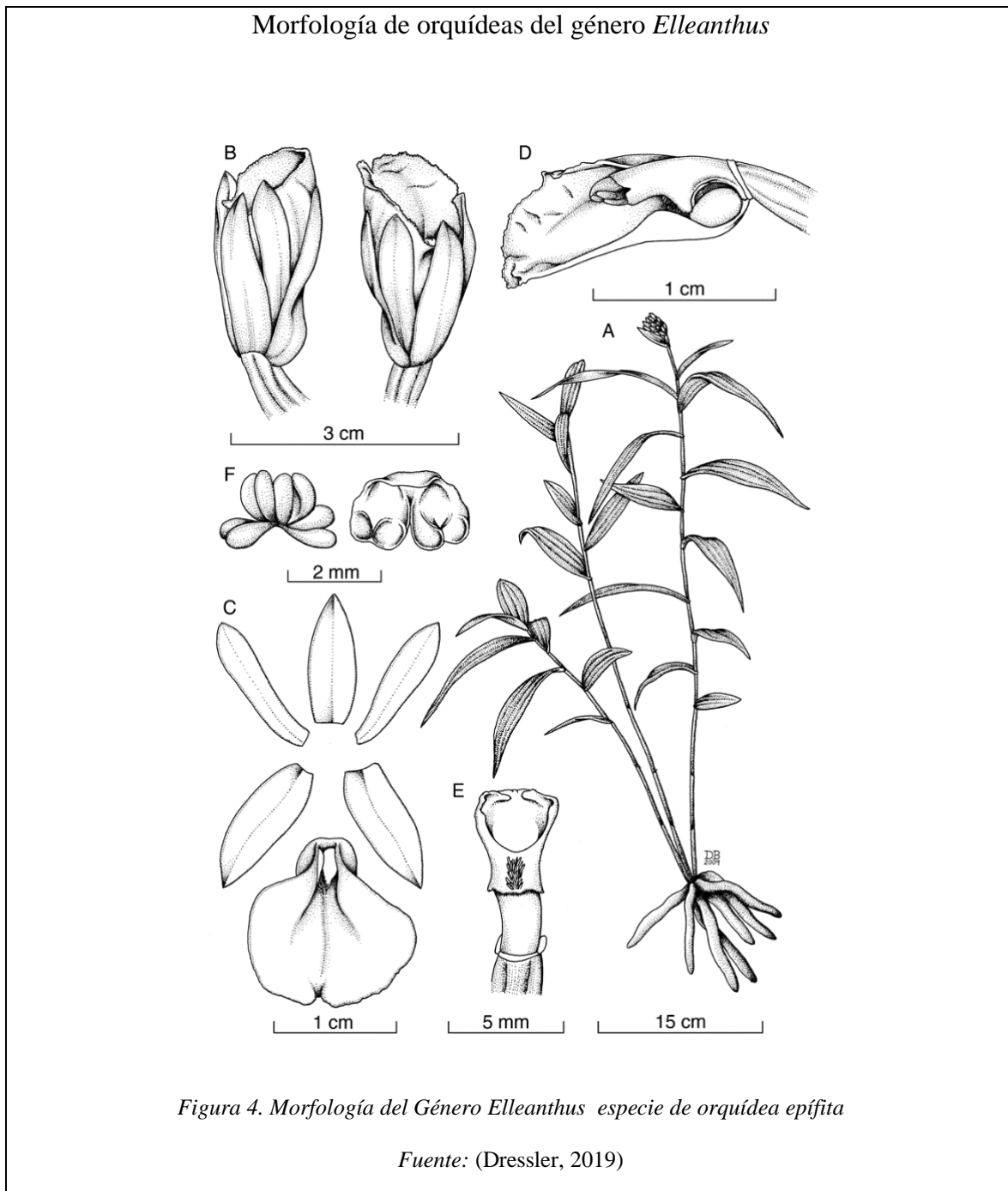
2.2.2 Género *Elleanthus*

El género *Elleanthus* es parte de la familia Orchidaceae y comprende alrededor de 59 especies de orquídeas nativas en Ecuador, distribuidas principalmente en las provincias de Pichincha y Cotopaxi, en altitudes entre 1,800 y 3,000 metros sobre el nivel del mar en zonas con alta precipitación y densos bosques, estas orquídeas presentan una amplia diversidad morfológica y son apreciadas tanto por su belleza ornamental como por su importancia ecológica (Santa Cruz, 2020).

2.2.2.1 Morfología de las Orquídeas del Género *Elleanthus*

Las orquídeas del género *Elleanthus* según Rykaczewski (2019), varían en tamaño desde especies pequeñas, con plantas que alcanzan apenas unos pocos centímetros de altura, hasta especies más grandes que pueden crecer hasta varios metros de altura, la forma de las plantas también varía, desde especies con hábito de crecimiento erecto hasta aquellas con hábito de

crecimiento más rastrero o colgante como la (Figura 4), las hojas de las orquídeas *Elleanthus* son generalmente alargadas, lanceoladas u oblongas, con márgenes enteros o ligeramente ondulados, la disposición de las hojas puede ser alternada o en espiral a lo largo del tallo.



Las inflorescencias de las orquídeas *Elleanthus* son racimosas o paniculadas, con flores que surgen de un tallo floral común, las flores pueden ser solitarias o están agrupadas en racimos densos, dependiendo de la especie, las flores de *Elleanthus* son pequeñas a medianas y presentan una amplia variedad de colores, que van desde el blanco hasta tonos más oscuros de rosa, morado y amarillo, la forma de la flor puede variar considerablemente entre las especies, pero generalmente consta de tres sépalos y tres pétalos como se muestra en la (Figura 5), uno de los cuales se modifica en el labelo, una estructura altamente especializada que sirve como plataforma de aterrizaje para los polinizadores (Dressler, 2020).

Inflorescencia del género *Elleanthus*



Figura 5. Inflorescencia del género *Elleanthus oliganthus*

Fuente: (Gardens, 2020)

Las raíces de las orquídeas *Elleanthus* suelen ser delgadas y fibrosas, con algunas especies que presentan raíces aéreas que pueden funcionar como estructuras de soporte o absorber humedad y nutrientes del aire (Vélez, 2023).

2.2.2.2 Semillas de las Orquídeas del Género *Elleanthus*

Kumar (2024), describe las semillas del género *Elleanthus* estructuras diminutas, pero altamente especializadas que desempeñan un papel fundamental en la reproducción y persistencia de estas orquídeas en su entorno natural, estas semillas exhiben diversas características morfológicas y estructurales que son relevantes para su criopreservación, son extremadamente pequeñas y ligeras, típicamente en el rango de micrómetros, con una forma ovalada o elipsoide y una superficie lisa y brillante ver (*Figura 6*), lo que facilita su manipulación durante el proceso de criopreservación, su tegumento, o cubierta externa, es delgado pero resistente.

Esto proporciona una barrera protectora contra daños físicos y químicos durante el almacenamiento a bajas temperaturas, a nivel celular, estas semillas están compuestas por una combinación de células vegetales especializadas, incluyendo células embrionarias y tejidos de almacenamiento de nutrientes, siendo importante seleccionar adecuadamente los crioprotectores y optimizar las condiciones de congelación para minimizar el daño celular (Marrero et al., 2019).

Estructura de semillas de las orquídeas del Género *Elleanthus*

Elleanthus capitatus



Figura 6. Estructura de semilla de la especie *Elleanthus capitatus*

Fuente: (Revista Bionatura, 2020).

Además Tsai y Chou (2020), establecen que el contenido de humedad de las semillas es crucial durante la criopreservación, ya que niveles inadecuados pueden afectar negativamente su viabilidad, siendo la deshidratación parcial antes del proceso una estrategia útil para mejorar su tolerancia al frío. La compatibilidad con hongos micorrícicos es esencial, dado que las semillas de *Elleanthus* dependen de la simbiosis con estos microorganismos para su germinación y establecimiento, lo que hace necesario considerar la influencia de los crioprotectores y las condiciones de almacenamiento en esta asociación simbiótica para asegurar la viabilidad a largo plazo de las semillas criopreservadas (Kolanowska, 2022).

Las semillas de orquídeas carecen de un endospermo nutritivo, en su lugar, estas diminutas semillas contienen un embrión rodeado por una envoltura protectora, compuesta por células delgadas y transparentes, conocida como tegumento, esta envoltura tiene una estructura única y altamente especializada que facilita la dispersión, la germinación y la posterior formación de una plántula, la criopreservación de semillas de orquídeas del género *Elleanthus* podría ofrecer una solución efectiva para conservar la diversidad genética de estas especies, garantizando su supervivencia en el futuro (Zhang, 2022).

2.2.3 Género *Epidendrum*

El género *Epidendrum* según Katoch (2024), se destaca dentro de la familia Orchidaceae por su notable diversidad, albergando 431 especies nativas en Ecuador, esta amplia variedad de orquídeas se distribuye en diversos hábitats, desde los exuberantes bosques tropicales de las provincias de Napo, Pastaza, Morona Santiago altitudes entre 300 y 1,000 metros sobre el nivel del mar, hasta los escarpados páramos de alta montaña, su adaptabilidad les permite prosperar en una variedad de condiciones ambientales, lo que contribuye a su éxito evolutivo y su presencia en una amplia variedad de ecosistemas.

2.2.3.1 Morfología de las Orquídeas del Género *Epidendrum*

La morfología de las orquídeas del género *Epidendrum* exhibe una sorprendente variedad, lo que las convierte en un objeto de fascinación para botánicos y amantes de las plantas, su hábito de crecimiento puede ser tan diverso como las especies mismas, incluyendo epífitas que se aferran a los árboles, terrestres que crecen en el suelo o litófitas que se adhieren a rocas, algunas especies presentan un crecimiento simpodial, caracterizado por la presencia de pseudobulbos o tallos que crecen horizontal o verticalmente, mientras que otras pueden carecer de ellos por completo (Pansarin, 2019).

Las hojas de *Epidendrum* también muestran una notable variación, con algunas especies exhibiendo hojas persistentes que permanecen en la planta durante todo el año, mientras que otras pueden perder sus hojas en ciertas épocas del año, estas hojas suelen ser alargadas y lanceoladas, con una disposición alternada a lo largo del tallo, lo que les permite captar la luz de manera eficiente (Alves et al., 2024).

Las inflorescencias de las orquídeas *Epidendrum* son otro aspecto destacado por Velázquez (2024), en su descripción de la morfología, agrupando las flores en racimos terminales o laterales que pueden ser tanto racimosos como paniculados como la (Figura 7), a disposición y cantidad de flores en estas inflorescencias pueden variar considerablemente entre las especies, desde aquellas que producen solo una flor hasta aquellas que forman racimos densos con numerosas flores.

Morfología de las orquídeas del género *Epidendrum*

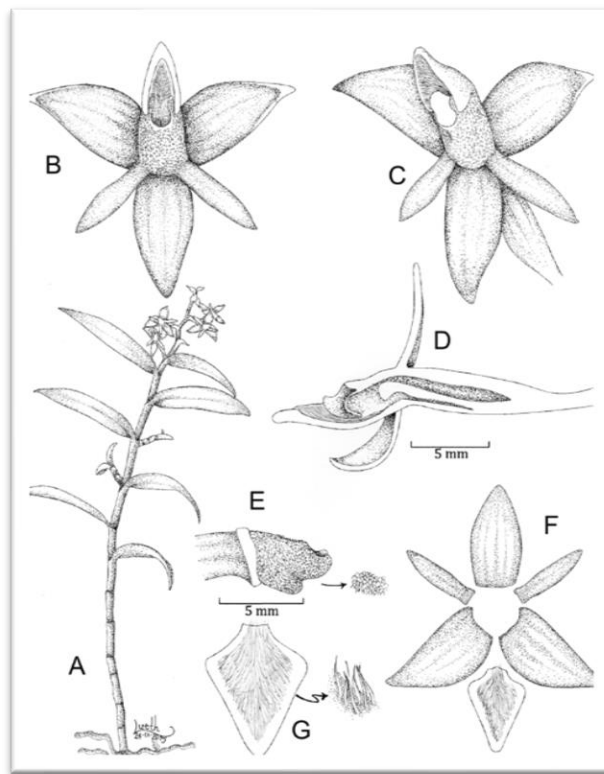


Figura 7. Morfología de orquídeas de la especie *Epidendrum*

Fuente: (Dressler, 2019)

En cuanto a las flores las orquídeas *Epidendrum* ofrecen una asombrosa diversidad en tamaño, forma y color, desde flores diminutas hasta flores grandes y llamativas, estas presentan una amplia gama de colores que van desde tonos suaves y delicados hasta colores vibrantes y llamativos ver (Figura 8), la estructura floral típica consta de tres sépalos y tres pétalos, con uno de los pétalos modificados en el labelo, una estructura altamente especializada que sirve como plataforma de aterrizaje para los polinizadores, mostrando adaptaciones únicas para atraer y garantizar la polinización (Diaz, 2020).

Inflorescencia del género *Epidendrum*



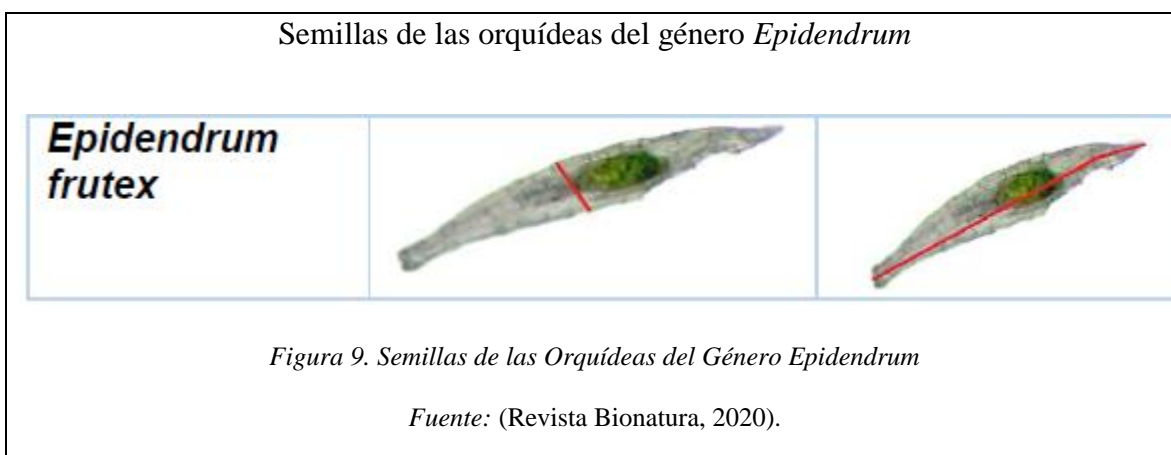
Figura 8. Inflorescencias de la especie *Epidendrum* genus

Fuente : (Alamy, 2023)

Las raíces de las orquídeas *Epidendrum* son otra característica morfológica importante para Quispe (2023), estas raíces suelen ser gruesas y carnosas, adaptadas para absorber la humedad y los nutrientes del aire y del sustrato en el que crecen, lo que les permite sobrevivir en una variedad de condiciones ambientales y sustratos diferentes.

2.2.3.2 Semillas de las Orquídeas del Género *Epidendrum*

Las semillas del género *Epidendrum* presentan una serie de características morfológicas y estructurales que son fundamentales para su conservación mediante criopreservación, estas semillas son pequeñas y ligeras, típicamente de tamaño microscópico, lo que las hace susceptibles a daños durante el proceso de manipulación y almacenamiento, su forma puede variar dependiendo de la especie, pero suelen ser ovaladas o elipsoides, con una superficie lisa y brillante ver (Figura 9), esta morfología compacta y uniforme facilita su manejo durante el proceso de criopreservación y ayuda a mantener la integridad estructural de las semillas durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Pupulin, 2023).



Una característica crítica de las semillas de *Epidendrum* es su tegumento, la cubierta externa que protege el embrión y los tejidos internos de la semilla, este tegumento puede ser delgado pero resistente, proporcionando una barrera protectora contra daños físicos y químicos durante la criopreservación y el almacenamiento a largo plazo, la integridad del tegumento es crucial para garantizar la viabilidad y la supervivencia de las semillas durante estos procesos (Nongsiang, 2023). A nivel celular las semillas de *Epidendrum* están compuestas por una combinación de células vegetales especializadas, incluyendo células embrionarias y

tejidos de almacenamiento de nutrientes, estas células son susceptibles al estrés durante el proceso de criopreservación, por lo que es importante seleccionar adecuadamente los crioprotectores y optimizar las condiciones de congelación para minimizar el daño celular, la preservación de la viabilidad celular es esencial para garantizar la capacidad de germinación y el desarrollo saludable de las semillas después de su descongelación (Welan, 2023).

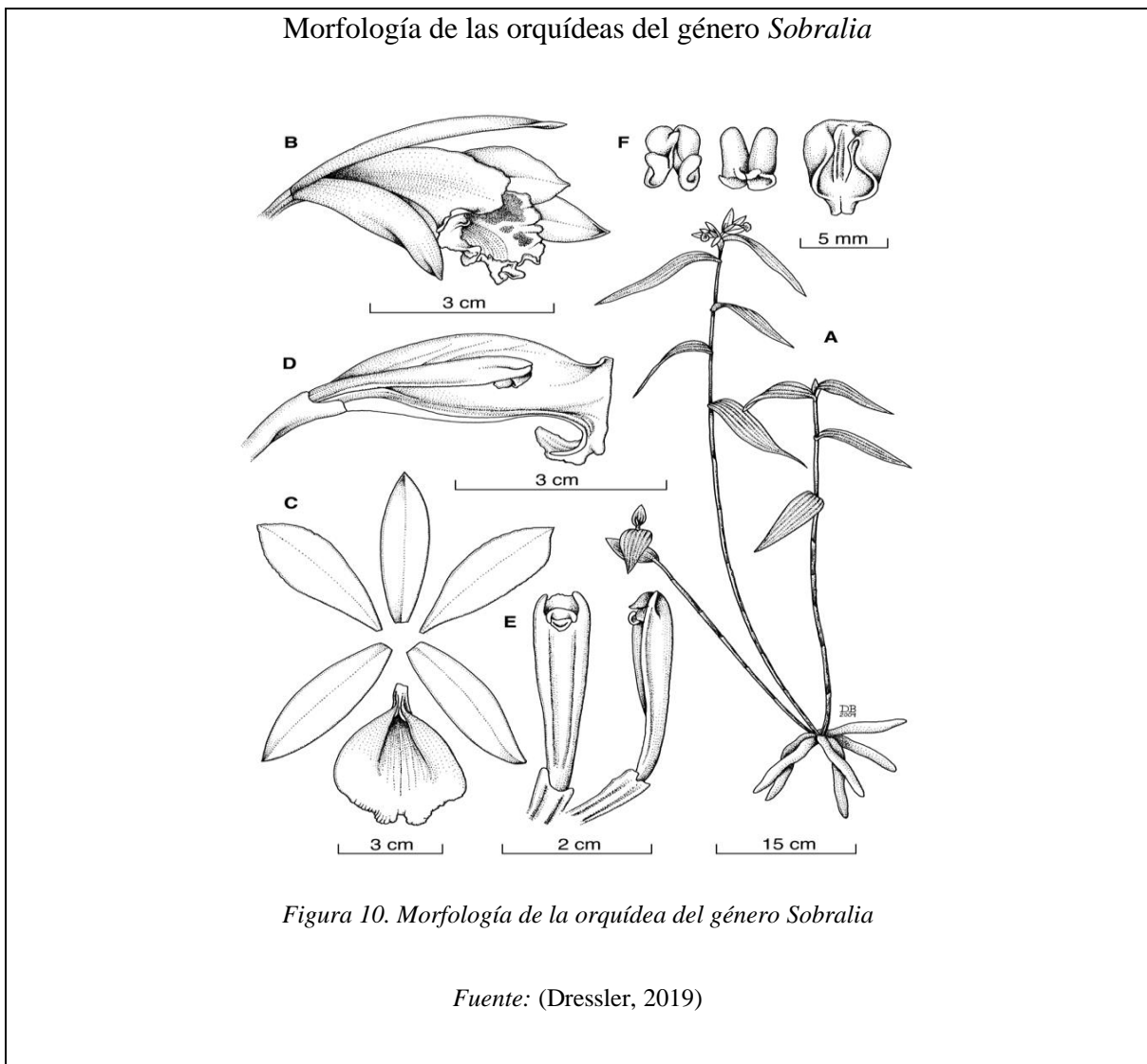
2.2.4 Género *Sobralia*

2.2.4.1 Morfología de las Orquídeas del Género *Sobralia*

Baranow et al. (2023), destacan al género *Sobralia* como un conjunto diverso de orquídeas que se encuentran predominantemente en América Central y América del Sur, en Ecuador existen alrededor de 40 especies de orquídeas nativas de este género que se hallan en la región sierra, específicamente en las provincias de Pichincha, Imbabura y Cotopaxi, en bosques montañosos y nublados a altitudes entre 1,500 a 3,000 metros sobre el nivel del mar, de igual manera las encontramos en la región costa, en las provincias de Esmeraldas y Manabí, a altitudes que van desde los 0 hasta los 500 metros, estas orquídeas, reconocidas por su amplia variedad morfológica, abarcan desde especies pequeñas y delicadas hasta plantas de gran tamaño con tallos robustos con flores llamativas, reflejando su adaptación a una extensa gama de hábitats con condiciones ambientales favorables.

Las orquídeas *Sobralia* exhiben una variedad de hábitos de crecimiento, adaptándose a su entorno de diferentes maneras, algunas especies presentan un crecimiento terrestre, arraigándose firmemente en el suelo, mientras que otras adoptan hábitos epífitos, aferrándose a los árboles o rupícolas, creciendo en las rocas, esta adaptabilidad les permite colonizar una amplia variedad de hábitats, desde selvas húmedas hasta regiones montañosas (Francisco, 2023).

Las hojas de *Sobralia*, con su forma lanceolada u ovalada según Bernal (2023), son una característica distintiva de estas orquídeas, estas hojas suelen tener nervaduras paralelas y se disponen alternadamente a lo largo del tallo, proporcionando una apariencia ordenada y estructurada a la planta, la duración de las hojas puede variar según la especie y el clima como la (Figura 10), siendo algunas caducas y otras perennes, lo que refleja su adaptación a los cambios estacionales.



Las raíces de *Sobralia* son generalmente fibrosas y están adaptadas para absorber la humedad y los nutrientes del sustrato en el que crecen, en especies epífitas, estas raíces pueden desempeñar un papel crucial en la fijación de la planta a su sustrato, permitiendo que la planta se mantenga en su posición elevada en los árboles o rocas (Zhou et al., 2021).

2.2.4.2 Semillas de las Orquídeas del Género *Sobralia*

Las semillas de *Sobralia* son tan pequeñas que pueden parecer polvo fino, estas semillas son generalmente dispersadas por el viento o por otros medios naturales, y pueden requerir la presencia de hongos específicos para germinar, este proceso, conocido como simbiosis micorrízica, es común en muchas especies de orquídeas y depende de una relación simbiótica entre la planta y ciertos hongos del suelo, es importante mantener el medio húmedo pero no empapado, ya que el exceso de humedad puede propiciar el crecimiento de hongos no deseados que podrían dañar las plántulas en desarrollo (Szlachetko, 2023).

Semillas de las orquídeas del género *Sobralia*

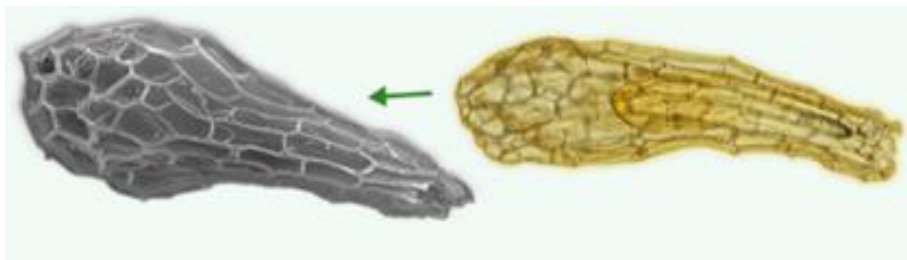


Figura 11. Vista de semilla del género *Sobralia* en el microscopio

Fuente: (Collier, 2023)

2.3 Criopreservación

La criopreservación de orquídeas busca asegurar la viabilidad, integridad y diversidad biológica de las semillas durante largos períodos de tiempo, las semillas se someten a un proceso de preparación antes de ser almacenadas a temperaturas extremadamente bajas, utilizando nitrógeno líquido u otras tecnologías de congelación avanzadas (Chithra, 2021).

Durante la criopreservación de semillas, se utilizan crioprotectores para prevenir daños celulares por la formación de cristales de hielo durante la congelación, estos agentes protegen las estructuras y componentes celulares, asegurando la viabilidad de las semillas, la selección y aplicación adecuada de crioprotectores son cruciales durante el proceso (Kulus, 2021).

Además Barros (2022), plantea que es necesario establecer condiciones óptimas de almacenamiento para las semillas criopreservadas implica mantener una temperatura constante y adecuada, así como niveles óptimos de humedad y otros factores ambientales, el monitoreo regular y mantenimiento de estas condiciones son esenciales para garantizar el éxito de la criopreservación.

La criopreservación de semillas de orquídeas en bancos de germoplasma o instalaciones especializadas, que pueden ser utilizados para la investigación, la reintroducción en la naturaleza y la conservación *ex situ*, contribuyendo así a la protección y la perpetuación de estas especies en peligro (Rajan et al., 2022).

2.3.1 Preparación de las semillas para criopreservación

Antes de iniciar el proceso de criopreservación Shi et al. (2023), recomiendan que las semillas de orquídeas deben ser sometidas a un protocolo de preparación que incluya la extracción de la cápsula de semillas de la planta madre, seguida de la eliminación de restos

de pulpa y suciedad mediante un lavado con agua y un agente desinfectante, posteriormente, las semillas pueden ser acondicionadas en una solución nutritiva durante un periodo de tiempo para mejorar su viabilidad y resistencia al estrés.

2.3.2 Selección y aplicación de crioprotectores

Para proteger las semillas durante el proceso de congelación, se pueden seleccionar crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMSO) o la glicerina dependiendo de las necesidades del investigador, se aplica sumergiendo las semillas en una solución de crioprotector durante un tiempo específico antes de la congelación (Pradhan et al., 2022).

Tabla 2 Tipos de crioprotectores

Tipo	Características	Ejemplos
Intracelulares	Bajo peso molecular, permeables al embrión	<ul style="list-style-type: none"> • Glicerol • DMSO • Etilenglicol
Extracelulares	Alto peso molecular , impermeables al embrión	<ul style="list-style-type: none"> • Sucrosa • Dextrosa • Glucosa

Fuente: (Zhao et al., 2024)

2.3.3 Técnicas de congelación

Una vez que las semillas han sido preparadas y tratadas con crioprotectores, Yang (2023), recomienda que sean congeladas utilizando una técnica de enfriamiento lento en un contenedor de nitrógeno líquido, durante la descongelación, las semillas se transfieren

gradualmente a una solución de rehidratación a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo para evitar el choque térmico y permitir su recuperación.

2.3.4 Ventajas de la criopreservación

La criopreservación de semillas de orquídeas ofrece una serie de beneficios clave, permite la conservación durante períodos prolongados sin perder su viabilidad y para mantener la diversidad genética, además, el almacenamiento a temperaturas ultra bajas garantiza la disponibilidad de las semillas para futuros usos, como la investigación científica y la horticultura, incluso en condiciones desfavorables para la germinación (Andriolli, 2023).

Diantina et al. (2023), concuerdan con que esta técnica también minimiza el riesgo de propagación de enfermedades o patógenos, al mantener las semillas en un estado de suspensión que evita la contaminación o degradación, permite almacenar una gran cantidad de semillas, lo que resulta especialmente útil en bancos de germoplasma y colecciones de conservación, optimizando el uso del espacio disponible.

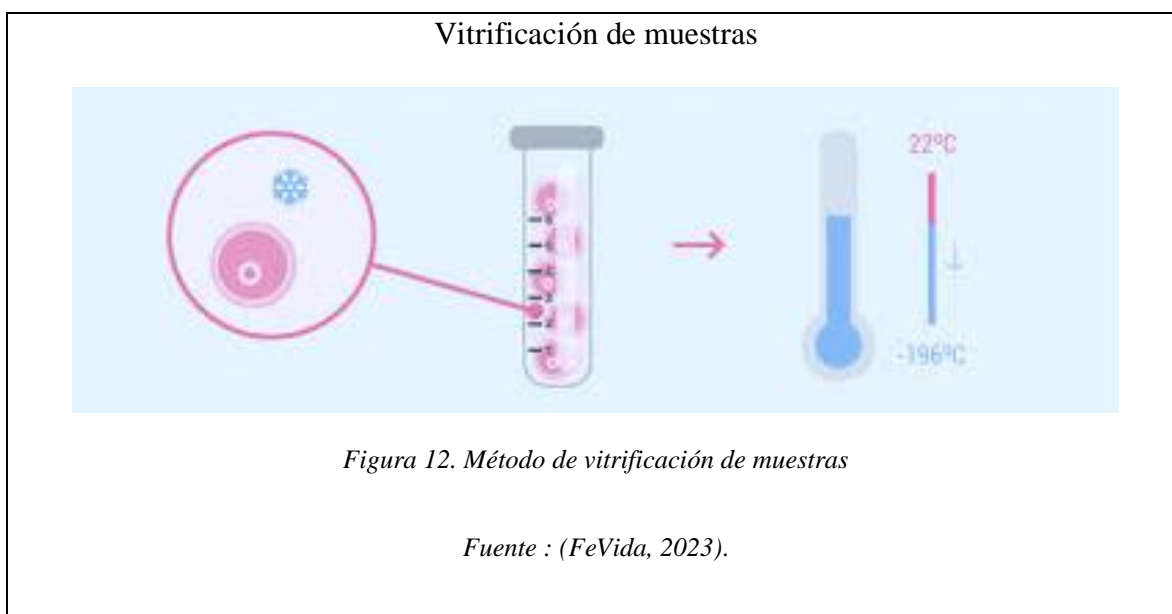
2.3.5 Métodos de criopreservación

2.3.5.1 Congelación lenta

Las muestras se enfrían mediante un sistema de enfriamiento programado, se añade un agente crioprotector para reducir el daño celular provocado por la creación de cristales de hielo y permite minimizar el agua en las células el estrés osmótico, daño celular, este método utilizado para la criopreservación de células y tejidos ofrece una tasa de supervivencia celular relativamente alta (Pereira, 2021).

2.3.5.2 Congelación rápida o vitrificación

Thammasiria (2021), establece que las muestras se congelan extremadamente rápido, en cuestión de segundos, utilizando una solución con altas concentraciones de agentes crioprotectores y evita la creación de cristales de hielo lo que resulta en una estructura vítrea amorfa en lugar de una estructura cristalina ver (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), la vitrificación se utiliza comúnmente para la criopreservación de óvulos, embriones y tejidos que son sensibles a los daños por cristales de hielo, utilizando nitrógeno líquido o la aplicación de enfriamiento por pulverización.



2.1 Viabilidad de semillas de orquídeas

La durabilidad de las semillas de orquídeas está vinculada a las condiciones en las que se almacenan, si se mantienen a temperatura ambiente 20 a 24 °C, muchas de ellas pierden rápidamente su capacidad para germinar, sin embargo, se puede prolongar su viabilidad almacenándolas a temperaturas más bajas junto con un desecante adecuado, como cloruro de calcio o silicagel (Schvambach, 2022).

Para evaluar la viabilidad de las semillas, se pueden realizar pruebas que determinen qué zonas de tejido han sufrido daños por el frío y cuáles han sobrevivido, estas pruebas pueden llevarse a cabo visualmente, mediante recultivo y evaluación de la capacidad de regeneración utilizando técnicas como el TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), que tiñe el tejido vivo, midiendo la conductividad eléctrica para estimar el daño en las membranas celulares (Decruse, 2023).

2.2 Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma para la criopreservación de semillas de orquídeas según Dolce (2020), representan verdaderos bastiones de conservación y conocimiento en la lucha por preservar la riqueza genética de estas fascinantes plantas, más que simples instalaciones de almacenamiento, son oasis tecnológicos donde se lleva a cabo una tarea esencial: resguardar el legado genético de las orquídeas para las generaciones presentes y futuras.

Estas instalaciones están meticulosamente diseñadas para mantener las semillas en un estado de dormancia, a temperaturas ultra bajas que desafían los límites de lo que es posible, el nitrógeno líquido, con su gélido abrazo a -196°C , se convierte en el guardián supremo de la viabilidad genética, asegurando que las semillas permanezcan virtualmente inmutables en el tiempo, sin perder su valiosa diversidad genética (Vettorazzi, 2019).

Bancos de Germoplasma



Figura 13. Bancos de germoplasma realizados en tubos de ensayo en condiciones controladas

Fuente: (Andina, 2019)

En un mundo donde las orquídeas enfrentan desafíos cada vez mayores, desde la pérdida de hábitat hasta el cambio climático, los bancos de germoplasma emergen como fortalezas de esperanza, conservando las semillas en condiciones criogénicas, estos bancos garantizan que la esencia misma de estas plantas esté resguardada como la (Figura 13), lista para ser utilizada en futuras investigaciones (Jiménez et al., 2024).

En la restauración de poblaciones de orquídeas en peligro, estos bancos de germoplasma se convierten en centros de conocimiento e innovación, donde se promueve la colaboración entre instituciones y se facilita el intercambio de material genético, en este ambiente de cooperación, se fomenta la investigación sobre la biología, la preservación y el aprovechamiento sostenible de las orquídeas (Gholami, 2021).

2.2.1 Características morfológicas y estructurales

Las características morfológicas y estructurales de las semillas de orquídeas destinadas al almacenamiento en bancos de germoplasma no solo son importantes para su conservación a

largo plazo, sino que también desempeñan un papel importante en la eficacia y viabilidad del proceso (Mayo, 2020).

2.2.1.1 Integridad física

La integridad de las semillas, es decir, su estado libre de daños visibles como roturas o deformaciones es crucial para garantizar que las células y estructuras internas permanezcan protegidas durante el almacenamiento, incluso pequeñas alteraciones pueden comprometer la viabilidad de las semillas y su capacidad para germinar cuando se requiera su uso (Handini, 2021).

2.2.1.2 Tamaño y forma

Las semillas de orquídeas pueden presentar una amplia variedad de tamaños y formas, lo que está estrechamente relacionado con las características de cada especie, la documentación precisa de estas características facilita su identificación y manipulación durante el proceso de almacenamiento y recuperación (Chen, 2010).

2.2.1.3 Color

Aunque el color de las semillas puede ser variable, la uniformidad en el tono puede indicar la madurez y calidad de estas, semillas de color oscuro suelen estar más maduras y ser más viables, mientras que cambios bruscos en el color pueden señalar posibles problemas de salud o madurez (Castro, 2022).

Características morfológicas y estructurales de semillas



Figura 14. Características morfológicas y estructurales de semillas , color , forma ,etc.

Fuente : (Villalobos, 2019)

2.1.1.1 Contenido de humedad

Antes de la criopreservación, las semillas deben deshidratarse adecuadamente para evitar la formación de cristales de hielo que podrían dañar las células durante el proceso de congelación, un contenido de humedad demasiado alto o bajo puede afectar negativamente la viabilidad de las semillas (Singh et al., 2022).

2.1.1.2 Viabilidad y germinación

La capacidad de las semillas para germinar después de ser almacenadas es esencial. Idealmente, se seleccionan semillas viables y capaces de germinar, pero también se pueden almacenar semillas maduras, pero no germinables para la conservación del material genético (Feng, 2019).

2.1.1.3 Presencia de estructuras de protección

Algunas semillas de orquídeas tienen estructuras adicionales que las protegen durante la dispersión, como cápsulas o envolturas. Estas estructuras pueden influir en la longevidad y viabilidad de las semillas durante el almacenamiento, y deben ser consideradas al seleccionar semillas para el banco de germoplasma (Bolaños, 2019).

2.1.1.4 Compatibilidad con el método de conservación

Las semillas deben ser adecuadas para el método específico de conservación utilizado en el banco de germoplasma, ya sea criopreservación, almacenamiento en seco o en solución. Cada método tiene requisitos específicos que las semillas deben cumplir para garantizar su conservación óptima (Chen, 2023).

2.1.1.5 Condiciones óptimas de almacenamiento

Después de la criopreservación Diantina et al. (2022), recomiendan que las semillas sean almacenadas en contenedores sellados dentro de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido a una temperatura constante de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, el tanque debe mantenerse en un entorno controlado para garantizar una temperatura estable y su monitoreo regularmente para asegurar que no haya fluctuaciones que puedan comprometer la viabilidad de las semillas.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño (Revisión y Análisis)

Se realizó una revisión exhaustiva de documentos provenientes de bases de datos confiables en línea, para esta investigación se utilizaron las páginas web: Google Scholar , según Oyibo (2022), esta base de datos proporciona una amplia cobertura en diversas áreas de investigación sobre la criopreservación de semillas de orquídeas a nivel de laboratorio permitiendo la búsqueda de artículos científicos revisados en revistas especializadas en botánica y conservación de orquídeas, como el Global Biodiversity Information Facility (GBIF) o el Index Herbariorum.

En el estudio, se analizó la crioconservación de semillas de orquídeas nativas de Ecuador, este se planificó de forma metódica y exigente. Se utilizó una combinación de frases de búsqueda generales y específicas para realizar una búsqueda exhaustiva en bases de datos científicas. Este enfoque permitió encontrar investigaciones pertinentes sobre todo tipo de temas, desde la morfología y la fisiología de las semillas hasta los métodos de congelación y el uso de crioprotectores. Los criterios de inclusión se eligieron en función de su valor para arrojar luz sobre la crioconservación; se eliminaron los que no cumplían los requisitos de calidad o carecían de relevancia temática. Para evaluar la idoneidad de las distintas técnicas de crioconservación en el entorno ecuatoriano, los datos recogidos se sometieron a un análisis exhaustivo.

3.2 Estrategia de búsqueda

Se utilizó una estrategia de búsqueda que incluyó la identificación de palabras clave relacionadas con la distribución geográfica de las orquídeas de los géneros *Ellanthus*, *Epidendrum* y *Sobralia* en Ecuador.

3.2.1 Términos de búsqueda

Los términos utilizados abarcaron tanto aspectos generales como específicos de la criopreservación y la botánica, además de la geografía particular de Ecuador.

En primer lugar, se incluyeron términos amplios como "criopreservación", "orquídeas" y "Ecuador", así también se utilizaron términos más específicos relacionados con aspectos particulares de la criopreservación de orquídeas, como "crioprotectores", "bancos de germoplasma", "semillas", "anatomía", "fisiología", "técnicas de congelación".

Estos términos facilitaron la búsqueda enfocándose en aspectos específicos de la criopreservación de orquídeas, incluyendo métodos de preservación, características anatómicas y fisiológicas de las semillas, y la importancia de los bancos de germoplasma para conservar la diversidad genética de estas especies.

3.3 Criterios de inclusión y exclusión

Se establecieron criterios precisos para seleccionar los estudios más pertinentes, excluyendo aquellos que no cumplieran con los objetivos específicos de la revisión o que no estaban directamente relacionados con la criopreservación de orquídeas nativas de Ecuador, estos

criterios se aplicaron de manera sistemática durante el proceso de selección y revisión de la literatura.

3.3.1 Criterios de inclusión

Los estudios deben abordar directamente la técnica que utilizaremos, en este caso la criopreservación de orquídeas o aspectos relacionados, como la anatomía y fisiología de las semillas, el uso de crioprotectores, las técnicas de congelación o el papel de los bancos de germoplasma en la conservación de orquídeas.

El enfoque geográfico nos permitió priorizar los estudios que se centraban en orquídeas nativas de Ecuador, con el fin de asegurar la relevancia de los hallazgos para el contexto específico de este país.

3.3.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión utilizados fueron los siguientes:

Relevancia Temática: Se omitieron los estudios que no estaban directamente relacionados con la criopreservación de orquídeas nativas de Ecuador o que abordaban temas no pertinentes para los objetivos de la revisión.

Acceso y Disponibilidad: Los estudios a los que no se pudo acceder a través de las bases de datos científicas o que no estaban disponibles.

Calidad Científica: Los estudios que no cumplían con los estándares de calidad científica, como la falta de revisión por pares o la ausencia de metodologías claras y replicables.

3.4 Extracción de datos

Se recopilaron un total de 112 estudios, de los cuales 42 fueron excluidos fueron descartados por no ser relevantes para los objetivos específicos de la revisión. Durante el proceso de extracción de datos, se examinaron minuciosamente los estudios seleccionados utilizando un enfoque sistemático para identificar información pertinente sobre la criopreservación de orquídeas nativas de Ecuador.

3.5 Análisis de datos

Se llevó a cabo un análisis crítico de los datos recopilados con el objetivo de evaluar tanto la eficacia como la aplicabilidad de las diversas metodologías de criopreservación en el contexto particular de las orquídeas nativas de Ecuador.

3.5.1 Descripción de la anatomía y fisiología de las semillas de orquídeas

Se realizó una exhaustiva revisión científica enfocada en la anatomía y fisiología de las semillas de orquídeas nativas de Ecuador, destacando aspectos morfológicos y estructurales esenciales para su criopreservación, durante este proceso, se identificaron factores anatómicos y fisiológicos clave que influyen en la viabilidad y tolerancia al frío de las semillas durante la criopreservación, se analizó detalladamente la composición de la cubierta seminal, el nivel de humedad presente en las semillas y su madurez al momento de la recolección, elementos cruciales para comprender cómo responden las semillas al proceso de criopreservación y para el desarrollo de métodos efectivos de conservación.

Además, se revisaron meticulosamente los protocolos de preparación de las semillas, abordando procedimientos de limpieza, desinfección, y acondicionamiento previos a la

criopreservación, así como la selección y aplicación de crioprotectores, evaluando tipos de compuestos, concentraciones y métodos de aplicación, se identificaron también las condiciones óptimas de almacenamiento post-criopreservación, considerando variables como temperatura, humedad y tiempo necesarios para asegurar la viabilidad a largo plazo de las semillas de orquídeas.

Finalmente, se discutieron los beneficios de la criopreservación de semillas y el papel estratégico de los bancos de germoplasma en la conservación y gestión de las orquídeas nativas de Ecuador, subrayando su importancia para preservar la diversidad genética y mantener la viabilidad a largo plazo de estas especies fuera de su hábitat natural.

3.6 Herramientas de gestión de referencias

Se utilizó una herramienta de gestión de referencias bibliográficas que es Mendeley que Bailey y Arciuli (2022), describen como el mejor gestor para organizar y gestionar las referencias bibliográficas obtenidas durante el proceso de revisión de la literatura.

Esta herramienta nos ayudó a importar automáticamente referencias desde bases de datos científicas, catálogos de bibliotecas en línea y otros recursos académicos lo que facilitó el proceso de recopilación de referencias y redujo la posibilidad de errores manuales.

4 Resultados y Discusión

En la revisión bibliográfica un aspecto principal es la descripción de la anatomía y fisiología de las semillas de orquídeas las orquídeas nativas del Ecuador las que presentan una gran diversidad morfológica y estructural, que se refleja en la variabilidad de sus semillas.

Comparable con estudios como el de Ghani (2022), que ha comprobado que las semillas de orquídeas tienen una cubierta semipermeable que las protege parcialmente durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, esta misma característica puede limitar la penetración de crioprotectores, requiriendo técnicas específicas de pretratamiento para mejorar su eficacia.

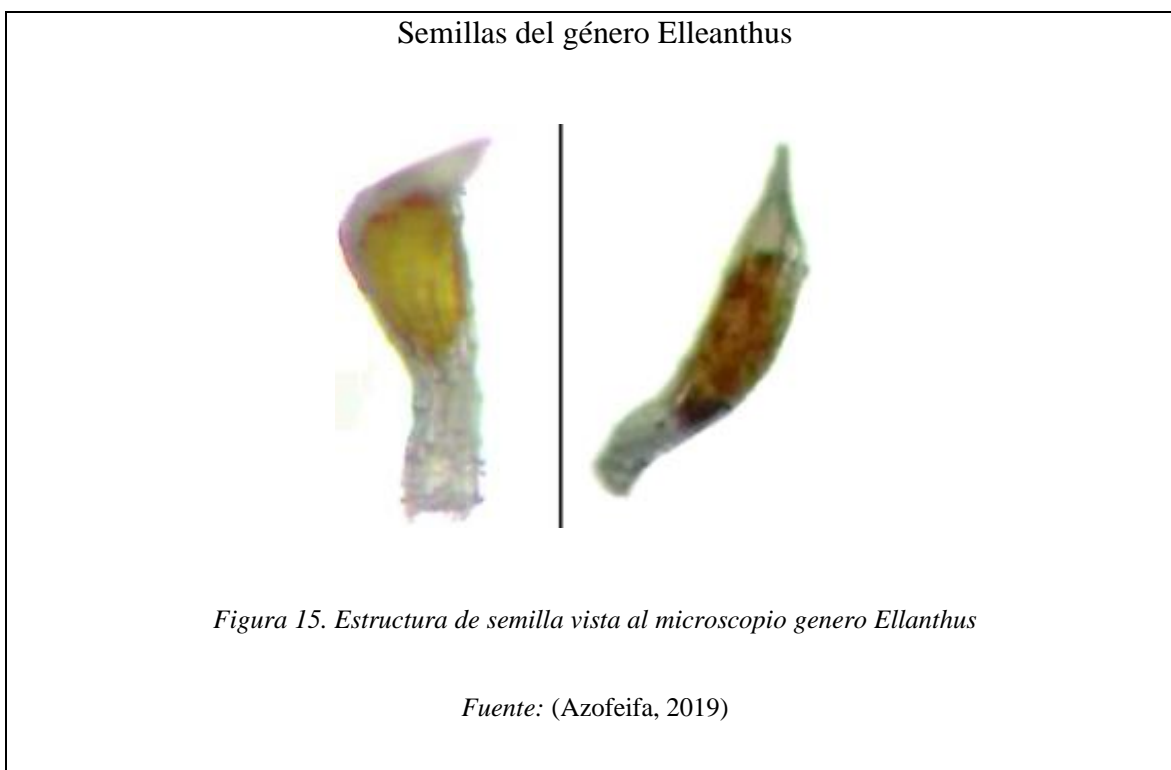
Esta revisión bibliográfica revela una diversidad notable en su morfología y estructura, en promedio, estas semillas tienen longitudes que oscilan entre 0,28 mm y 0,56 mm, con diámetros comprendidos entre 0,06 mm y 0,08 mm, bajo observación microscópica, se destacan diversas formas que incluyen extremos puntiagudos y cuerpos ensanchados en el centro, la clasificación morfológica revela una variedad de tipos de semillas según los estudios revisados, el peso promedio calculado por semilla varía aproximadamente entre 1,017 microgramos y 1,42 microgramos, dependiendo del género estudiado y la densidad de semillas por miligramo reportada en la literatura. Estos descubrimientos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones en conservación, biotecnología vegetal y manejo de germoplasma en orquídeas.

4.1 Genero *Elleanthus*

Para el género *Elleanthus*, en recopilación de toda la revisión bibliográfica las semillas tienen una longitud promedio de 0,28 mm, con un rango de 0,231 a 0,362 mm, y un diámetro promedio de 0,06 mm, con un rango de 0,054 a 0,079 mm, comparable con lo establecido

por Smics (2018), en un peso promedio de las semillas es el más alto entre los tres géneros estudiados, con 982,5 semillas por miligramo, lo que sugiere que cada semilla pesa aproximadamente 1,017 microgramos.

Para Smics (2018), los rasgos morfológicos y fisiológicos de las semillas ecuatorianas únicas del género *Elleanthus* son esenciales para su criopreservación. Debido a su pequeño tamaño y ausencia de endospermo, estas semillas dependen de hongos micorrízicos para germinar, lo que resalta la importancia de las conexiones simbióticas en su desarrollo temprano y el intercambio de agua es posible gracias al fino tegumento de la semilla, que es esencial para los procedimientos de criopreservación. Tienen la capacidad de entrar en estado de latencia y están dotados de defensas inherentes contra el estrés oxidativo y la desecación, que garantizan su viabilidad tanto durante como después del almacenamiento en criopreservación.



Las semillas tienen una forma ensanchada en el centro, con un extremo puntiagudo y en el otro extremo cuadrado (Figura 15). Esta forma predominante corresponde al número 55 según el gráfico de formas de semillas bajo el microscopio.

4.2 Genero *Epidendrum*

Según (Iriondio, 2023) el género *Epidendrum*, nativo de Ecuador, presenta una morfología y fisiología fundamental para la criopreservación de sus semillas. Debido a su pequeño tamaño y a la falta de endospermo, estas semillas requieren de relaciones con hongos micorrízicos para poder germinar y crecer completamente, el tegumento de la semilla es delgado, lo que permite un intercambio efectivo de gas y agua, lo cual es crucial para la criopreservación.

Para preservar su viabilidad tanto antes como después del almacenamiento criogénico, las semillas de *Epidendrum* tienen la capacidad de entrar fisiológicamente en un estado latente y tienen defensas incorporadas contra el estrés oxidativo y la desecación.

La investigación también resalta la importancia del contenido de antioxidantes y la estructura celular, lo que mejoran en gran medida la capacidad de una célula para soportar el daño por congelación.

En esta revisión, se encontraron diferentes características morfológicas y físicas. Por ejemplo, según Iriondio (2023), las semillas tienen una longitud promedio de 0,56 mm, con un rango entre 0,421 a 0,670 mm (Figura 16), y un diámetro promedio de 0,07 mm, con un rango de 0,046 a 0,095 mm. El peso promedio de estas semillas establecido en todos los artículos revisados es de 702,75 semillas por cada miligramo, sugiriendo un peso aproximado de 1,42 microgramos por semilla, se la coloco en la forma 1, según los autores Clifford y Smith (*Anexo 1*).

Semillas del género *Epidendrum*

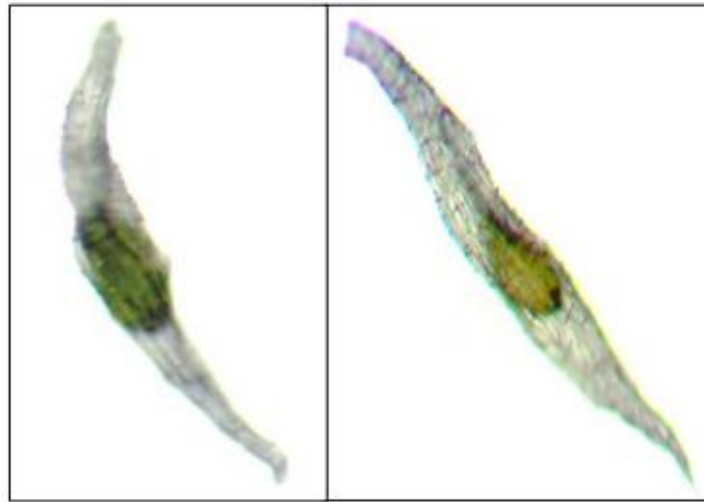


Figura 16. Semillas del género *Epidendrum* vista al microscopio

Fuente: (Iriondo, 2023)

4.3 Genero *Sobralia*

Analizando los diferentes artículos seleccionados se encontraron algunas diferencias significativas en las características morfológicas y físicas de las semillas en comparación con el género *Elleanthus*. Por ejemplo, las semillas de *Sobralia* mostraron un promedio de longitud de 0,42 mm, con un rango que varió entre 0,361 a 0,510 mm, y un promedio de diámetro de 0,08 mm, con un rango entre 0,061 a 0,104 mm.

A diferencia de *Elleanthus*, el promedio de peso de las semillas de *Sobralia* fue menor, con 750 semillas por miligramo, lo que sugiere un peso aproximado de 1,333 microgramos por semilla, con respecto a este género no se logró encontrar imágenes precisas de su semilla vista al microscopio lo cual no permite una óptima comparación a nivel microscópico de la misma.

4.4 Procesos de criopreservación

A lo largo de la revisión bibliográfica, se identificaron una variedad de métodos y técnicas empleadas para preservar la viabilidad y la integridad genética de las orquídeas nativas del Ecuador en condiciones de almacenamiento a largo plazo.

La preservación efectiva de estas especies es crucial debido a su alta sensibilidad a cambios ambientales y su valor tanto ecológico como económico, los cuales han sido desarrollados y refinados para minimizar el daño celular durante el proceso de congelación y descongelación.

4.4.1 Vitrificación y Protocolo

Para Sakai (2019), demostro que el proceso de vitrificación es eficaz para mantener la viabilidad y la integridad estructural de varias especies de orquídeas destacando nuestras tres especies de orquídeas *Elleanthus*, *Epidendrum* y *Sobralia* ya que esta técnica requiere de un proceso de optimización cuidadosa de la concentración y combinación de crioprotectores para evitar la toxicidad.

Otros estudios han confirmado estos hallazgos, resaltando la importancia de factores como la tasa de enfriamiento y la composición de las soluciones crioprotectoras. Según (Engelmann, 2020), la vitrificación ha sido exitosa en la preservación de tejidos de orquídeas a nivel mundial, pero es necesario considerar la variabilidad entre especies y las condiciones específicas de cada muestra.

Un aspecto crítico en la vitrificación es el uso de soluciones vitrificantes, que son mezclas de varios crioprotectores diseñadas para maximizar la viabilidad celular, estas soluciones deben

ser suficientemente concentradas para prevenir la formación de hielo, pero no tan concentradas como para ser tóxicas para las células (Luciani, 2019).

Para Sakai (2019), el protocolo más adecuado para conservación de estas semillas de orquídeas de las especies *Elleanthus* y *Sobralia* es realizar el método de vitrificación el cual garantiza un proceso de conservación:

➤ **Protocolo de Vitrificación para Semillas de *Elleanthus* y *Sobralia***

Recolección y Preparación de Semillas

Una vez que son extraídas las semillas de las plantas sanas y maduras, las semillas de *Elleanthus* y *Sobralia* se realiza un tratamiento con hipoclorito de sodio al 1% durante un periodo de diez minutos, se secan en una cámara de flujo laminar y se realiza una limpieza con agua destilada.

Exposición a Soluciones Vitrificantes

Las semillas se colocan en una solución vitrificante que contiene una concentración 0,4 M de sacarosa, 15% de etilenglicol, 15% de glicerol y 5 % DMSO. Las semillas estén bien saturadas con los crioprotectores, la exposición se realiza a temperatura ambiente durante un lapso de 10 minutos.

Congelación Rápida

Las semillas se sumergen en nitrógeno líquido a (-196 °C) después de su exposición a la solución de vitrificación. Logrando como resultado de este enfriamiento rápido en el cual no

se pueden formar cristales de hielo y las semillas quedan completamente en un estado vítreo similar al vidrio (vitrificadas).

Almacenamiento en Nitrógeno Líquido

El almacenamiento de las semillas vitrificadas se realiza a -196°C en nitrógeno líquido, garantizando una conservación a largo plazo.

4.4.2 Enfriamiento Controlado y Protocolo

Para (Reed, 2021) manifiesta que el enfriamiento controlado es otro método importante que tiene como resultado un descenso gradual de la temperatura, reduciendo así el riesgo de daño celular por choque térmico, este método es particularmente útil para orquídeas cuyas semillas o tejidos son sensibles a cambios bruscos de temperatura destaca el uso de este método para las tres tipos de especies de orquídeas *Elleanthus*, *Epidendrum* y *Sobralia* en la que está enfocada esta revisión bibliográfica. El enfriamiento controlado facilita la transición a temperaturas ultra bajas de manera que las células vegetales pueden adaptarse gradualmente, lo que aumenta la supervivencia post-descongelación.

Una combinación de enfriamiento controlado y vitrificación ha mostrado ser efectiva en la preservación de tejidos meristemáticos de orquídeas, como lo reportado por (Lambardi, 2021) que permite aprovechar las ventajas de ambos métodos, ofreciendo una mayor protección contra el daño celular y mejorando las tasas de supervivencia post-descongelación.

Vieira (2017), propone un protocolo específico para *Epidendrum*: uno de enfriamiento controlado, donde las semillas se exponen gradualmente a bajas temperaturas antes de la congelación final.

➤ **Protocolo de Enfriamiento Controlado de Semillas de Epidendrum**

Recolección y Preparación de Semillas

Se recolectan de plantas sanas y maduras, se realiza una limpieza para desechar suciedades, como siguiente paso tenemos una desinfección la cual se basa en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un tiempo bajo reloj de 10 minutos posteriormente se secan al aire y se realiza un lavado con agua destilada.

Preparación de la solución de criopreservación

Se sumerge las semillas en una solución de 5 % DMSO y de sacarosa al 0,4 M , se incuban a 4°C permitiendo la adaptación a temperaturas bajas.

Enfriamiento Gradual

Las semillas se trasladan a una cámara de enfriamiento donde un congelador programable descenderá la temperatura para que tenga una caída progresiva reduciendo 1°C/min hasta alcanzar una temperatura final de - 40 °C este paso es esencial para evitar un choque térmico.

Congelación Final

Una vez que se alcanza la temperatura deseada las semillas se mantienen a esta temperatura aproximadamente por un lapso de 2 horas logrando una estabilización posteriormente se sumergirán en nitrógeno líquido donde alcanzan $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se almacenan a largo plazo.

4.4.3 Uso de Crioprotectores

El uso de crioprotectores es de fundamental importancia y hace un énfasis en el cuidado de las células del daño causado por la formación de cristales para Mroginski (2020), manifiesta que estas sustancias químicas son de los métodos más utilizados se encuentran el dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol y el etilenglicol, estos compuestos de relevante importancia funcionan al penetrar las células y reducir el punto de congelación del agua intracelular, creando soluciones vítreas en lugar de cristales de hielo. Este punto es relevante el uso de un adecuado crioprotector es indispensable en el manejo de criopreservación, los resultados obtenidos después de una larga indagación literaria nos llevan a un solo resultado el cual va a estar enfocado en la preservación de orquídeas.

La eficacia de los crioprotectores en la criopreservación de orquídeas ha sido demostrada en varios estudios. Por ejemplo (Harikrishnan, 2022), destaca que la combinación de DMSO y sacarosa como crioprotectores que pueden mejorar significativamente la viabilidad de las semillas de orquídeas tras la descongelación.

4.5 Beneficios de los Bancos de Conservación de Semillas

Para Pritchard (2022), afirma que los bancos de conservación de semillas, permite el mantenimiento de poblaciones viables fuera de su hábitat natural, son una base fundamental

para el estudio científico enfocado a la conservación y el manejo de las orquídeas. Los bancos ayudan a mantener la variedad genética, incrementa la eficacia de la conservación de las especies en riesgo y promover la cooperación global, la finalidad es proteger las especies en peligro de extinción y avanzar la biotecnología genética mediante la conservación de material genético de valor incalculable.

Estos bancos, ubicados estratégicamente en diferentes partes del mundo, actúan como depósitos de material genético valioso, almacenando semillas de orquídeas, los bancos no solo protegen contra la pérdida de especies debido a la destrucción del hábitat, sino que también sirven como reservas genéticas esenciales.

Por ejemplo, estudios recientes como los realizados por Pritchard (2022), han demostrado que los bancos de semillas pueden mantener una amplia diversidad genética dentro de las poblaciones de orquídeas, permitiendo así investigaciones genéticas profundas y el desarrollo de estrategias para la conservación a largo plazo.

Además de su función conservacionista, estos bancos facilitan la colaboración internacional en la conservación de orquídeas, proporcionan una plataforma para el intercambio de material genético entre instituciones y países, promoviendo prácticas de conservación más robustas y sostenibles a nivel global, esta colaboración no solo fortalece los esfuerzos individuales de conservación, sino que también establece redes internacionales que pueden responder de manera coordinada ante emergencias ambientales y cambios en las condiciones de hábitat.

5 Conclusiones

En esta investigación, se ha explorado la diversidad morfológica de las semillas de tres géneros de orquídeas: *Elleanthus*, *Epidendrum* y *Sobralia*, se ha observado que cada género presenta características únicas en cuanto a forma, tamaño y color de sus semillas. *Elleanthus* se distingue por sus semillas pequeñas, puntiagudas en un extremo y cuadradas en el otro, de color amarillo. *Epidendrum* exhibe semillas elípticas de color verde, mientras que *Sobralia* presenta alargadas o fusiformes, con una superficie lisa y uniforme, de un tono amarillo más intenso en comparación con los otros géneros estudiados.

Estas variaciones morfológicas destacan la necesidad de implementar estrategias de conservación específicas y adaptativas para cada género de orquídea, la conservación efectiva no puede depender de un enfoque único y generalizado, sino que debe considerar las particularidades taxonómicas y morfológicas observadas en cada especie.

La viabilidad y la integridad genética se han preservado con éxito mediante técnicas de crioconservación como la vitrificación y el enfriamiento controlado. Para aumentar la eficacia de la crioconservación, son cruciales ciertos métodos de pretratamiento y el uso adecuado de crioprotectores, como el DMSO y la sacarosa. Estas técnicas subrayan la importancia de la crioconservación en la preservación de la biodiversidad, ya que permiten la conservación a largo plazo y brindan la oportunidad de restaurar poblaciones de orquídeas en peligro.

Los bancos de conservación de semillas se erigen como pilares fundamentales para la gestión y preservación de la diversidad de orquídeas ecuatorianas. Al resguardar su material genético, estos bancos no solo aseguran la supervivencia de especies en peligro, sino que también

fomentan la colaboración internacional en iniciativas de conservación. Esta estrategia resulta crucial para enfrentar los desafíos globales del cambio climático y la pérdida de hábitat, garantizando la supervivencia de estas emblemáticas especies para las futuras generaciones.

6 Recomendaciones

Se recomienda continuar investigando las características morfológicas, físicas y genéticas de las semillas de orquídeas, así como su relación con los procesos de germinación y desarrollo de las plántulas, esta investigación futura puede proporcionar información invaluable para optimizar las estrategias de conservación y manejo de estas especies.

Dada la diversidad en las características de las semillas entre diferentes géneros y especies de orquídeas, se sugiere desarrollar protocolos de conservación específicos para cada grupo taxonómico, estos protocolos deben ser diseñados con flexibilidad para adaptarse a las necesidades únicas de cada especie.

Así también establecer programas de monitoreo y evaluación continua para verificar la eficacia en los métodos de conservación implementadas, ajustar los protocolos de vitrificación y enfriamiento controlado para cada especie específica.

7 Bibliografía

- Aguirre-Bolaños, M., Benítez, J., González, M., Hernández, L., Quintanar, R., & Flores, C. M. (2017). Efecto del almacenamiento prolongado sobre la viabilidad y perfil de ácidos grasos en semillas de *encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2). <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.2.151-160>
- Alfaro, A. (2023). Seed Morphology of Three Neotropical Orchid Species of the *Lycaste* Genus. *Seeds*, 2(3). <https://doi.org/10.3390/seeds2030025>
- Alves, M., Fabio De Toni, K., & José Fernando. (2024). Anatomical features of pollinia and caudicle in *Epidendrum* (Orchidaceae; Epidendroideae). *Revista Brasileira de Botanica*, 47(1). <https://doi.org/10.1007/s40415-023-00963-z>
- Andriolli, B., Corredor, J., Pescador, R., Montoya, F., & Vesco, L. D. R. M. (2023). Morpho-anatomy of in vitro germination and cryopreservation of the orchid *Cattleya crispa* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 71(1). <https://doi.org/10.15517/REV.BIOL.TROP.V71I1.52338>
- Arista, J. (2023). New and noteworthy species of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae, Laeliinae) from the Área de Conservación Privada La Pampa del Burro, Amazonas, Peru. *PhytoKeys*, 227. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.227.101907>
- Bailey, B., & Arciuli, J. (2022). Literacy instruction for autistic children who speak languages other than English. *Autism*, 26(2). <https://doi.org/10.1177/13623613211025422>
- Baltazar-Bernal, O., De-la-Cruz, V., Hernández-García, A., & Zavala, J. (2023). An Exploratory Study Of Orchidaceae Species Fruits In The Central Zone Of Veracruz State, Mexico. *Agrociencia*, 57(5). <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2860>

- Baquero, L., & Verkovitch, D. G. (2019). Two new species and new records of platystele (Pleurothallidinae: Orchidaceae) From Los Cedros reserve In Ecuador. *Lankesteriana*, 19(1). <https://doi.org/10.15517/lank.v19i1.36900>
- Baranow, P., Szlachetko, D., & Kindlmann, P. (2023). Taxonomic revision of Sobralia section Racemosae Brieger (Sobralieae, Orchidaceae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1058334>
- Bitty, A. (2018). New Mining Concessions Could Severely Decrease Biodiversity and Ecosystem Services in Ecuador. *Tropical Conservation Science*, 11. <https://doi.org/10.1177/1940082918780427>
- Castro, A., Souza, F., & Franco, J. (2022). Brazilian ornamental phylogenetic resources in Embrapa germplasm banks: obstacles and opportunities. *Ornamental Horticulture*, 28(4). <https://doi.org/10.1590/2447-536X.V28I4.2549>
- Cerdá, A. (2019). *Análisis de semillas de Encyclia adenocaula (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación ex situ.*
- Chen, W., Kao, Y., Tang, C., Tsai, C., & Lin, T. Y. (2013). Estimating nuclear DNA content within 50 species of the genus Phalaenopsis Blume (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.045>
- Chen, W., Tang, C., & Kao, Y. L. (2010). Polyploidy and variety improvement of phalaenopsis orchids. *Acta Horticulturae*, 878. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.14>
- Chithra, D., Sangilimuthu, A., & Daanya V. (2021). Slow-growth conservation-cryopreservation and Analysis of genetic stability of in vitro regenerated Coelogyne

- Nervosa A. Rich A endemic orchid. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(2). <https://doi.org/10.26452/ijrps.v12i2.4222>
- Collier, M., Fisher, J., Gribbins, K., Yoder, J., & Zettler, L. W. (2023). Differences in seed morphometrics of representative orchids native to North America and Hawaii using scanning electron microscopy. *South African Journal of Botany*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.11.049>
- Das, M. (2021). Looking for a way forward for the cryopreservation of orchid diversity. In *Cryobiology* (Vol. 102). <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.05.004>
- Das, M., Nongsiang, A., & Sanglyne, M. (2023). Detection methods and in vitro elimination techniques for orchid viruses: A review. In *South African Journal of Botany* (Vol. 153). <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.12.003>
- Decruse, S., Ajeeshkumar, S., & Vargheese, S. (2023). *Pollinia Cryopreservation of Selected Orchid Species of Western Ghats, India*. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2843-0_35
- Diantina, S., McCormick, A., Pritchard, H., Millner, J., Nadarajan, J., Mastur, M., & McGill, C. (2022). Orchid seed micro-morphometry: Importance to species' biology, ecology, and conservation. *Acta Horticulturae*, 1334. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2022.1334.19>
- Diantina, S., McGill, C., McCormick, A. C, Pritchard, H., & Nadarajan, J. (2023). Comparative Seed Cryopreservation Of Indonesian And New Zealand Epiphytic And Terrestrial Orchids. *Cryo-Letters*, 44(4). <https://doi.org/10.54680/fr23410110312>
- Diaz Santos, F. (2000). Orchid preference for host tree genera in a Nicaraguan tropical rain forest. *Selbyana*, 21(1–2).

- Dolce, N., & González, M. T. (2020). Cryopreservation as a tool for long-term storage of *Cohniella cepula* (Orchidaceae) seeds. *Acta Horticulturae*, 1297. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1297.16>
- Dolce, N., Medina, R., Terada, G., González-Arno, M., & Flachsland, E. A. (2020). In Vitro Propagation and Germplasm Conservation of Wild Orchids from South America. In *Orchid Biology: Recent Trends and Challenges*. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_4
- Dressler, R. (2000). Mesoamerican orchid novelties 3. *Novon*, 10(3). <https://doi.org/10.2307/3393099>
- FENG, C.-L., DENG, Z., CAI, D., WU, T., JIA, H., BAI, L., ZHAO, Z.-Z., & SU, Y. (2012). Current Status and Conservation Strategies of Wild Orchid Resources in Guangxi Yachang Forests. *Plant Science Journal*, 30(3). <https://doi.org/10.3724/sp.j.1142.2012.30285>
- Figueroa Coyolxauhqui. (2022). *Orquídeas de dos localidades de la Sierra Tarahumara*.
- Francisco, T., Couto, D., Moreira, M., Fontana, A., & de Fraga, C. N. (2023). Inselbergs from Brazilian Atlantic Forest: high biodiversity refuges of vascular epiphytes from Espírito Santo. *Biodiversity and Conservation*, 32(7). <https://doi.org/10.1007/s10531-023-02618-7>
- Freitas, E. (2022). First report of *Botrytis cinerea* causing basal leaf rot and defoliation on *Maxillaria richii* (Orchidaceae). *Crop Protection*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106034>
- Ghani. (2022). *Orchids* .

- Gholami, S., Vafae, Y., Nazari, F., & Ghorbani, A. (2021). Exploring genetic variations in threatened medicinal orchids using start codon targeted (SCoT) polymorphism and marker-association with seed morphometric traits. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(4). <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00978-4>
- Guamán Cobos Luis Vinicio. (2021). *Análisis del comportamiento de las exportaciones del sector florícola del Ecuador*.
- Handini, E., Aprilianti, P., Handayani, I., & Yuniar. (2021). Inventarisasi Jenis-Jenis Anggrek Berpotensi Obat Koleksi Kebun Raya Bogor Dan Upaya Konservasi Secara In Vitro. In *Warta Kebun Raya* (Vol. 19, Issue 1).
- Iriondio. (2023). *Género Epidendrum*.
- Jiménez, M. (2021). A taxonomic revision of genus *Phloeophila* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) in Ecuador. *Plant and Fungal Systematics*, 66(1). <https://doi.org/10.35535/pfsyst-2021-0002>
- Jiménez, M., Martel, C., Garzón-Suárez, H., Baquero, L., Mashendo, V., & Iturralde, G. A. (2024). *Telipogon leisberthvelezii* (Orchidaceae: Oncidiinae), a new orchid species from the Cordillera del Cóndor in Ecuador. *Kew Bulletin*, 79(1). <https://doi.org/10.1007/s12225-023-10145-5>
- Jyothsna, B. (2024). Study of morphology and orchid mycorrhizal associations in *Malaxis rheedei*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/jabb.2024.172466>
- Karremans, A. P., Moreno, J. S., Gil-Amaya, K., Morales, N. G., Espinosa, F., Mesa, S., Restrepo, E., Rincón-González, M., Serna, A., Sierra-Ariza, M., & Vieira-Urbe, S.

- (2023). Colombian Orchidaceae: A Catalogue Of The Pleurothallidinae. *Lankesteriana*, 23(2). <https://doi.org/10.15517/lank.v23i2.56158>
- Kolanowska, M. (2021). Synopsis of ecuadorian pterichis (orchidaceae). *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.10807>
- Kolanowska, M., Tsiftsis, S., Dudek, M., Konowalik, K., & Baranow, P. (2022). Niche conservatism and evolution of climatic tolerance in the Neotropical orchid genera *Sobralia* and *Brasolia* (Orchidaceae). *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18218-4>
- Kulus, D., & Miler, N. (2021). Application of plant extracts in micropropagation and cryopreservation of bleeding heart: An ornamental-medicinal plant species. *Agriculture (Switzerland)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/agriculture11060542>
- Kumar, J., Katoch, D., Thakur, A., Pathania, A., Anand, A., Choudhary, K., & Shelja. (2024). A comprehensive review on threats and conservation status of orchids. In *Journal of Applied Biology and Biotechnology* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.7324/JABB.2024.150084>
- Lambardi. (2021). *Enfriamiento controlado*.
- Laura Sánchez. (2022). *Herramientas para el mejoramiento genético de orquídeas del género Vanda*.
- Mahfeli, M., Minaei, S., Fadavi, A., & Daylami, S. D. (2022). Precision measurement of physical properties of orchid synthetic seeds produced under various encapsulation conditions using Image J platform. *Industrial Crops and Products*, 187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115364>

- Marrero, Á., Claessens, M., González, D., Santiago, C., & Claessens, J. (2019). Chorological additions and distribution of the native orchids of Gran Canaria. *Botánica Macaronésica*, 88.
- Mátyás, B., Cerna, M., Valdivieso, P., Cella, R., & Aucapiña, C. (2018). Cryopreservation of orchid seeds through rapid and step freezing methods [version 1; peer review: 1 approved, 2 approved with reservations]. *F1000Research*, 7.
- Mayo-Mosqueda, A., Maceda-López, L. F., Andrade-Canto, S. B., Noguera-Savelli, E., Caamal-Velázquez, H., Cano-Sosa, J. del S., & Alatorre-Cobos, F. (2020). Efficient protocol for in vitro propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination. *South African Journal of Botany*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.030>
- Mites, M., García-Mozo, H., Galán, C., & Oña, E. (2022). Analysis of the Orchidaceae Diversity in the Pululahua Reserve, Ecuador: Opportunities and Constraints as Regards the Biodiversity Conservation of the Cloud Mountain Forest. *Plants*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/plants11050698>
- Mora, J., Albertazzi, S., & Bolaños-Villegas, P. (2018). Meiotic chromosome analysis in tropical orchid genus *Sobralia*. *Cah. Soc. Fr. Orch.*, N° 9(September 2018).
- Morales, F. (2021). *Masdevallia* × *urbanae* (Orchidaceae)—a new, natural hybrid between *m. floribunda* and *m. tuerckheimii* from Guatemala. *Diversity*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/d13030108>
- Mroginski. (2020). *Crioprotectores* .

- Ordoñez, J., & Montes-Pulido, C. (2013). Orquideoflora de la Reserva Natural Quininí, Tibacuy, Cundinamarca, Colombia y consideraciones para su bioprospección. *Orquideología*, 30(1).
- Orquidealeza. (2019). *Tipos de crecimiento de las Orquídeas*. <https://Orquidealeza.Blogspot.Com/2014/05/de-Crecimiento-de-La-Orquidea-Las-Dos.Html>.
- Oyibo, K., Sahu, K. S., Oetomo, A., & Morita, P. P. (2022). Factors Influencing the Adoption of Contact Tracing Applications: Systematic Review and Recommendations. In *Frontiers in Digital Health* (Vol. 4). <https://doi.org/10.3389/fdgth.2022.862466>
- Padrón, P. (2023). Going up: new altitudinal records of orchid bees (Hymenoptera: Apidae) in the inter-Andean valleys of southern Ecuador and their potential dispersal route. *REVISTA CHILENA DE ENTOMOLOGÍA*, 49(4). <https://doi.org/10.35249/rche.49.4.23.13>
- Pansarin, E., & Pansarin, L. (2014). Reproductive biology of *Epidendrum tridactylum* (Orchidaceae: Epidendroideae): A reward-producing species and its deceptive flowers. *Plant Systematics and Evolution*, 300(2). <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0884-9>
- Pereira, S. S, Pivetta, K. F., L. J., & de Faria, R. T. (2021). Efficiency of cryoprotectors for cryopreservation of two orchid species from Americas. *Rodriguesia*, 72. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202172123>
- Pinheiro, F., & Barros, F. de. (2007). *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea*, 34(4). <https://doi.org/10.1590/s2236-89062007000400010>

- Pradhan, N., Fan, X., Martini, F., Chen, H., Liu, H., Gao, J., & Goodale, U. M. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical Studies*, 63(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-022-00333-0>
- Pritchard. (2022). Bancos de germoplasma .
- Pupulin, F., Bogarín, D., & Karremans, A. P. (2023). LANKESTER CATALOGUE OF COSTA RICAN ORCHIDACEAE. *Lankesteriana*. <https://doi.org/10.15517/lank.v23isupplement.58145>
- Quispe-Melgar, H., Ayala, E., Llacua-Tineo, Y., & Hågsater, E. (2023). Synopsis of the Peruvian species of *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) belonging to the Scabrum group, subgroup Soratae: diversity and description of a new species. *Phytotaxa*, 603(1). <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.603.1.1>
- Rajan, K. S., Burkhan, H., Chew, B., Appalasamy, S., Poobathy, R., & Subramaniam, S. (2022). COMPARATIVE ANALYSIS OF DAMD, ISSR, AND SCOT MOLECULAR MARKERS ON CRYOPRESERVED LUDISIA DISCOLOR AXILLARY BUDS. *Malaysian Journal of Science*, 41(2). <https://doi.org/10.22452/mjs.vol41no2.1>
- Revistabionatura. (2020). *Semillas de tres especies de orquideas* .
- Romero, B., & Solano, R. (2023). *Pleurothallis inaudita*, an unnoticed new species in Pleurothallidinae (Orchidaceae) from southwestern Ecuador. *Phytotaxa*, 620(1). <https://doi.org/10.11646/PHYTOTAXA.620.1.6>
- Rykaczewski, M., Krauze-Baranowska, M., Żuchowski, J., Krychowiak-Maśnicka, M., Fikowicz-Krośko, J., & Królicka, A. (2019). Phytochemical analysis of *Brasolia*, *Elleanthus*, and *Sobralia*. Three genera of orchids with antibacterial potential against

Staphylococcus aureus. *Phytochemistry Letters*, 30.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.008>

Sakai. (2019). *Vitrificación alternativa biotecnología* .

Salazar, G., Baquero, L., Jiménez, M., & Rizo-Patrón, F. (2022). DNA links Andean tepui endemic *Helonoma peruviana* to *Hapalorchis* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Phytotaxa*, 574(1). <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.574.1.3>

Santa Cruz, L., Chocce, M., Vega, N., Rodríguez, E., & Campos, J. (2020). Flora orquideológica del distrito Pulán , provincia Santa Cruz , Cajamarca , Perú. *Arnaldoa*, 27(1).

Schvambach, N. N., Suzuki, R., & Pescador, R. (2022). Anatomical and histochemical characterization of seeds of *Cattleya intermedia* subjected to different storage conditions. *Rodriguesia*, 73. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202273111>

Shi, L., Zhao, Z., Yang, L., Ding, G., & Xing, X. (2023). Bioactive steroids from seed germination supporting fungus (*Ceratobasidium* GS2) of the terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. *Mycology*, 14(4).
<https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2254893>

Singh, S., Waman, A., Bohra, P., Gautam, R., & Roy, S. D. (2016). Conservation and sustainable utilization of horticultural biodiversity in tropical Andaman and Nicobar Islands, India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(8).
<https://doi.org/10.1007/s10722-016-0445-5>

Smics. (2018). *Género Ellanthus Características* .

- Thammasiria, K. (2021). Development of cryopreservation of endangered Thai orchid species. *Acta Horticulturae*, 1324. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1324.2>
- Trujillo Delsy. (2022). *Las orquídeas en El mundo vegetal de los Andes peruanos*.
- Tsai, C.-C., & Chou, C.-H. (2007). Molecular Phylogenetics of Phalaenopsis Taxa: An Updated Review. *Orchid Science and Biotechnology*, 1(1).
- Vaca, I., Cueva, E., Moya, B., Acurio, R., & Chiluisa-Utreras, V. (2018). Morphological and morphometric analysis of seeds of three species of native orchids from the neotropical region of Ecuador. *Bionatura*, 3(1). <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.01.8>
- Velázquez Juárez, Z., Alanís, J., Lozano, M., & Raya, B. E. (2024). Diversidad y conservación de orquídeas comercializadas en Tenango, Puebla, México. *UVserva*, 16. <https://doi.org/10.25009/uvs.vi16.2972>
- Vélez-Abarca, L., Jiménez, M. M., Moreno, J. S., & Baquero, L. E. (2022). Pityphyllum Mercedes-Abarcae (Maxillariinae) A New Species From Ecuador. *Lankesteriana*, 21(3). <https://doi.org/10.15517/lank.v21i3.48754>
- Vélez-Abarca, L., Jiménez, M., Ramírez-Iglesias, E., Parra-Suarez, S., Torracchi-Carrasco, E., & Benítez, Á. (2023). Orchid Diversity at Three Elevations in the Mountain Sandstone Plateaus of the Cordillera del Cóndor Ecuador. *Diversity*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/d15090979>
- Vendrame, W., Faria, R. T., & Sahyun, S. A. (2014). Orchid cryopreservation. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(3). <https://doi.org/10.1590/s1413-70542014000300001>

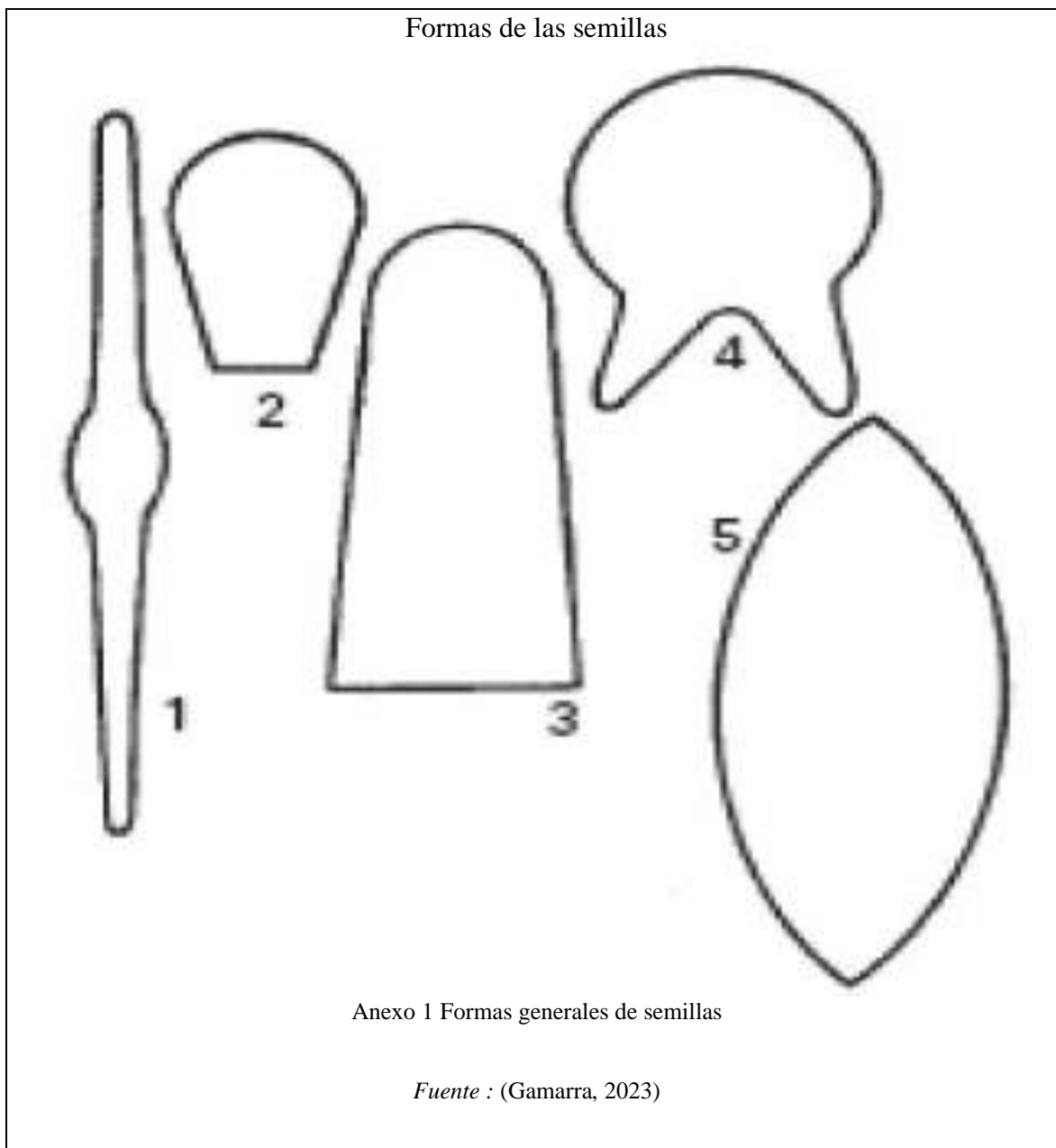
- Veronica Apolo Moreno Kelly. (2021). Evaluación De Procedimientos En La Conservación Y Germinación In Vitro De Semillas De La Orquídea Epidendrum nocturnum. *Tesis Doctoral. UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR.*
- Vettorazzi, R. G. C. V. S. , M. C. E. C. M. Da, & de Matos, E. M. L. F. (2019). Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus Cattleya. *Scientia Horticulturae*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108603>
- Vieira, B. C., Pansarin, L. M., Martucci, M. E. P., Gobbo-Neto, L., & Pansarin, E. R. (2017). Pollinarium size as a hybridisation barrier between sympatric inter-compatible orchids. *Australian Journal of Botany*, 65(6–7). <https://doi.org/10.1071/BT17081>
- Welan, M. A., Roring, V. I., & Lawalata, H. J. (2023). Inventarisation Of Orchid Types (Orchidaceae) In West Tomohon Area. *Indonesian Biodiversity Journal*, 4(2). <https://doi.org/10.53682/ibj.v4i2.6585>
- Yagame, T., Figura, T., Tanaka, E., Selosse, M. A., & Yukawa, T. (2024). Mycobiont identity and light conditions affect belowground morphology and physiology of a mixotrophic orchid *Cremastra variabilis* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s00572-024-01138-8>
- Yang, H., & Li.(2023). A novel method to produce massive seedlings via symbiotic seed germination in orchids. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1114105>
- Ye, C., An, M., Shi, J., Liu, F., & Zhang, Y. (2022). Spatial distribution and its limiting environmental factors of native orchid species diversity in the Beipan River Basin of

Guizhou Province, China. *Ecology and Evolution*, 12(11).
<https://doi.org/10.1002/ece3.9470>

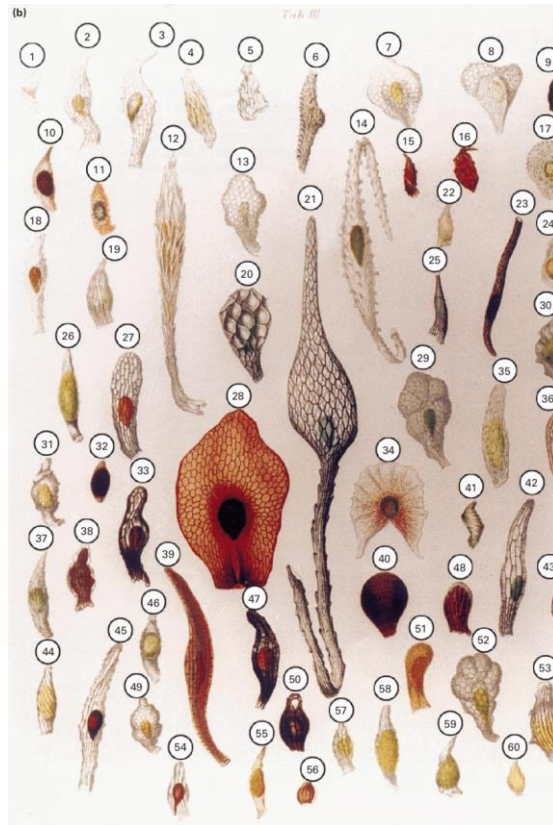
Zhao, D. K., Mou, Z. M., & Ruan, Y. L. (2024). Orchids acquire fungal carbon for seed germination: pathways and players. In *Trends in Plant Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.02.001>

Zhou, Z., Shi, R., Zhang, Y., Xing, X., & Jin, X. (2021). Orchid conservation in China from 2000 to 2020: Achievements and perspectives. *Plant Diversity*, 43(5).
<https://doi.org/10.1016/j.pld.2021.06.003>

8 Anexos



Diversas formas de semillas



Anexo 2 Formas de semillas

Fuente : (Arditti, 2019)